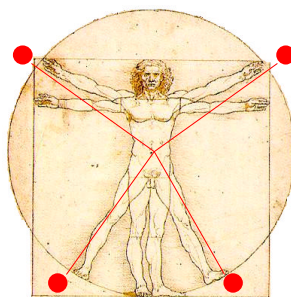


# TECNOLOGÍ@ y DESARROLLO

*Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente*

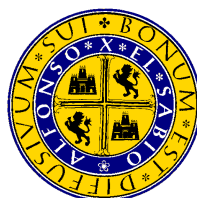
VOLUMEN I. AÑO 2003

SEPARATA



EMPLEO DE LIPASAS INMOVILIZADAS EN PROCESOS DE SINTESIS INDUSTRIAL DE ESTERES

Tomás García Martín, Mercedes Martínez Rodríguez y José Aracil Mira



UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO  
Escuela Politécnica Superior

Villanueva de la Cañada (Madrid)

© Del texto: Tomás García Martín, Mercedes Martínez Rodríguez y José Aracil Mira  
Junio, 2003

[http://www.uax.es/publicaciones/archivos/TECTIN03\\_002.pdf](http://www.uax.es/publicaciones/archivos/TECTIN03_002.pdf)

© De la edición: *Revista Tecnología y Desarrollo*

Escuela Politécnica Superior.

Universidad Alfonso X el Sabio.

28691, Villanueva de la Cañada (Madrid).

ISSN:

Editor: Julio Merino García [tecnología@uax.es](mailto:tecnología@uax.es)

No está permitida la reproducción total o parcial de este artículo, ni su almacenamiento o transmisión ya sea electrónico, químico, mecánico, por fotocopia u otros métodos, sin permiso previo por escrito de la revista.

## EMPLEO DE LIPASAS INMOVILIZADAS EN PROCESOS DE SINTESIS INDUSTRIAL DE ESTERES

**Tomás García Martín<sup>(a)</sup>, Mercedes Martínez Rodríguez<sup>(b)</sup> y José Aracil Mira<sup>(b)</sup>**

(a) Dr. Ingeniería Química, Departamento de Tecnología Industrial, Escuela Politécnica Superior, Universidad Alfonso X el Sabio, Avda. de la Universidad nº 1, Villanueva de la Cañada, 28691 Madrid, Tf.: 918109779, e-mail: tgarcmar@uax.es

(b) Dr. Ingeniería Química, Departamento de Ingeniería Química, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. de la Universidad s/n, 28040 Madrid, Tf.: 913944167, e-mail: jam1@quim.ucm.es

### RESUMEN

En el presente artículo se recoge un estudio previo para la optimización de la producción de oleato de cetilo. Para ello, se llevaron a cabo reacciones de esterificación en un reactor discontinuo tipo tanque agitado, empleando como catalizador una enzima inmovilizada procedente de la especie *Candida antarctica* (SP-435A, una triacilglicerolhidrolasa EC-3.1.1.3 fabricada por la empresa Novo Nordisk). Los intervalos de operación se fijaron en 70-80°C de temperatura y en 1,5-4,5% en peso para la concentración de catalizador. La aplicación de la técnica de diseño factorial de experimentos permitió la obtención tanto de modelos matemáticos como de superficies de respuesta. Este análisis estadístico posibilita predecir adecuadamente la evolución de la conversión en el sistema para diferentes tiempos de reacción en función de la temperatura y la concentración de catalizador. El valor óptimo de conversión (92%) se alcanzó a las 2 horas de reacción, trabajando a 75°C, con un 3% de lipasa inmovilizada y en condiciones de vacío.

**PALABRAS CLAVE:** Lipasas inmovilizadas, Esterificación industrial, Diseño factorial, Optimización de procesos, Síntesis enzimática, Esteres de alto peso molecular.

### ABSTRACT

The optimisation previous studies of cetyl oleate obtention process was covered in this paper. Esterification reactions were carried out in a stirred batch reactor using an immobilized enzyme from *Candida antarctica* as catalyst (SP-435A, triacylglycerohydrolase EC-3.1.1.3 from Novo Nordisk Industries). Range of operating temperature was fixed in 70-80°C and immobilized lipase concentration was fixed in a range of 1,5-4,5% weight. Factorial design technique was applied to experimental results and both mathematical models and surface response curves were obtained. This statistical analysis allowed to predict adequately the conversion evolution at different reaction times as a function of temperature and catalyst concentration. The optimum value for conversion (92%) was found at 2 hours of reaction time, working at 75°C of temperature, 3% of immobilized lipase concentration and using vacuum operating pressure.

**KEY-WORDS:** Immobilized lipases, Industrial esterification, Factorial design, Process optimization, Enzymatic synthesis, High molecular weight esters.

## 1. Introducción

En la actualidad son relativamente escasos los procesos industriales basados en el empleo de enzimas inmovilizadas que estén operando a escala industrial. Industrias como la química, farmacéutica, cosmética o alimentaria, son bastante reacias a adoptar las nuevas técnicas de producción que gradualmente se han ido desarrollando con el fin de facilitar la transformación química de compuestos de alto y bajo peso molecular.

La síntesis de moléculas que presentan una estructura compleja, si puede llevarse a cabo por vía enzimática, supone una reducción en el número de etapas necesarias, en comparación con la síntesis química convencional. Sin embargo, la industria ha de evaluar cuidadosamente los mercados disponibles para acoger los nuevos productos, si es este el caso, o bien si deben tenerse en cuenta la estabilidad, la cinética, las condiciones de operación y el coste de las enzimas inmovilizadas que se van a emplear para modificar un proceso de fabricación (Ratray, 1984).

El empleo de enzimas inmovilizadas o células inmovilizadas en la industria se producirá únicamente cuando sea económicamente ventajoso y cuando los procesos estén dirigidos hacia la obtención de un nuevo producto que demande el mercado, o cuando el nuevo proceso diseñado pueda competir favorablemente con los procesos industriales ya establecidos.

Centrándonos en este tipo de exigencias, se están llevando a cabo en nuestros laboratorios estudios de investigación que apuntan hacia la optimización de las condiciones de operación de síntesis de compuestos de elevado peso molecular, empleando enzimas inmovilizadas como sistemas catalíticos (Martínez et al., 2000).

Concretamente, la investigación aquí recogida se basa en la obtención por vía sintética de oleato de cetilo, un éster de alto peso molecular capaz de sustituir a algunos compuestos de origen natural que poseen un elevado valor añadido. Tal es el caso del aceite de cachalote, cuyas aplicaciones más relevantes tienen lugar dentro del ámbito de las industrias de lubricantes y cosmética, aunque también es habitual su empleo en industrias como la farmacéutica y la de alimentación.

Las enzimas empleadas para la síntesis de ésteres son generalmente las denominadas lipasas. Dicho tipo de enzimas poseen una especificidad que varía en cada caso,

dependiendo de la naturaleza biológica de las mismas, aunque normalmente muestran una regioespecificidad hacia los grupos hidroxilo primarios y secundarios, y una estereoespecificidad que permite actuar a las lipasas sobre un determinado isómero óptico. Los procedimientos desarrollados hasta ahora, que emplean lipasas seleccionadas e inmovilizadas como catalizador, permiten tanto un aumento de su termoestabilidad como el retraso de la desactivación, a la vez que se facilita el manejo y la posterior separación de la mezcla de reacción (Roy, 1994).

La mayoría de estos procesos han sido desarrollados para la síntesis de compuestos de bajo peso molecular y los resultados obtenidos son bastantes satisfactorios, pero la demanda actual requiere procesos en los que el objetivo fundamental es la síntesis de ésteres de alto peso molecular.

La investigación que debe llevarse a cabo, pasa por la elección del sistema enzimático inmovilizado que proporcione mejoras operacionales, técnicas y económicas, lo que generalmente viene dado por un aumento del rendimiento del proceso y una disminución del número de operaciones de separación y purificación.

Por otra parte, se están empleando técnicas de optimización como la basada en el diseño factorial de experimentos, con el fin de reducir al máximo el número de experimentos necesarios y cuantificar la influencia que ejercen las variables de operación sobre la eficacia y el rendimiento del proceso de síntesis en cuestión (Halling, 1994).

Dicha investigación redundará, a su vez, en una disminución del rango de las condiciones de operación, una reducción del tiempo de reacción, un incremento de la conversión y una mejora en la calidad del producto final obtenido. Todo ello revierte en un ahorro económico que ofrece las garantías suficientes para la puesta en planta del proceso enzimático en cuestión.

## **2. Materiales y método experimental**

Para llevar a cabo la experimentación se emplearon como materiales reaccionantes ácido oleico, que se obtiene fácilmente a partir del aceite de oliva, y alcohol cetílico procedente del aceite de palma, ambos suministrados por Henkel-Ibérica, con purezas superiores al 98%. El catalizador utilizado fue una lipasa EC-3.1.1.3, sintetizada a partir de cepas microbianas de *Candida antarctica* e inmovilizada sobre una matriz resinosa

de intercambio iónico, cuyo nombre comercial es SP-435-A, y que fue proporcionada por la división biotecnológica del grupo NOVO Nordisk Netherlands. Según las especificaciones del catalizador y los ensayos de calidad, el contenido en agua inmovilizada con la enzima sobre la matriz macroporosa resultó ser del 2% en peso, mientras que su actividad nominal se cuantificó en 7000 PLU.g<sup>-1</sup> (unidades de laurato de n-propilo obtenidas por cada gramo de catalizador empleado).

En cuanto al método experimental, el sistema propuesto consiste en un proceso de esterificación enzimática. Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor discontinuo de 500 cm<sup>3</sup> de volumen, provisto con un agitador de hélice que gira a 700 rpm, operando en régimen isoterma y equipado con sus correspondientes controles de presión y temperatura. Todos los experimentos se llevaron a cabo a presión reducida (6 KPa) con el fin de eliminar el agua generada durante la reacción de esterificación y, de esta manera, facilitar el desplazamiento del equilibrio químico hacia la formación del producto de reacción deseado. La mezcla final de cada reacción se sometió a un análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas para cuantificar e identificar las especies químicas presentes en el medio. Durante el transcurso de cada reacción, se tomaron varias muestras a lo largo del tiempo para cuantificar las especies químicas mediante cromatografía gas-líquido. El equipo empleado para dichos análisis fue un cromatógrafo-espectrómetro de masas HP 6890 Series con inyección automática, fabricado por Hewlett-Packard y conectado a un sistema informático para el tratamiento de los resultados analíticos. El equipo estaba dotado con una columna capilar de metilfenil silicona, sistema de inyección split-splitless y detector de ionización de llama (FID), resultando un tiempo de duración del análisis de unos 20 minutos. Para una mayor descripción del método de análisis, así como del procedimiento experimental, el lector puede consultar algunos trabajos previos (García et al., 1995 y 1996).

### **3. Resultados y discusión**

Para llevar a cabo el estudio de optimización del proceso de esterificación propuesto se ha empleado la técnica de Diseño Factorial de experimentos. Dicha técnica ha sido ampliamente descrita por numerosos autores (Kuehl, 2001) y, en términos generales, exige que las etapas a seguir sean las siguientes:

- Elección de la respuesta a medir.
- Elección de las variables objeto de estudio.
- Elección del intervalo de estudio.

- Planificación y realización de experimentos.
- Estudio y ajuste de los datos experimentales a modelos estadísticos.

Teniendo en cuenta estas etapas se decidió que, debido a que el proceso objeto de estudio era un proceso de esterificación catalítica, la respuesta más adecuada a medir era la conversión de ácido oleico en éster (oleato de cetilo). Naturalmente, la elección de dicha respuesta presupone que los métodos de toma de muestras y analíticos estén debidamente resueltos y que el valor de dicha variable sea capaz de cuantificar la validez, al menos técnica, del proceso.

La elección de las variables objeto de estudio, así como de los intervalos de operación para las mismas, se llevó a cabo teniendo en cuenta la experimentación previa realizada, los datos recopilados y la experiencia del grupo investigador en el estudio de procesos análogos (Aracil, 1998 y García, 1999). Según esto, las variables elegidas fueron la temperatura y la concentración de catalizador empleada para un volumen total de reacción fijado (250 cm<sup>3</sup>). Los intervalos estudiados fueron de 70 a 80°C para la temperatura de reacción y de 2 a 6 g (1,5% y 4,5% en peso) para la concentración de enzima inmovilizada presente en el medio de reacción. La velocidad de agitación se fijó en 700 rpm con el fin de evitar los posibles problemas de difusión, el tiempo total de reacción se fijó en 2 horas, la relación molar entre los reactivos fue 1:1, y la presión de operación se mantuvo en 6 KPa para todos los experimentos realizados.

El primer diseño factorial se llevó a cabo teniendo en cuenta dos niveles con los dos factores determinados por las variables de operación (temperatura y concentración de catalizador), por lo que el número de experimentos necesarios fue de cuatro (2<sup>2</sup>), que son los que se recogen en la Tabla 1, junto con los resultados correspondientes a las respuestas medidas, es decir la conversión a los 15, 30, 60 y 120 minutos de haberse iniciado la reacción.

Tabla 1. Matriz del primer diseño factorial  $2^2$  con las respuestas experimentales. T: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), W: concentración de catalizador (%),  $X_T$ : efecto de temperatura,  $X_W$ : efecto de concentración de catalizador.

Exper.	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	W (%)	$X_T$	$X_W$	Conversión (%)			
					15 min	30 min	60 min	120 min
1	80	4,5	+	+	81	88	93	90
2	80	1,5	+	-	79	86	92	94
3	70	4,5	-	+	58	88	89	81
4	70	1,5	-	-	68	80	78	85

El análisis estadístico correspondiente a este primer diseño factorial permitió cuantificar la influencia ejercida por las variables de operación sobre la conversión para cada tiempo de reacción según un modelo lineal. No obstante, a fin de conocer la validez de la hipótesis inicial al considerar una variación lineal, se procedió a realizar los correspondientes experimentos de replicación en los puntos centrales de los intervalos de operación. Dichos experimentos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Experimentos de replicación en los puntos centrales. T: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), W: concentración de catalizador (%),  $X_T$ : efecto de temperatura,  $X_W$ : efecto de concentración de catalizador.

Exper.	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	W (%)	$X_T$	$X_W$	Conversión (%)			
					15 min	30 min	60 min	120 min
5	75	3	0	0	65	70	90	93
6	75	3	0	0	63	69	87	94
7	75	3	0	0	61	70	90	93
8	75	3	0	0	62	73	91	96

Las pruebas de significación, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el conjunto global de experimentos permitieron estimar tanto el error experimental de los resultados evaluados como del modelo polinómico lineal empleado para el ajuste de los mismos.

En la Tabla 3 se recoge un resumen de las pruebas de significación realizadas.



Tabla 3. Pruebas de significación y valores para las influencias. S: varianza, Y: valor medio de los experimentos,  $Y_c$ : valor medio en los puntos centrales, C: curvatura, T: temperatura (°C), W: concentración de catalizador (%),  $X_T$ : efecto de temperatura,  $X_W$ : efecto de concentración de catalizador,  $X_{TW}$ : efecto cruzado de temperatura y concentración de catalizador.

Pruebas de significación a los 15 minutos				
Varianza: $S = 1,71$		Factor t de Student: $t = 3,182$		
Media: $Y = 71,5$		Media en puntos centrales: $Y_c = 62,75$		
Intervalo de confianza = $\pm 2,72$		Influencias significativas: T(+), W(-), TW(+)		
Curvatura: $C = Y - Y_c = -8,75$		Efecto de curvatura = $\pm 3,84$		
Pruebas de significación a los 30 minutos				
Varianza: $S = 1,73$		Factor t de Student: $t = 3,182$		
Media: $Y = 85,0$		Media en puntos centrales: $Y_c = 70,50$		
Intervalo de confianza = $\pm 2,75$		Influencias significativas: T(+), W(+), TW(-)		
Curvatura: $C = Y - Y_c = -15,0$		Efecto de curvatura = $\pm 3,90$		
Pruebas de significación a los 60 minutos				
Varianza: $S = 1,73$		Factor t de Student: $t = 3,182$		
Media: $Y = 88,0$		Media en puntos centrales: $Y_c = 89,50$		
Intervalo de confianza = $\pm 2,76$		Influencias significativas: T(+), W(+), TW(-)		
Curvatura: $C = Y - Y_c = 1,50$		Efecto de curvatura = $\pm 3,90$		
Pruebas de significación a los 120 minutos				
Varianza: $S = 1,41$		Factor t de Student: $t = 3,182$		
Media: $Y = 86,2$		Media en puntos centrales: $Y_c = 94,0$		
Intervalo de confianza = $\pm 2,25$		Influencias significativas: T(+), W(-), TW(-)		
Curvatura: $C = Y - Y_c = 7,75$		Efecto de curvatura = $\pm 3,18$		
Efectos principales e interacciones				
Efecto	15 min	30 min	60 min	120 min
T	17,0	3,0	9,0	6,5
W	-4,0	5,0	6,0	-6,5
TW	6,0	-3,0	-5,0	-2,5

A la vista del análisis realizado, es obvio por una parte que existe un claro efecto de la curvatura, al menos en tres de los cuatro casos analizados. Si además se tiene en cuenta que se observan cambios de tendencia en las influencias principales, resulta razonable considerar que el modelo polinómico lineal no explica adecuadamente los resultados experimentales.

Este hecho motivó la realización de cuatro experimentos adicionales en los puntos estrella del intervalo de operación. En la Tabla 4 se recogen los resultados de los referidos experimentos.

Tabla 4. Experimentos realizados en los puntos estrella.  $+\alpha$ : punto estrella superior,  $-\alpha$ : punto estrella inferior, T: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), W: concentración de catalizador (%),  $X_T$ : efecto de temperatura,  $X_W$ : efecto de concentración de catalizador

Exper.	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	W (%)	$X_T$	$X_W$	Conversión (%)			
					15 min	30 min	60 min	120 min
9	82	3	$+\alpha$	0	72	83	86	94
10	68	3	$-\alpha$	0	51	73	83	94
11	75	5,1	0	$+\alpha$	76	76	88	94
12	75	0,9	0	$-\alpha$	42	61	64	71

A partir de estos resultados experimentales es posible llevar a cabo un ajuste a un modelo polinómico cuadrático e interpretar el análisis estadístico a través de las superficies de respuesta. El análisis estadístico, teniendo en cuenta todos los experimentos realizados, muestra los resultados recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Efectos e interacciones para el diseño factorial completo con puntos estrella. T: efecto de temperatura, W: efecto de concentración de catalizador, TW: efecto cruzado de temperatura y concentración de catalizador, TT: efecto cuadrático de temperatura, WW: efecto cuadrático de concentración de catalizador.

Efectos	15 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos
T	15,92	5,04	5,56	3,24
W	10,02	7,80	11,48	4,88
TW	6,00	-3,00	-5,00	-2,50
TT	4,37	13,62	-1,12	-1,00
WW	1,87	4,12	-9,62	-12,50

Como puede observarse el valor tanto de los efectos como de las interacciones dobles cambia sustancialmente a medida que tiene lugar la reacción. Para tiempos cortos se puede observar una influencia mayoritaria de los efectos principales (temperatura y concentración de catalizador). En cambio, para tiempos largos de reacción se observa una mayor influencia de los efectos cruzados, incluidos los cuadráticos.

En general, puede observarse una mayor preponderancia de los términos en los que interviene la temperatura para tiempos cortos de reacción, es decir, cuando la velocidad de reacción es muy rápida y la evolución del sistema no se ve impedida por grandes concentraciones de los productos de reacción. En cambio, para tiempos largos de reacción, los términos predominantes suelen ser los que involucran la concentración de catalizador. Esto confirma que la evolución del sistema presenta un comportamiento proporcional de primer orden de la velocidad de reacción con respecto de la concentración de catalizador, mientras que la temperatura representa un menor grado de influencia en las inmediaciones del equilibrio de reacción.

A la vista de los resultados obtenidos se procedió a realizar los ajustes correspondientes mediante regresión no lineal a expresiones cuadráticas. En la Tabla 6 se recogen los modelos estadísticos para los diferentes tiempos de reacción. Dichos modelos se han obtenido ajustando las respuestas (conversión en oleato de cetilo) frente a los valores estadísticos de los efectos consignados como +1 para el límite superior del intervalo, -1 para el límite inferior del intervalo y 0 para el punto medio del intervalo. Los valores de los puntos estrella vienen definidos por  $\alpha$  y  $-\alpha$ , para este caso concreto 1,414 y  $-1,414$  respectivamente, según el número de niveles y de factores considerados en el diseño de experimentos.

Tabla 6. Modelos estadísticos. Y: conversión de ácido oleico en éster (%),  $X_T$ : efecto de temperatura,  $X_W$ : efecto de concentración de catalizador,  $X_{TW}$ : efecto cruzado de temperatura y concentración de catalizador

Tiempo	Modelo estadístico	Coef. Corr.
15 min.	$Y=62,75+7,96X_T+5,01X_W+3,00X_TX_W+2,19X_T^2+0,94X_W^2$	$r = 0,985$
30 min.	$Y=70,50+2,52X_T+3,90X_W-1,50X_TX_W+6,81X_T^2+2,06X_W^2$	$r = 0,988$
60 min.	$Y=89,50+2,78X_T+5,74X_W-2,50X_TX_W-0,56X_T^2-4,81X_W^2$	$r = 0,991$
120 min.	$Y=94,00+1,63X_T+2,44X_W-1,25X_TX_W-0,50X_T^2-6,25X_W^2$	$r = 0,987$

A la vista de los modelos estadísticos obtenidos, es posible analizar la conversión en función de las variables de operación empleando superficies de respuesta o curvas de nivel. En la Figura 1 se muestra la curva de nivel representativa de la conversión a los 15 minutos de haberse iniciado la reacción. Como puede observarse, los efectos representativos para este tiempo de reacción resultan ser los efectos principales, con un mayor peso de la temperatura de operación, seguido de la concentración de catalizador.

En cuanto a las influencias cruzadas, la más importante es la influencia doble de ambos efectos, siendo de menor cuantía los efectos cuadráticos de ambas variables de operación. Esto indica claramente que, si bien todas las influencias ejercen un efecto positivo sobre la conversión del sistema de reacción, en realidad las mayores contribuciones resultan ser lineales con respecto a los dos efectos principales. Por tanto, para tiempos cortos de operación conviene trabajar en los máximos niveles estudiados dentro de estos intervalos de operación.

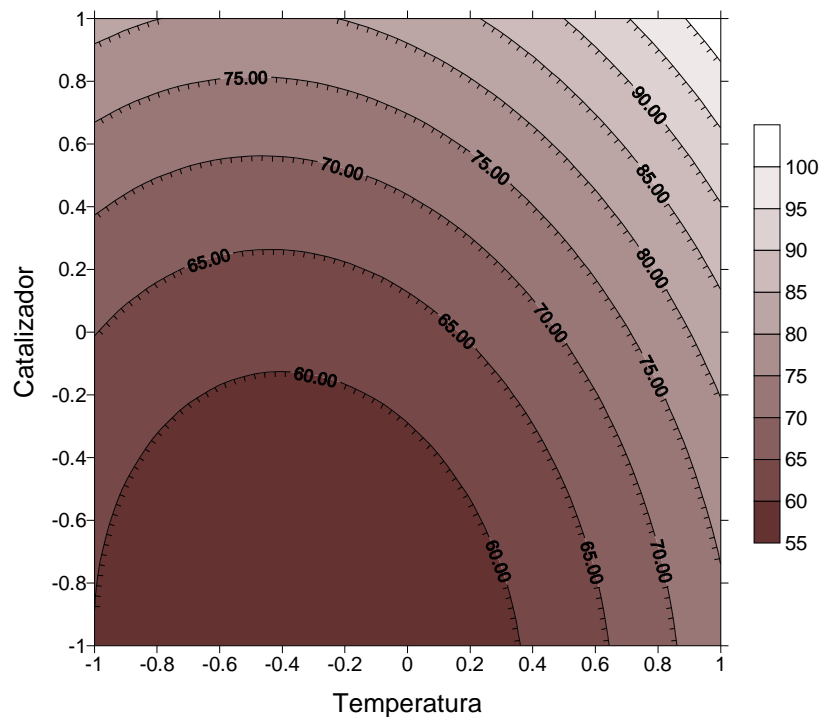


Figura 1. Curvas de nivel para el modelo estadístico a los 15 minutos de reacción.

En el caso del modelo estadístico obtenido para describir la evolución de la conversión a los 30 minutos de haberse iniciado la reacción de esterificación, todas las influencias resultan ser positivas, con la excepción de la influencia doble cruzada temperatura-concentración de catalizador, si bien es esta última la que menor influencia ejerce sobre la conversión en comparación con el resto de los efectos. Como puede observarse en las curvas de nivel para este modelo, que se representa en la Figura 2, de los dos efectos principales, el que mayor influencia ejerce es la concentración de catalizador, al contrario de lo que sucedía para el modelo establecido a los 15 minutos de reacción. Sin embargo, en este segundo modelo se produce un aumento importante de la influencia cuadrática de la temperatura, lo que justifica el gran efecto de curvatura observado en el análisis estadístico del modelo lineal preliminar. También aumenta la influencia del efecto cuadrático de la concentración de catalizador, si bien esta influencia puede considerarse despreciable frente a las de la temperatura.

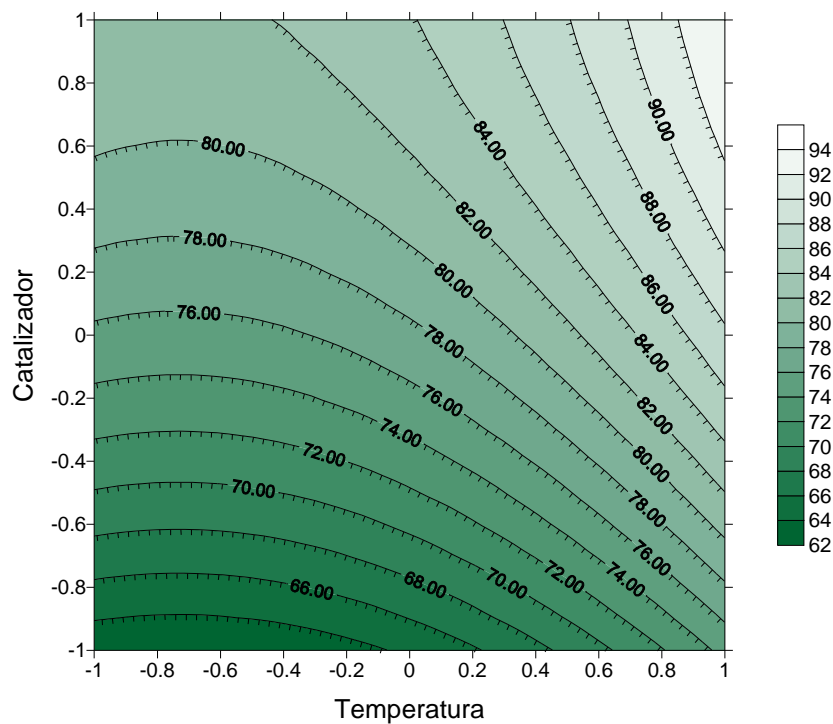


Figura 2. Curvas de nivel para el modelo estadístico a los 30 minutos de reacción.

En el caso del modelo estadístico obtenido para la conversión en éster a los 60 minutos de reacción puede decirse que el comportamiento observado debido a las dos influencias principales y la influencia doble cruzada es muy similar al observado para el modelo obtenido para los 30 minutos de reacción. Sin embargo, si se tienen en cuenta las influencias de los dos efectos cuadráticos se detecta un cambio sustancial, ya que pasan a ser negativas e, incluso, se produce una disminución drástica de la influencia cuadrática de la temperatura en beneficio del aumento de la influencia cuadrática de la concentración de catalizador. En efecto, observando las curvas de nivel representadas en la Figura 3, puede decirse que la influencia de la temperatura no se ve modificada con respecto a los resultados obtenidos a los 30 minutos de reacción. No obstante, si se tiene en cuenta para la concentración de catalizador la mitad superior del intervalo, las diferencias con respecto al comportamiento a los 30 minutos son notorias. Esto es debido a que a partir de la primera hora de reacción se produce un descenso drástico de la velocidad de reacción y, a partir de una concentración crítica de catalizador, es esta la variable que va a influir mayoritariamente en la velocidad de reacción en detrimento de la temperatura de operación.

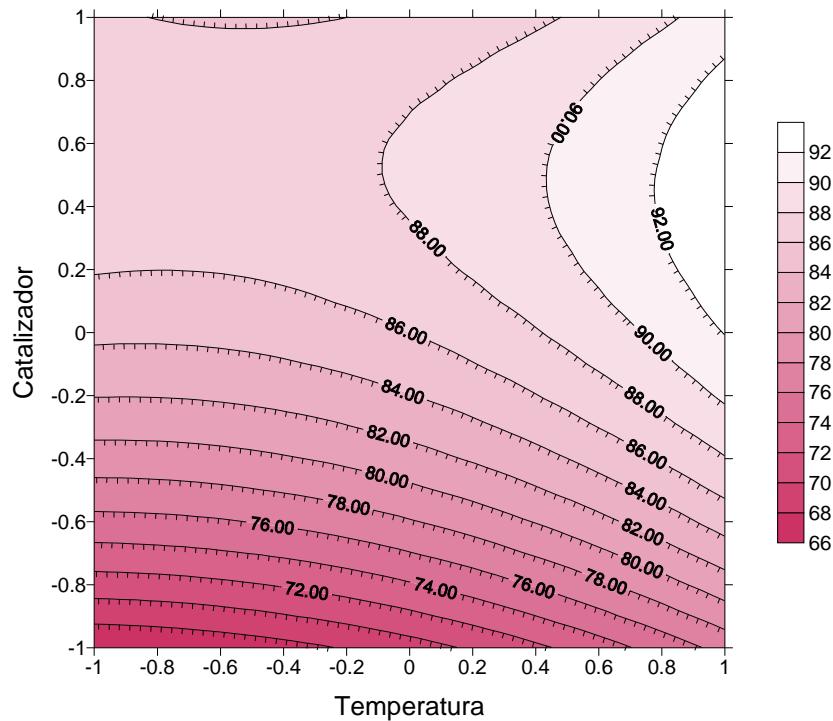


Figura 3. Curvas de nivel para el modelo estadístico a los 60 minutos de reacción

El comportamiento descrito para los 60 minutos de reacción es muy similar al que se observa a las dos horas. En este último caso, las influencias tanto de los efectos principales como de la influencia cruzada prácticamente no se ven modificados. Sólo se aprecia un ligero aumento en la influencia del efecto cuadrático de la concentración de catalizador, aunque ese aumento de la influencia negativa se ve compensado con la disminución de la influencia del efecto cuadrático de la temperatura. Esto puede comprobarse al analizar las curvas de nivel representadas en la Figura 4, y que corresponden al modelo estadístico generado para las dos horas de reacción.

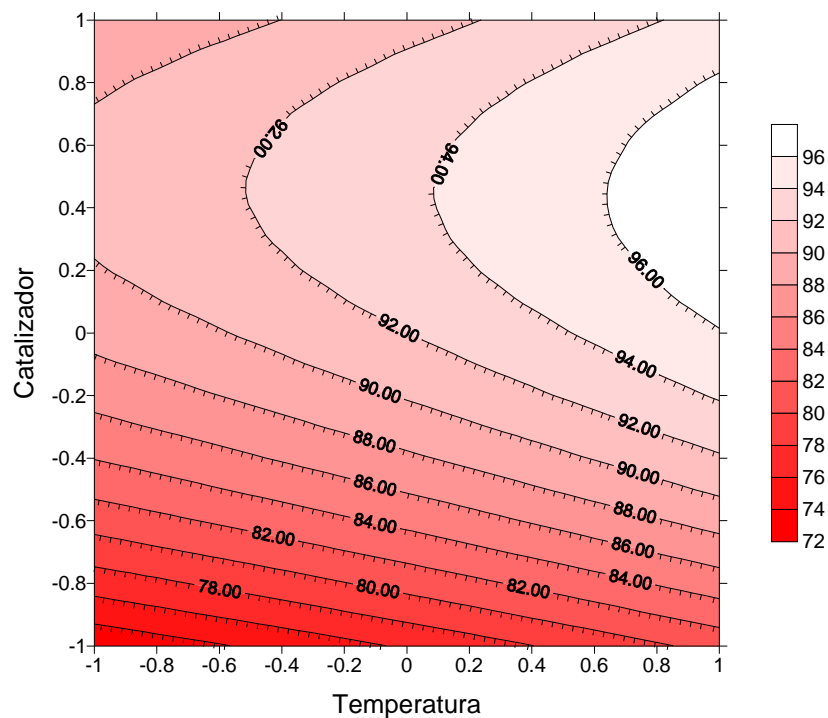


Figura 4. Curvas de nivel para el modelo estadístico a los 120 minutos de reacción.

Una vez realizado el análisis estadístico del sistema de reacción se procedió a determinar los denominados modelos industriales para los cuatro tiempos de reacción estudiados. Para ello se procedió a correlacionar los valores reales de las variables de operación con los valores de conversión obtenidos experimentalmente. En la Tabla 7 se recogen los resultados de los ajustes a modelos polinómicos cuadráticos, realizados mediante regresión no lineal.

Tabla 7. Modelos industriales. Y: conversión de ácido oleico en éster, T: temperatura (°C), W: concentración de catalizador (%).

Tiempo	Modelo industrial	Coef. Corr.
15 min.	$Y=519,23-12,73T-29,16W+0,40TW+0,09T^2+0,42W^2$	r = 0,854
30 min.	$Y=1521,01-39,77T+12,10W-0,20TW+0,27T^2+0,92W^2$	r = 0,858
60 min.	$Y=-184,50+4,93T+41,66W-0,33TW-0,02T^2-2,14W^2$	r = 0,907
120 min.	$Y=-110,26+3,83T+30,79W-0,17TW-0,02T^2-2,78W^2$	r = 0,872

La forma de los modelos obtenidos permiten analizar el sistema mediante el empleo de las denominadas superficies de respuesta. En la Figura 5 se recoge la superficie de respuesta que describe la evolución de la conversión a los 15 minutos de iniciada la reacción.

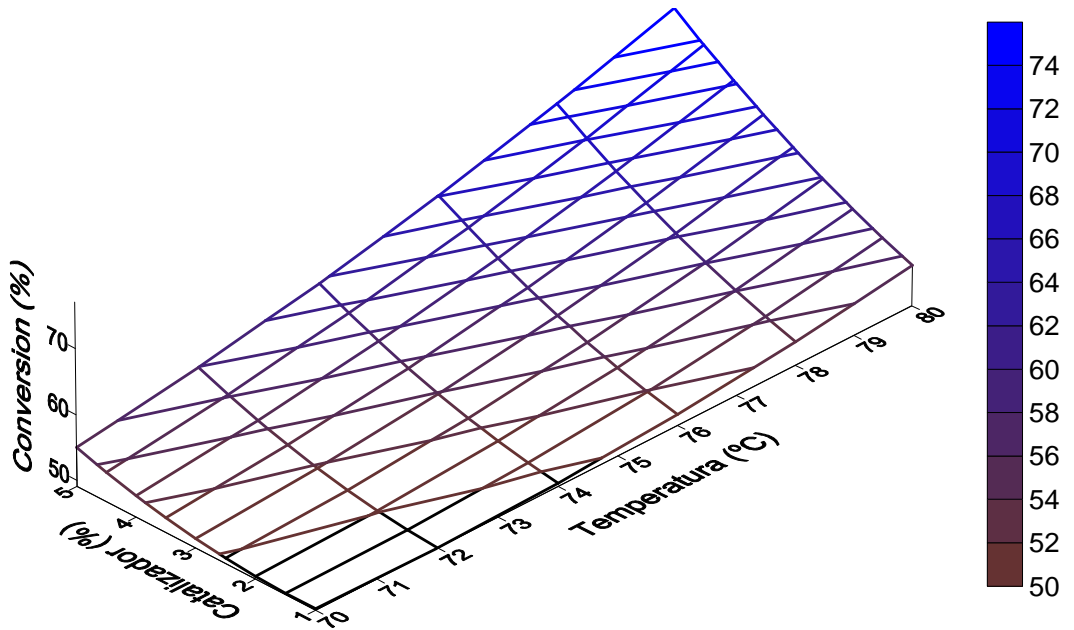


Figura 5. Superficie de respuesta del modelo industrial a los 15 minutos de reacción.

Según muestra la superficie de respuesta, el óptimo de operación a los 15 minutos de reacción se alcanza operando en el máximo nivel de temperatura y de concentración de



lipasa, siendo la conversión obtenida de 74,5%. Asimismo, puede observarse que un incremento de temperatura de 1°C supone un incremento medio de conversión cercano al 2%, mientras que un incremento de 1% en la concentración de catalizador supone un incremento medio de conversión algo inferior al 4%.

En la Figura 6 se recoge la superficie de respuesta correspondiente al modelo industrial para un tiempo de reacción de 30 minutos. La evolución del sistema es análoga a la apreciada en el caso anterior. El óptimo de operación en este caso se consigue trabajando en los máximos niveles posibles para las variables de proceso, obteniéndose conversiones superiores al 90%. Un aumento de la temperatura de 1°C supone un aumento en la conversión del orden del 1,8%, mientras que un aumento de la concentración de catalizador del 1%, mantiene el incremento de la conversión en éster muy próxima al 4 %. Esto confirma que no se aprecian cambios significativos en el comportamiento del sistema, con respecto a la modificación de las variables de operación, durante la primera media hora de reacción.

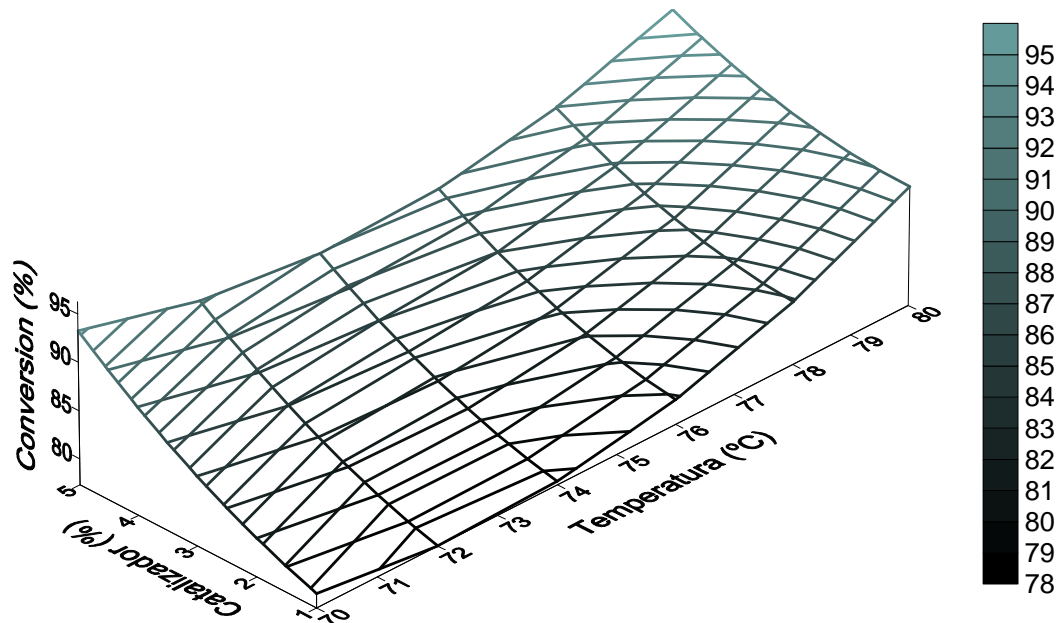


Figura 6. Superficie de respuesta para el modelo industrial a los 30 minutos de reacción.

Al representar el modelo industrial correspondiente a la conversión para la primera hora de reacción se obtiene un valor óptimo para la conversión cercano al 92%. Dicho valor se alcanza para una temperatura de operación de 78°C y una concentración de lipasa inmovilizada correspondiente al 4,2%. Esto puede observarse en la superficie de respuesta correspondiente a la Figura 7. En este caso, un aumento de la temperatura en 1°C, supone un incremento medio en la conversión en éster inferior al 0,5%, mientras que un incremento de 1% en la concentración de catalizador supone un incremento medio en la conversión del orden del 0,6%. Como es evidente para este tiempo de reacción, la influencia ejercida por cualquiera de las dos variables de operación sobre la conversión resulta muy inferior a la apreciada para tiempos cortos. Este comportamiento es típico de sistemas que se encuentran próximos a las condiciones de equilibrio.

En este caso, también se pone de manifiesto que existe un valor umbral para la concentración de catalizador, a partir del cual un aumento resulta ineficaz desde el punto de vista de la producción de éster.

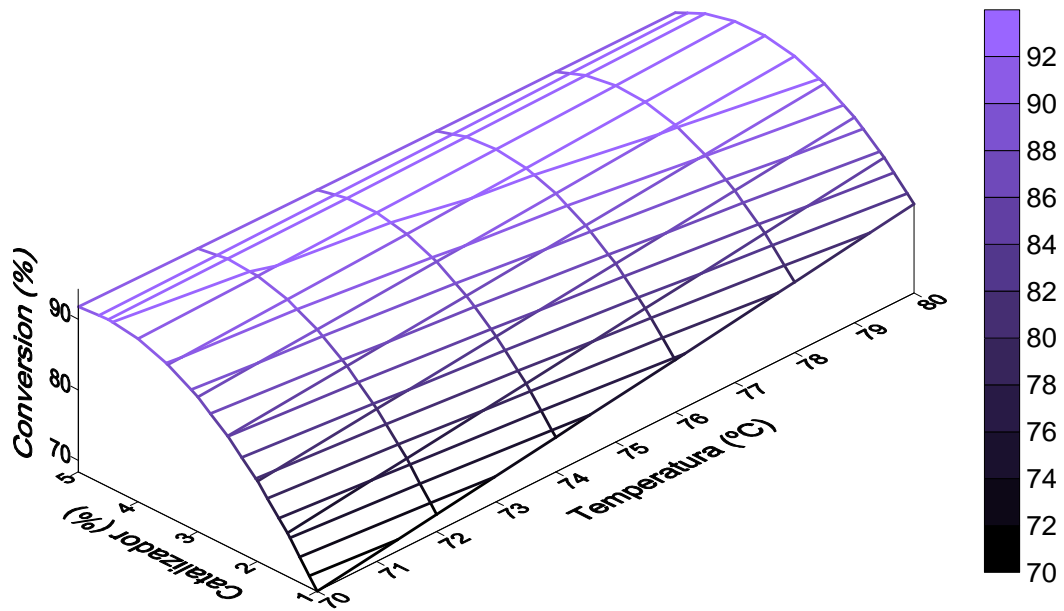


Figura 7. Superficie de respuesta para el modelo industrial a los 60 minutos de reacción.

Por último, si tenemos en cuenta el modelo industrial obtenido para las dos horas de reacción, cuya superficie de respuesta se representa en la Figura 8, podemos concluir que las condiciones de operación óptimas en este caso son de 77,5°C de temperatura y una concentración de catalizador del 4%, alcanzándose una conversión de ácido oleico en oleato de cetilo cercana al 97%. A las dos horas de reacción, el sistema se encuentra muy cercano a las condiciones de equilibrio, por lo que un aumento de la temperatura en 1°C, apenas supone un incremento medio de la conversión del 0,2%. En cuanto a un aumento en la concentración de catalizador no supone cambio alguno en la conversión obtenida.

También en los resultados obtenidos a las dos horas de reacción se pone de manifiesto la existencia de un óptimo para la concentración de catalizador (cercano al 4 - 4,5%), a partir del cual resulta ineficaz aumentar su valor. Por otra parte, aparece un óptimo para la temperatura de operación (cercano a los 78 - 80°C) a partir del cual no sólo no aumenta la conversión sino que comienza a disminuir debido, probablemente, a la aparición de fenómenos de desnaturalización de la lipasa.

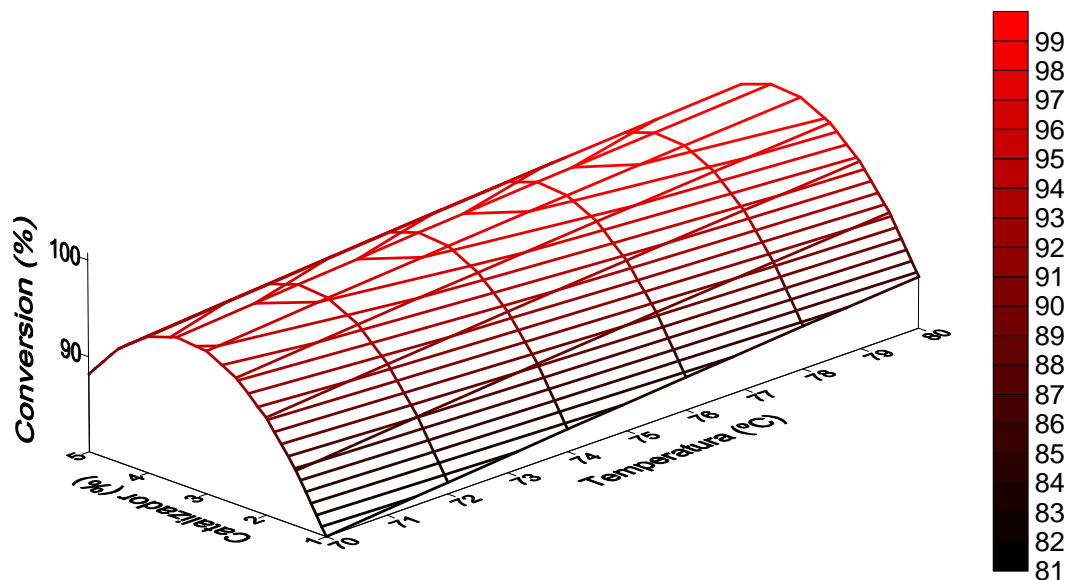


Figura 8. Superficie de respuesta para el modelo industrial a los 120 minutos de reacción

Para finalizar, cabe destacar que en los sistemas de esterificación enzimática resulta más adecuado actuar sobre la temperatura que sobre la concentración de catalizador.

Teniendo en cuenta que las condiciones de temperatura son suaves, normalmente entre 60 y 80°C, resulta bastante económico modificar la temperatura de operación. Por tanto cabe plantearse la posibilidad de aumentar la producción a costa de un mayor coste energético fácilmente asumible desde el punto de vista económico. La única precaución que debe tenerse en cuenta es no forzar el nivel térmico del sistema catalítico que podría comenzar a desnaturalizarse e, incluso, a desactivarse. Este riesgo puede evitarse de manera sencilla si se trabaja a temperaturas inferiores a 80°C.

Por otra parte, no resulta adecuado incrementar la producción a costa de un aumento de la concentración de catalizador. Si se tiene en cuenta que los sistemas biocatalíticos con aplicación industrial para este tipo de reacciones suelen tener unos costes comprendidos entre los 1000 – 1500 euros/kg, dependiendo del grado de especificidad, no resulta viable su aumento. En general, resulta más adecuado trabajar con la concentración de catalizador especificada por los ensayos de actividad realizados por el fabricante o por el departamento de control de calidad.

#### **4. Conclusiones**

A la vista de los resultados obtenidos es posible concluir que la técnica aplicada de diseño factorial de experimentos resulta adecuada para cuantificar la influencia que ejercen las variables de operación, temperatura y concentración de catalizador, sobre el proceso de esterificación enzimática de ácido oleico con alcohol cetílico. Se ha puesto de manifiesto que para tiempos cortos de reacción el sistema se comporta como proceso de esterificación catalítico convencional, es decir que la conversión de la reacción depende mayoritariamente de la temperatura de operación. Sin embargo, a medida que el sistema evoluciona hacia el equilibrio se observa una clara dependencia de la concentración de lipasa presente en el medio.

Por otra parte, los modelos obtenidos permiten cuantificar directamente como afecta la modificación de los parámetros principales de operación sobre la conversión en éster. Esto puede ser de gran ayuda a la hora de optimizar las condiciones de operación, así como a la hora de diseñar los sistemas de instrumentación y control del proceso.

## 5. Bibliografía

- Aracil, J., García, T., García, D. y Martínez M. (1998) “Procedimiento para la obtención de ésteres grasos del ácido diacetiltartárico utilizando biocatalizadores”. *Patente Española EP9800815*
- García, T., Coteron, A., Martínez, M. y Aracil, J. (1995), “Optimization of the enzymatic synthesis of isobutyl palmitate using a central composite design” *Transactions of Institute of Chemical Engineers vol. C*, **73**, pp. 140-144.
- García, T., Coteron, A., Martínez, M. y Aracil, J. (1996), “Kinetics of esterification reactions catalysed by immobilized lipases”. *Chemical Engineering Science* **51**, pp. 2841-2846.
- García, T., Martínez, M. y Aracil, J. (1999), “Enzymatic synthesis of fatty esters”. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, pp. 591-597.
- Halling, P.J. (1994), “Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, test and recommendations for experimental design and analysis”. *Enzyme and Microbial Technoogy*. **16**, pp. 178-206.
- Kuehl, R.O. (2001), “*Diseño de Experimentos*”. Ed. Thomson Learning, pp. 175-208 y 423-453.
- Martínez, M., Soriano, R., Guijarro, M.I., García, T. Y Aracil, J. (2000) “Procedimiento para la Obtención Selectiva de Productos de Alto Valor Añadido a partir de Aceites de Fritura Usados” *Patente internacional WO 01/66679 A2*.
- Rattray, J.B.M. (1984), “Biotechnology and the fats and oil industry. An overview”. *Journal of American Oil Chemical Society* **61**, pp. 1701-1712.
- Roy, S.S. and Bhattacharyya, D.K. (1994), “Distinction between enzymically and chemically catalyzed interesterification”. *Journal of American Oil Chemical Society* **70**, pp. 1293-1294.