

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	Determinación de los parámetros de trabajo de la lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aislada del fruto de la palma aceitera para su uso como biocatalizador en la producción de biodiésel		
SUBTITULO			
AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Perdomo Cabrejo, Jairo Martín		
PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	transesterificación		metilésteres
	lipasa		biodiésel
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		aceite de palma
RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>Se utilizó lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para transesterificación de aceite de palma <i>Elaeis guineensis</i>, utilizando diseños experimentales factoriales para las variables del proceso. El rendimiento molar de la reacción se calculó por cromatografía de gases, análisis de varianza y superficies de respuesta. Se utilizó extracto enzimático (EE) y lipasa parcialmente purificada (LPP), obteniendo el mejor resultado a pH 8, LPP, 5% v/v de agua y 10% v/v hexano aceite, relación estequiométrica 1:140, utilizando aceite de palma RBD a 54°C y agitación de 200 rpm durante 48 horas. Se encontró que la lipasa presenta resistencia a altas concentraciones de metanol y bajas concentraciones de hexano. El rendimiento molar promedio a partir de la optimización del proceso incrementó 16 veces.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE TRABAJO DE LA LIPASA DE
Pseudomonas aeruginosa AISLADA DEL FRUTO DE LA PALMA ACEITERA
PARA SU USO COMO BIOCATALIZADOR EN LA PRODUCCIÓN DE
BIODIÉSEL**

JAIRO MARTÍN PERDOMO CABREJO

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
CHÍA, CUNDINAMARCA**

2012

**DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE TRABAJO DE LA LIPASA DE
Pseudomonas aeruginosa AISLADA DEL FRUTO DE LA PALMA ACEITERA
PARA SU USO COMO BIOCATALIZADOR EN LA PRODUCCIÓN DE
BIODIÉSEL**

JAIRO MARTÍN PERDOMO CABREJO

**Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en diseño y gestión de procesos**

Directores

MSc. Rosa Erlide Prieto Correa

PhD. Luis Eduardo Díaz Barrera

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
CHÍA, CUNDINAMARCA**

2012

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Chía Cundinamarca, 30 de noviembre de 2012

DEDICATORIA

A Dios,

Por darme la vida y permitirme estar aquí en este momento, por sostenerme para nunca desfallecer y por demostrarme día a día su infinita sabiduría y amor.

A mi gordita hermosa,

Isabella, que es mi motor y mi fuerza en este mundo para seguir adelante, dándome lecciones de vida que tan solo un hijo puede enseñar.

A mi mamá,

Por sus infinitas oraciones, por ser el ángel que Dios me dio para conocerlo y saber que confiando en Él, todo se puede.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiar siempre mi camino y darme la oportunidad a través de esta experiencia de crecer en muchos aspectos de mi vida.

A mis padres y hermanas, por toda la paciencia y apoyo durante todos estos años, por sus sabias palabras, enseñanzas, y sobre todo, por ser un ejemplo de vida y mi eje vital, y Andrea, por su paciencia, por su amor incondicional, y por haber sacado de mí las mejores cosas como persona.

A los profesores del énfasis de biosistemas que dejaron una huella imborrable, y en especial mis directores de trabajo de grado, por brindarme todo su apoyo, los medios, conocimientos y confianza para salir adelante con este proceso.

A mis compañeros de cohorte y a mis amigos de La Sabana (Yomaira, Stephania, Johanna y Juan Manuel), por las experiencias vividas y apoyo durante todo este proceso.

Al personal de laboratorios de Ingeniería (Martha, Pilar, Carolina, Jorge y Antonio), por la colaboración y enseñanzas durante todo este tiempo.

A COLCIENCIAS y la Universidad de La Sabana por la financiación del presente trabajo a través del proyecto CARACTERIZACIÓN Y MEJORAMIENTO DE LA ACCIÓN DE LA LIPASA DE *P. aeruginosa* PARA SU UTILIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y OLEOQUÍMICOS (1230-452-21263).

Al personal de PROQUIFAR, DEL LLANO, MANUELITA S.A y en general a todas las personas y entidades que de manera directa o indirecta hicieron esto posible superando los inconvenientes que se presentaron.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. JUSTIFICACION	4
2. OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GENERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. MARCO DE REFERENCIA	8
3.1 BIODIÉSEL	8
3.1.1 Origen y características	8
3.1.2. Alquilésteres	14
3.2 LIPASAS MICROBIALES.....	16
3.2.1 Lipasas	16
3.2.2 Variables en la reacción de transesterificación	20
3.2.2.1 Solubilidad del aceite	21
3.2.2.2 pH	22
3.2.2.3 Cantidad de enzima	23
3.2.2.4 Relación aceite-alcohol	24
3.2.2.5 Fase acuosa	25
3.2.2.6 Fuente de triglicéridos	25
3.2.2.7 Temperatura	26
3.3 Género <i>Pseudomonas</i>	27
3.3.1 Resultados de transesterificación con lipasas del género <i>Pseudomonas</i>	28
3.3.2 Trabajos realizados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29

3.4 Aceite de palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>).....	30
4. METODOLOGIA	35
4.1 REACTIVOS.....	35
4.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
4.1.2 Aceite y reactivos	35
4.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIOFILIZADO Y LA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA	36
4.2.1 Obtención del extracto liofilizado	36
4.2.2 Purificación parcial de la lipasa	39
4.3 CAPACIDAD DE TRANSESTERIFICACIÓN.....	40
4.3.1 Extracto liofilizado	40
4.3.1.1 Pruebas preliminares	40
4.3.1.2 Escala y relación aceite-alcohol	43
4.3.1.3 Concentración de enzima y relación estequiométrica	45
4.3.1.4 Relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción	45
4.3.2 Análisis del efecto de la purificación	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 EXTRACTO LIOFILIZADO Y ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA	48
5.1.1 Obtención del extracto liofilizado	48
5.1.2 Purificación de la lipasa	50
5.2 CAPACIDAD DE TRANSESTERIFICACIÓN.....	53
5.2.1 Extracto liofilizado	53
5.2.1.1 Pruebas preliminares	53
5.2.1.2 Escala y relación aceite-alcohol	66

5.2.1.3 Concentración de enzima y relación estequiométrica	68
5.2.1.4 Relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción	72
5.2.2 Análisis del efecto de la purificación.....	76
5.2.2.1 Análisis de cromatografía de gases	76
5.2.2.2 Análisis de superficies de respuesta	77
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	92
7. CONCLUSIONES	97
8. RECOMENDACIONES	99
BIBLIOGRAFIA	100
ANEXOS	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas productoras de biodiésel en funcionamiento en Colombia.....	13
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del aceite de palma	30
Tabla 3. Información estadística del sector de biodiésel de palma de aceite en Colombia.....	33
Tabla 4. Variables y niveles definidos para el ensayo preliminar.....	41
Tabla 5. Niveles definidos para el ensayo de escala y relación aceite:metanol	43
Tabla 6. Cálculo de peso promedio de metilésteres analizados	44
Tabla 7. Niveles definidos para el ensayo de relación estequiométrica y concentración de extracto	45
Tabla 8. Niveles definidos para el ensayo de relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción.....	45
Tabla 9. Variables y niveles seleccionados para ensayo final	46
Tabla 10. Variables definidas como constantes para el ensayo final	47
Tabla 11. Reporte de análisis de proteína y actividad lipolítica para el proceso de obtención del extracto liofilizado	49
Tabla 12. Resumen de proceso de purificación parcial de la lipasa de <i>P. aeruginosa</i>	51
Tabla 13. Influencia de la temperatura en la producción enzimática de biodiésel.....	56
Tabla 14. Parámetros estimados y error para el ensayo preliminar	57
Tabla 15. Cantidades calculadas de aceite y alcohol para diferentes relaciones estequiométricas en la reacción de transesterificación	68
Tabla 16. Parámetros estimados y error para el ensayo de concentración de extracto y relación estequiométrica	69
Tabla 17. Cálculo del porcentaje de enzima con respecto al aceite presente en el medio de reacción	71
Tabla 18. Cantidades calculadas de aceite y alcohol para las relaciones estequiométricas a probar en la reacción de transesterificación	73
Tabla 19. Parámetros estimados y error para el ensayo de relación estequiométrica aceite-alcohol, adición secuencial y volumen de agua y aceite.....	74
Tabla 20. Parámetros estimados y error para el ensayo final.....	77
Tabla 21. Cálculo de los parámetros estandarizados para graficar el diagrama de Pareto.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de transesterificación consecutiva y reversible de triglicéridos y alcohol.	9
Figura 2. Comparación de diagramas de flujo de los procesos de producción de biodiésel usando álcali (a) y lipasa (b) como catalizador.	11
Figura 3. Distribución del porcentaje de mezcla de biodiésel en el territorio nacional.	14
Figura 4. Actividad hidrolítica de las lipasas.	17
Figura 5. Número de cetano para algunos tipos de Biodiésel.	32
Figura 6. Procedimiento para la obtención del extracto liofilizado.	37
Figura 7. Procedimiento de purificación parcial de la lipasa.	39
Figura 8. Procedimiento utilizando metodología de superficies de respuesta para el análisis de los factores involucrados en la transesterificación de aceite de palma utilizando extracto enzimático como biocatalizador.	42
Figura 9. Gel de SDS-PAGE con muestras al final de la electroforesis.	48
Figura 10. Extracto concentrado por filtración tangencial (1) y extracto concentrado liofilizado reconstituido en búfer PBS pH 8 (2).	50
Figura 11. Cromatograma obtenido de la inyección de extracto concentrado dializado en columna de cromatografía de exclusión molecular.	51
Figura 12. Electroforesis de las señales obtenidas en la muestra de concentrado dializado pasado por columna de exclusión molecular (Fig. 11).	51
Figura 13. Formación de fases en el medio de reacción después de centrifugación de muestras.	54
Figura 14. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de tipo de aceite y pH para el ensayo preliminar.	58
Figura 15. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de tipo de aceite y fase acuosa para el ensayo preliminar.	60
Figura 16. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de pH y fase acuosa para el ensayo preliminar.	61
Figura 17. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de la relación volumen aceite-alcohol y tipo de aceite para el ensayo preliminar.	62
Figura 18. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación volumen aceite-alcohol y pH para el ensayo preliminar.	64

Figura 19. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de temperatura y fase acuosa para el ensayo preliminar	65
Figura 20. Gráfico de barras para la media de respuesta en función de la escala y el tipo de relación aceite:metanol	67
Figura 21. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de Relación estequiométrica y. Concentración	69
Figura 22. Efecto de la concentración y la relación estequiométrica en la reacción.....	70
Figura 23. Efecto de diferentes porcentajes de lipasa con respecto a la cantidad de aceite.....	71
Figura 24. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y cantidad de agua presente en el medio de reacción	75
Figura 25. Diagrama de Pareto para los efectos identificados en el ensayo de optimización.....	79
Figura 26. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de catalizador y pH.....	80
Figura 27. Efecto del pH para cada tipo de enzima (variables codificadas)	81
Figura 28. Comparación entre respuestas de extracto liofilizado (izquierda) y enzima parcialmente purificada (derecha)	82
Figura 29. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y cosolvente	83
Figura 30. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de fase acuosa y catalizador	84
Figura 31. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y catalizador.....	86
Figura 32. Efecto del cosolvente en cada tipo de catalizador (variable codificada)	87
Figura 33. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y catalizador	88
Figura 34. Efecto de la relación estequiométrica en el catalizador (variables codificadas).....	89
Figura 35. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y pH	90

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Parámetros fisicoquímicos aceite de palma crudo (CPO) y aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (RBD).....	113
ANEXO B. Composición de ácidos grasos del aceite crudo de palma.....	114
ANEXO C. Pesos moleculares asumidos y estimados para el cálculo del peso de una mol de aceite de palma.....	115
ANEXO D. Metodología para fermentación en medio líquido.....	116
ANEXO E. Curva de calibración Bradford modificado para microplatos utilizando BSA como estándar con el software MPM 6.0 (BIO-RAD).....	118
ANEXO F. Diseño experimental preliminar. Factorial completo 2^5 con 3 réplicas.....	120
ANEXO G. Diseño factorial 2×2 con tres réplicas para escala y relación aceite-metanol.	124
ANEXO H. Diseño factorial completo 4×3 con 12 tratamientos y 2 réplicas para relación estequiométrica y concentración de enzima.....	126
ANEXO I. Diseño factorial completo 2_{IV}^4 con 2 réplicas, para relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua (variables codificadas).....	128
ANEXO J. Diseño experimental de optimización 2_{V}^{5-1} con cinco puntos centrales.....	130
ANEXO K. Requisitos del biodiésel para mezcla con combustibles diésel. NTC 5444...	132
ANEXO L. Cromatograma de GC obtenido para muestra de ensayo final.....	133
ANEXO M. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de fase acuosa y pH.....	134
ANEXO N. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y fase acuosa.....	135
ANEXO O. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y fase acuosa.....	136
ANEXO P. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y pH.....	137

RESUMEN

Se utilizó una lipasa de *Pseudomona aeruginosa* como catalizador en la transesterificación de aceite de palma *Elaeis guineensis* para la obtención de metilésteres (biodiésel). Se analizaron las variables del proceso de transesterificación a través de metodología de superficie de respuesta para identificar el efecto de estas en el rendimiento molar de la reacción. Se encontró que todas las variables presentan efectos individuales e interacciones significativas de primer orden a excepción de la temperatura, que solo muestra interacciones sin efecto significativo a modo individual. El pH y las cantidades de agua, metanol y hexano como cosolvente son los factores que más inciden en el rendimiento de la reacción utilizando aceite crudo de palma a 54°C. El rendimiento molar de la reacción se hizo con base en el análisis de metilésteres por cromatografía de gases. Los principales metiléster obtenidos fueron palmitato, oleato, linoleato y estearato, los cuales se producen en proporciones similares a la composición del aceite, infiriéndose que la enzima no tiene selectividad frente a un ácido graso específico. Se utilizó extracto enzimático y lipasa parcialmente purificada (factor de purificación 5,73) con una actividad específica de 135 mU/mg, obteniendo el mejor resultado a pH 8 con enzima parcialmente purificada. Se encontró que la lipasa presenta resistencia a altas concentraciones de metanol y trabaja en presencia de hexano a bajas concentraciones como cosolvente. El rendimiento molar promedio a partir de la optimización del proceso fue de 10,47%. Los mejores parámetros con base en los resultados obtenidos en este trabajo después del análisis de las interacciones entre factores fueron enzima parcialmente purificada, 5% de agua y 10% de hexano con relación al volumen de aceite, relación estequiométrica 1:140 y pH 8, utilizando aceite de palma RBD a 54°C y agitación de 200 rpm durante 48 horas.

Palabras clave: transesterificación, lipasa, *Pseudomonas aeruginosa*, metilésteres, biodiésel, aceite de palma

INTRODUCCIÓN

De acuerdo al Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas, la población mundial se ha duplicado tan solo en 50 años, generándose una infinidad de necesidades a nivel mundial, principalmente alimentación, salud y seguridad, propiciando el desarrollo de tecnologías y procesos con alta demanda energética en todos los sectores productivos. La generación de energía actualmente en los países subdesarrollados se basa en la explotación de combustibles fósiles, enfocándose en la industria petrolera, la extracción de gases y la minería. Estas industrias tienen unos impactos ambientales altamente significativos a nivel operativo, al igual que con el uso de los productos obtenidos y el manejo de los subproductos generados.

En consecuencia de estos impactos negativos, la contaminación del medio ambiente se ha convertido a nivel general en una de las mayores preocupaciones en nuestra época. La acción antrópica sobre el planeta durante el siglo pasado ha generado efectos irreversibles, los cuales se han acelerado de manera preocupante durante los últimos cuarenta años.

Las energías alternativas han surgido a raíz de la creciente demanda energética que en la actualidad es satisfecha por tres principales fuentes: hidrocarburos, gas natural y energía nuclear. La actual filosofía de investigación y desarrollo se basa en la naturaleza y su conservación como estrategia de supervivencia para la raza humana, y bajo este enfoque, la consecución de energía a través de ella (aire, agua, sol, biomasa) es el objetivo global y eje del desarrollo hoy en día.

Dentro de esta gama de energías alternativas se encuentran los biocombustibles como una opción frente a los combustibles tradicionales. El biodiésel es un oleoquímico generado a partir de biomasa, derivándose de aquí su nombre. Se obtiene principalmente de cultivos y presenta un alto potencial frente al diésel de petróleo al ser producido a partir de materia

orgánica mezclada con diésel, pirólisis y reacciones químicas de esterificación y transesterificación de triglicéridos (TG) catalizadas principalmente con productos químicos, obteniendo alquilésteres de ácidos grasos. Estos procesos en la actualidad son muy eficientes, pero lamentablemente presentan inconvenientes en lo concerniente al consumo energético para su obtención y los subproductos obtenidos, como por ejemplo la alta carga de álcalis en los efluentes.

A pesar de ser un proceso generado a partir de materias primas renovables, muchos han criticado la denominación del producto final como “bio” por ser este un término ampliamente utilizado en Europa para los productos con cero impactos ambientales. Por esta razón varias corrientes lo han denominado como “agrodiésel”.

Para superar dichos inconvenientes, se presenta el uso de enzimas como una opción en tecnologías de transformación. Estas se producen naturalmente y en la actualidad son ampliamente utilizadas en diferentes industrias. Sin embargo, su uso en la producción de biodiésel se ha visto restringido principalmente por sus elevados costos de obtención, a pesar de las ventajas que presenta en relación a impactos ambientales y simplificación del proceso global en comparación con los catalizadores químicos.

Diferentes autores han basado sus estudios en el aislamiento de microorganismos que presentan actividad lipolítica con el fin de obtener estas lipasas para su aplicación en la industria. Se ha evaluado la actividad enzimática de diferentes tipos de lipasas obtenidas de bacterias y hongos, obteniéndose resultados en algunos casos equiparables a la transesterificación con catálisis química, pero con inconvenientes respecto a obtención de dichas enzimas, estabilidad durante la reacción, tiempos de transesterificación y costos.

La tendencia en esta línea de investigación es el aislamiento de microorganismos con alta capacidad lipolítica, obtención y caracterización de lipasas con alta actividad enzimática y estabilidad, co-expresión de genes en organismos que permitan la producción de lipasas con potencial para su aplicación industrial bajo condiciones más favorables, y

mejoramiento del proceso de obtención y rendimientos en la transesterificación de ácidos grasos a través de bioingeniería.

En la actualidad, la Universidad de la Sabana se encuentra adelantando estudios en este campo a través del proyecto “Caracterización y mejoramiento de la acción de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* para su utilización en la producción de biodiésel y oleoquímicos”, cuyo objetivo es caracterizar y mejorar la expresión de una lipasa obtenida de *P. aeruginosa* aislada directamente de frutos de palma de aceite provenientes de la zona de los Llanos Orientales, para utilizarla como biocatalizador en la producción de biodiésel y otros productos oleoquímicos.

En el presente trabajo se observó el comportamiento de esta lipasa como biocatalizador a través de la transesterificación de aceite de palma con metanol, con el fin de obtener metilésteres y otros productos para la industria oleoquímica. Las propiedades exhibidas por esta lipasa abren la posibilidad de su mejoramiento a través de bioingeniería en aras del diseño de un proceso con beneficios como la reducción de costos en los procesos catalizados con enzimas a través del aumento de los rendimientos y la reutilización del catalizador, facilitar la separación de productos finales y disminuir los impactos ambientales generados por las técnicas empleadas hoy en día.

1. JUSTIFICACION

Debido a las limitadas reservas de energía y a la presión ambiental generada por los gases de invernadero provenientes de los combustibles fósiles, el biodiésel es un eje temático en las agendas políticas de los países a nivel mundial (Jegannathan *et al.*, 2008) .

La producción de biodiésel se ha fortalecido en Colombia a partir del cultivo de la palma aceitera *Elaeis guineensis*, también conocida como palma africana (Consortio CUE, 2012). El proceso de transesterificación que más ampliamente se utiliza en la industria emplea hidróxidos como catalizador, presentando inconvenientes en las fases finales del proceso debido a la dificultad en la separación de los productos finales y la eliminación de residuos con altos contenidos de álcalis.

Actualmente en el país se encuentran siete plantas de producción de biodiésel en funcionamiento (Ministerio de Minas y Energía. República de Colombia, 2012). Estas plantas tienen como proceso base la transesterificación con álcalis, teniendo los problemas típicos por el uso de este tipo de catalizador, como por ejemplo formación de jabones, difícil separación de los metilésteres y glicerol, alcohol y aceite sin reaccionar, uso de grandes volúmenes de agua para las operaciones precedentes de separación, alta carga de álcalis y otros contaminantes en los efluentes del proceso, y utilización de energía al necesitar elevadas temperaturas de reacción y procesos adicionales de separación (T. Tan *et al.*, 2010)

El desarrollo de las tecnologías de obtención de enzimas y el mejoramiento de los procesos de transesterificación son los ejes de investigación en esta área, enfocándose a las dificultades relacionadas con disponibilidad de enzimas, conservación o recuperación de su

actividad a través las diferentes operaciones de obtención, purificación y aplicación, los costos de producción y los rendimientos al final de la reacción.

Las lipasas presentan ventajas en el proceso de transesterificación frente a la catálisis obtenida por álcalis y ácidos, como por ejemplo la reducción de impactos ambientales, la disminución del consumo de agua al no ser necesaria la remoción de residuos ácidos o básicos, la facilidad de la separación del glicerol y los metilésteres, la eliminación de procesos de saponificación típicos en las reacciones con hidróxidos, y la total transesterificación de ácidos grasos libres (Akoh *et al.*, 2007).

Cada enzima tiene unas condiciones únicas y específicas para su uso como biocatalizador, las cuales deben ser estudiadas para cada caso de manera individual. La purificación y el proceso de transesterificación son puntos críticos en donde se puede direccionar la enzima hacia la catálisis deseada a través de las diferentes variables involucradas (Murray, 2010).

Al desarrollar un proceso enzimático para la transesterificación del aceite de palma se fortalece el sector de los biocombustibles al conservar el ambiente a través de procesos amigables con menores impactos ambientales y con mayor facilidad de separación de los productos de reacción, reduciendo el impacto sobre las fuentes de agua con efluentes a altas temperaturas y cargas contaminantes, y a su vez, garantizando la comercialización de la producción de los cultivos, beneficiando áreas rurales y sectores sensibles de la sociedad.

Adicional a esto, se lograría incentivar la investigación en productos oleoquímicos y el desarrollo de la ingeniería de enzimas y la industria oleoquímica a nivel Nacional al tener una alternativa de producción de biodiésel más limpia, aumentando la oferta de biodiésel en el mercado global de biocombustibles, y a su vez, ofreciendo a la nación una alternativa para cumplir con la legislación actual concerniente a la mezcla del 7% de biodiésel con ACPM (B7) para disminuir la concentración de gases contaminantes (Resolución 181012 del 28 de junio de 2012).

Dentro de este marco y bajo la necesidad de un plan nacional de investigación en biocombustibles como lo plantea el documento CONPES 203510, es imperativo el desarrollo de la industria oleoquímica enfocándose hacia el mejoramiento de los procesos de obtención de biodiésel para reducir costos, aumentar la cantidad y calidad del biodiésel obtenido, y reducir los impactos ambientales generados en el proceso (Consejo Nacional de Política Económica y Social, 2008).

El presente trabajo busca sentar las bases para el desarrollo de un proceso enzimático para la obtención de biodiésel catalizado a través de una lipasa obtenida de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada del fruto de la palma de aceite, determinando los principales parámetros de trabajo de esta enzima para el proceso de transesterificación y evaluar la necesidad de su purificación

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los principales parámetros para la reacción de transesterificación con la lipasa parcialmente purificada y extracto enzimático de *P. aeruginosa* aislada del fruto de palma aceitera como biocatalizador para producción de biodiésel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los factores significativos para definir los principales parámetros de trabajo que permitan el uso del extracto enzimático como biocatalizador en la reacción de transesterificación.
2. Determinar el efecto de la purificación de la lipasa evaluando la reacción de transesterificación, cuantificando los metilésteres obtenidos a través de cromatografía de gases, con los parámetros establecidos previamente para el extracto enzimático.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 BIODIÉSEL

3.1.1 Origen y características Desde los principios de los motores diésel se ha utilizado aceites vegetales para mezclar y utilizar como biodiésel. En 1911 Rudolph Diésel fue el primero que utilizó una mezcla de aceite de maní y cacahuete en un motor. Desde entonces, el uso de aceites y grasas animales y vegetales presenta problemas como la alta viscosidad del combustible obtenido, baja capacidad calorífica, espesamiento o gelificación del aceite lubricante, alta oxidación y baja volatilidad que genera combustiones incompletas y residuos de carbono en los motores (Akoh *et al.*, 2007). Se han utilizado algunos procedimientos para contrarrestar estos problemas en los aceites, buscando incrementar la volatilidad y disminuir la viscosidad, teniendo en cuenta que la viscosidad depende de la composición de ácidos grasos (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Akoh *et al.*, 2007).

También se ha utilizado aceites usados, en cuyo caso la materia prima es económica y además se genera valor agregado a partir de un subproducto que es considerado como residuo, tratando de reducir el costo final del biodiésel, ya que este en la actualidad es mayor al del diésel de petróleo (Abbaszaadeh *et al.*, 2012). Esta fuente de biodiésel ha generado un alto impacto en sistemas de tratamientos de agua y en el reciclaje de recursos, sin embargo es un área de investigación muy reciente y está lejos de ser la solución a las necesidades energéticas actuales (Mekhilef, 2011).

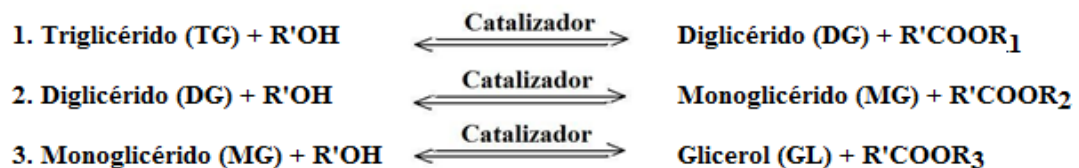
En la actualidad existen diversos procesos industriales para la obtención de biodiésel. A continuación se presentan los más utilizados.

1. Microemulsificación. Una microemulsión es una dispersión coloidal de microestructuras de un fluido isotrópico, con un tamaño alrededor de 1 a 150 nm, formadas espontáneamente por dos líquidos inmiscibles entre sí con la ayuda de una sustancia anfifílica. Normalmente este tipo de biodiésel es una mezcla de aceite y un solvente orgánico (alcohol) con la ayuda de un surfactante, a través de la cual se logra la reducción de la viscosidad del aceite (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

2. Pirólisis. Se basa en la conversión de una sustancia orgánica en otra a través de calor, algunas veces con la ayuda de un catalizador. La descomposición de los triglicéridos de aceites vegetales y grasas animales a través del rompimiento térmico es un proceso muy similar al proceso de obtención del diésel de petróleo (cracking) y genera productos con características muy similares. Sin embargo, los equipos y el costo energético son muy elevados (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

3. Transesterificación. Es la tecnología más común para la obtención de biodiésel, teniendo como producto de la reacción alquilésteres y glicerol (Fig. 1). Es también conocida como alcoholísis y es un proceso análogo a la hidrólisis, pero se utiliza un alcohol en vez de agua (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

De acuerdo al tipo de catalizador o al proceso como tal se encuentran diferentes tecnologías.



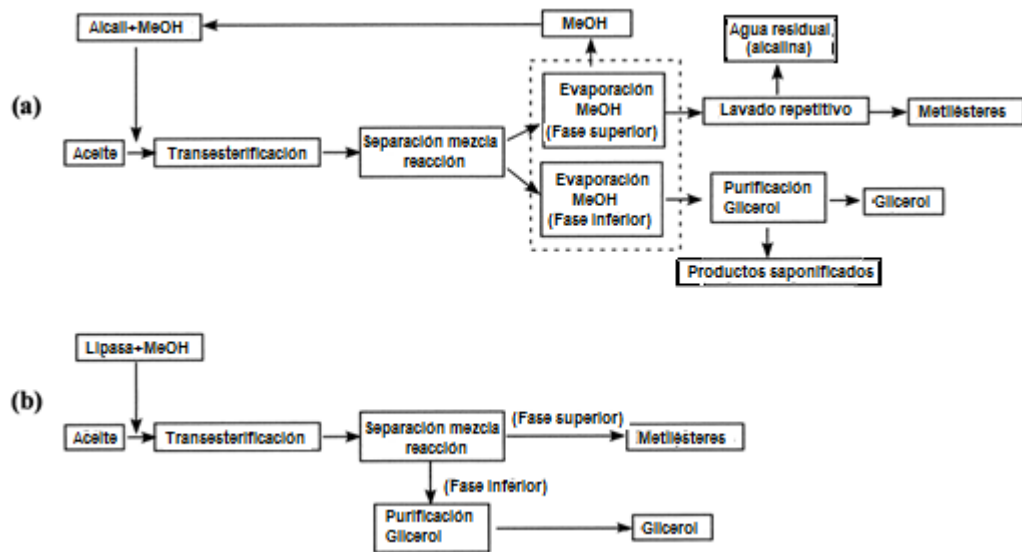
Fuente: Fukuda 2001 (Adaptación)

Figura 1. Reacción de transesterificación consecutiva y reversible de triglicéridos y alcohol. R', R₁, R₂ y R₃ representan grupos alquilo.

- Proceso con bases. Se utiliza como catalizador hidróxido de sodio ó hidróxido de potasio, siendo el proceso industrial más difundido gracias al bajo costo del catalizador. Sin embargo, presenta problemas como la formación de jabones, la separación de los alquilésteres y el glicerol resulta dispendiosa y se deben retirar las trazas de catalizador en los ésteres para cumplir los parámetros de calidad establecidos. Se utilizan relaciones estequiométricas en exceso en una relación 6:1 moles de alcohol:aceite para aumentar la producción de alquilésteres, teniendo una reacción completa en pocas horas a temperaturas entre 40°C y 65°C. Los reactivos deben ser anhídridos tanto para evitar formación de jabones como la hidrólisis de ácidos grasos, y aumentar la producción de esterres (Fukuda *et al.*, 2001).
- Proceso con ácidos. Consiste en hacer una esterificación ácida a través de la protonación del ácido graso para generar un ión oxianiónico que reacciona con el alcohol (Demirbas, 2009). Se usa generalmente para aceites con alto índice de acidez (Fukuda *et al.*, 2001). Son necesarias relaciones estequiométricas alrededor de 30:1 moles de alcohol:aceite y temperaturas entre 55°C y 80°C para obtener rendimientos del 99% en 50 horas (Marchetti, 2011).
- Procesos supercríticos. Se generan presiones elevadas en las que el aceite y el alcohol reaccionan sin necesidad que un agente externo (catalizador) actúe en la reacción. De acuerdo a estudios realizados por Demirbas (2005), el consumo energético se reduce en comparación a la catálisis con bases, además que el proceso de purificación es mucho más sencillo al no tener catalizador, lo cual puede significar una reducción de costos alrededor del 20%.
- Procesos enzimáticos. En la actualidad se están investigando diferentes lipasas intracelulares y extracelulares, que puedan servir como aceleradores de la reacción entre aceite-alcohol (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Fukuda *et al.*, 2001). Este tipo de catalizadores presentan ventajas frente a los catalizadores ácidos y alcalinos como son la recuperación del glicerol, no hay necesidad de retirar la alta acidez o

alcalinidad del producto, el tratamiento de la carga química de las aguas utilizadas es bajo, la incidencia de ácidos grasos libres es nula, el agua en la reacción no genera saponificación, los procesos de separación de productos son más simples que con el uso de álcalis (Fig. 2) y adicionalmente, todos los ácidos grasos libres son convertidos a metilésteres. Los alcoholes más utilizados para producción de ésteres catalizados con lipasas son metanol, etanol y butanol.

Lipasas obtenidas a partir de *Candida rugosa* han arrojado rendimientos de ésteres del 97% (Linko, 1998) y en reacciones con lipasas de *Mucor miehei* se obtuvieron rendimientos de hasta el 99,2% (De, 1999). Sin embargo, los costos de obtención y tiempos de reacción siguen siendo altos comparados con los álcalis y ácidos.



Fuente: Fukuda, 2001 (Adaptación)

Figura 2. Comparación de diagramas de flujo de los procesos de producción de biodiésel usando álcali (a) y lipasa (b) como catalizador.

- Método de reacción ultrasónica. Las ondas ultrasónicas causan que la mezcla aceite-alcohol produzca y colapse burbujas constantemente. Esta cavitación proporciona

simultáneamente la mezcla y el calor necesarios para llevar a cabo el proceso de transesterificación. Así, utilizando un reactor ultrasónico para la producción del biodiésel, se reduce drásticamente el tiempo de proceso y separación, temperatura y energía necesaria para la reacción. De ahí que el proceso de transesterificación puede correr en línea en lugar de utilizar el lento método de procesamiento por lotes. Los dispositivos ultrasónicos de escala industrial permiten el procesamiento de varios miles de barriles por día. Sin embargo, es una tecnología sumamente costosa en la actualidad (Mazo *et al.*, 2011) .

- Método de microondas. Usando microondas se puede reducir significativamente los tiempos de reacción y a la vez se pueden aumentar los rendimientos. Las microondas trabajan al mínimo nivel de las moléculas e iones del alcohol, generando incrementos de temperatura muy rápidos que ayudan al trabajo del catalizador. Sin embargo, la síntesis por microondas es difícilmente escalable, además que la penetración de las microondas en materiales absorbentes no es muy profunda y la seguridad de los reactores es muy difícil de manejar (Mazo *et al.*, 2011) .

En Colombia la legislación que regula la producción y la calidad del biodiésel está centrada en el Decreto 2629 de 2007 y las resoluciones 181780 de 2005 y 182087 de 2007, estableciendo los criterios de calidad de los biocombustibles para su uso en motores diésel como componente de la mezcla con el combustible diésel de origen fósil en procesos de combustión. Así mismo, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC (2006) emitió la norma técnica NTC 5444 en donde establece las especificaciones para los alquilésteres de ácidos grasos para uso como combustibles ó como componente de mezclas con combustibles diésel.

La producción de biodiésel en el país ha tenido un gran auge en la última década. El gobierno nacional ha incentivado el cultivo de palma aceitera y la transformación del aceite

como uno de los sectores con mayor dinámica dentro las agrocadenas estratégicas para el aprovechamiento de los tratados comerciales con otros países.

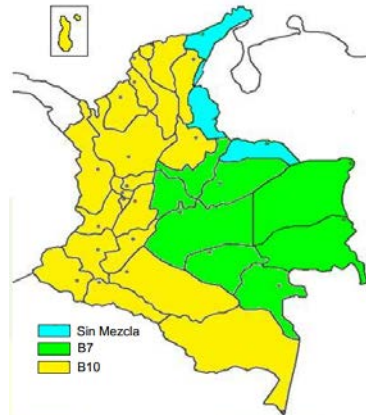
El Ministerio de Minas y Energía (2012) afirma que existen siete plantas en el país al incluir la planta “Biodiésel de la Costa S.A.S”, que tiene una participación menor al 1% de la producción nacional. Sin embargo FEDEBIOCOMBUSTIBLES (2012) afirma que actualmente en el país se encuentran seis plantas de producción en operación (Tabla 1), las cuales representan una capacidad de producción instalada de 506.000 toneladas anuales, y a la fecha se tienen alrededor de 21 proyectos de plantas a lo largo del país.

Tabla 1. Plantas productoras de biodiésel en funcionamiento en Colombia

Región	Empresa	Capacidad (Ton/año)	Capacidad (L/día)	Empleos directos	Empleos indirectos	Fecha de entrada en operación
Norte, Codazzi	Oleoflores	70.000	169.000	3.300	6.600	Enero 2008
Norte, Santa Marta	OdinEnergy	36.000	121.000	1.700	3.400	Junio 2008
Norte, Santa Marta	Biocombustibles sostenibles del Caribe	100.000	337.000	4.757	9.514	Marzo 2009
Oriental, Facatativá	Bio D	100.000	337.000	4.757	9.514	Febrero 2009
Central, Barrancabermeja	Ecodiésel de Colombia	100.000	337.000	4.757	9.514	Junio 2010
Oriental, San Carlos de Guaroa	Aceites Manuelita	100.000	337.000	4.757	9.514	Julio 2009
TOTAL		506.000	1.638.000	24.028	48.056	

Fuente: FEDEBIOCOMBUSTIBLES 2012

Para el año 2012 la mezcla obligatoria de biodiésel-diésel a nivel nacional se encuentra establecida entre 7% y 10% (B7 a B10). Sin embargo, en más del 50% del territorio nacional los distribuidores están manejando actualmente mezclas del 10% (Fig. 3).



Fuente: MINMINAS 2012

Figura 3. Distribución del porcentaje de mezcla de biodiésel en el territorio nacional.

3.1.2. Alquilésteres La transesterificación es el proceso de intercambio de grupos alquilo entre un éster y un ácido (acidólisis), entre un éster y otro éster (interesterificación), ó entre un éster y un alcohol (alcohólisis) (Akoh *et al.*, 2002)

El metanol es más reactivo y más volátil para alcohólisis en comparación con el etanol. El principal papel del metanol es reducir la viscosidad de los ácidos grasos y aumentar la volatilidad de los ésteres en la combustión de los motores diésel, pero tiene el inconveniente de su alta toxicidad. Por esta razón, el etanol es más ampliamente utilizado como reactante, además que es obtenido también de cultivos. Otros aceptores de grupos alquilo utilizados para la reacción de alcohólisis son el propanol, isopropanol, butanol, algunos alcoholes secundarios, tertbutanol y octanol (Akoh *et al.*, 2007).

La transesterificación parece ser la forma más sencilla y la mejor ruta para producir biodiésel en grandes volúmenes con las características más cercanas al diésel fósil, generando mínimos depósitos de carbono después de la combustión en este tipo de motores (Akoh *et al.*, 2007).

De acuerdo a las Normas Técnicas Colombianas NTC 5444 (2006) y NTC 1438 (2011), el biodiésel es un combustible compuesto de una mezcla de mono-alquilésteres obtenido de una cadena larga de ácidos grasos derivados de aceites vegetales o grasas animales. Cuando se usa metanol se obtienen metilésteres de ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Esters – FAMES). Al ser producido a partir de grasas orgánicas, es considerado como un combustible renovable y tiene un ciclo de vida cerrado (Van Gerpen, 2005).

La principal diferencia molecular entre los metilésteres y el diésel de petróleo es la presencia de un porcentaje cercano al 10% de oxígeno. Adicionalmente, dentro de sus características fisicoquímicas son de resaltar las siguientes (Perancho, 2011):

- Es líquido a temperatura ambiente
- Su color puede variar de dorado a marrón oscuro dependiendo de la fuente de triglicéridos utilizada
- Presenta una temperatura de ebullición elevada similar al diésel y una baja presión de vapor
- Su flashpoint (alrededor de los 423 K) es mucho mayor que en el diésel, lo cual dificulta su inflamación, siendo esta una característica beneficiosa contra chispas imprevistas
- Mayor número de cetano que el diésel de petróleo (alrededor de 60) debido a la poca presencia de compuestos aromáticos y la mayor longitud de la cadena, lo cual disminuye el ruido del motor y mejora el encendido
- Posee mayores características de lubricidad que el diésel de petróleo, generando menos partículas de desgaste

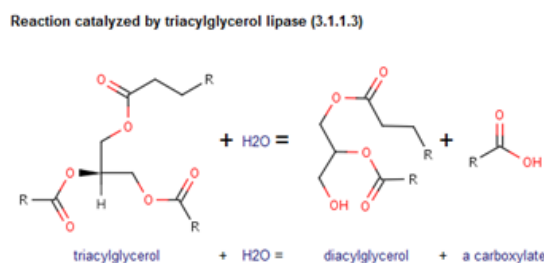
- Uno de los mayores problemas del biodiésel es su comportamiento a bajas temperaturas debido a su punto de solidificación (-15°C) y su alta viscosidad, características que generan pérdidas en el flujo, mayor estrés en los componentes del motor y la atomización en la cámara de combustión es menor
- Otra desventaja es que al ser un compuesto orgánico puede absorber hasta 40 veces más agua que el diésel, lo cual genera oxidación de los elementos del sistema de inyección, aumenta la conductividad eléctrica del combustible y puede crear un medio de crecimiento para microorganismos, lo cual genera taponamientos, corrosión y lodos.

Los métodos más comunes para la identificación y análisis de alquilesteres son cromatografía de gases (Gas Chromatography - GC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (HPLC), GC acoplado a masas, HPLC con ionización química y espectrometría de masas. Los análisis de calidad a través de estas técnicas involucran la medición del contenido residual de triglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, glicerol, y alcohol.

3.2 LIPASAS MICROBIALES

3.2.1 Lipasas Las lipasas, cuya denominación bioquímica es acil-éster-hidrolasas se encuentran clasificadas dentro de la familia de las hidrolasas como EC 3.1.1.3 (Swiss Institute of Bioinformatics). Son enzimas altamente específicas en su actividad catalítica y algunas de ellas se distinguen por su alta estereoespecificidad (esterificación, interesterificación, lisis de ácidos, alcoholes y grupos amino), lo cual las hace muy deseables en la industria oleoquímica (Gupta *et al.*, 2004). Como todas las enzimas, tienen una forma específica tridimensional en medio acuoso, con grupos polares expuestos y grupos no polares ocultos (Akoh *et al.*, 2007).

Las lipasas son parte de la familia de hidrolasas que actúan en los enlaces carboxílicos (Fig. 4). La función fisiológica de las lipasas es hidrolizar triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Sin embargo, naturalmente también hidrolizan una amplia variedad de compuestos hidrofóbicos diferentes (Stamatis, 1999). Por su función natural de hidrólisis de enlaces carboxílicos, pueden catalizar también esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos. A su vez, gracias a su versatilidad, tienen un gran potencial para su uso industrial en alimentos, detergentes, industria farmacéutica, curtiembres, textiles, cosméticos y la industria del papel (Hasan *et al.*, 2006).



Fuente: <http://www.brenda-enzymes.org/Mol/reaction-popup.php?id=3.1.1.3>

Figura 4. Actividad hidrolítica de las lipasas. El triglicérido es atacado por la lipasa en los enlaces carboxílicos realizando la lisis de dichos ácidos en presencia de agua

Las reacciones de las lipasas son complejas al ser solubles en medios acuosos y actuar sobre lípidos no solubles en agua. La necesidad de la lipasa de un medio acuoso para mantener su actividad y la inmiscibilidad de los lípidos en el agua hace que se forme un medio heterogéneo el cual da origen a una interfase líquido-líquido. Es en esta interfase en la que la lipasa puede acceder al sustrato y llevar a cabo la reacción. La actividad de la lipasa está influenciada por la naturaleza de la interfase, sus propiedades y el área interfacial formada (Akoh *et al.*, 2007).

La acumulación de los productos de la reacción en la interfase reduce la presión interfacial, originando una superficie con alta energía que desnaturaliza las moléculas de la enzima. Este efecto es bien tolerado por las lipasas (Akoh *et al.*, 2007).

Un aspecto importante de las enzimas lipolíticas es el carácter físico-químico único de las reacciones que catalizan en la interfase lípido-agua a través de la adsorción interfacial y la subsiguiente catálisis. Debido a esta heterogeneidad, es difícil cuantificar con exactitud la cantidad de la interfase (superficie específica), así como los parámetros tales como la tensión interfacial, la viscosidad de superficie, el potencial de superficie, etc. Los procesos lipolíticos dependen de la calidad de la interfase del sustrato.

Las lipasas están clasificadas dentro del grupo de las hidrolasas, por tanto presentan actividad hidrolítica y sintética (Murray, 2010). Al tener actividad sintética, las reacciones de hidrólisis pueden ser reversibles, lo cual no es deseable en las reacciones de transesterificación.

En general, las enzimas presentan como beneficios su alta especificidad, fácil manejo y la reducción de residuos. Al realizar una buena elección de la enzima se controlan los productos generados y las reacciones paralelas se reducen. Las enzimas obtenidas de microorganismos son más útiles que aquellas obtenidas a partir de plantas o animales debido a su gran variedad de actividades catalíticas disponibles, mayores rendimientos, facilidad para su manipulación genética, disponibilidad sin tener que esperar largos tiempos de producción y su rápido crecimiento en medios de cultivo relativamente económicos. Las enzimas de microorganismos además son más estables y su producción es más cómoda y segura (Hasan *et al.*, 2006).

Algunos microorganismos identificados como fuente de lipasas son: *Aspergillus niger*, *Bacillus thermoleovorans*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Oospora lactis*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium roqueforti*,

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus boreas*, *Rhizopus thermosus*, *Rhizopus usarii*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus fusiformis*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus japonicus* NR400, *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Rhizopus stolonifer* NRRL 1478, *Rhodotorula rubra*, y *Staphylococcus hyicus* (Akoh *et al.*, 2007).

Los bacilos han sido identificados como especies que producen una gran cantidad de enzimas, además de lipasas, que pueden ser utilizadas a nivel industrial. La presencia de lipasas en bacilos ha sido estudiada desde 1901, siendo hoy en día *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* las bacterias más estudiadas. Sin embargo, la baja estabilidad de muchas lipasas a altas temperaturas y pH extremos limita su utilidad ya que los procesos pueden requerir el uso de temperaturas elevadas o utilización de solventes para disociar los sustratos (Hasan *et al.*, 2006).

Solo cerca del 2% de los microorganismos conocidos han sido probados como fuente de enzimas. De estos, las bacterias generalmente son más utilizadas debido a que ofrecen mayores actividades que las levaduras, además que tienden a tener pH neutro o alcalino y son termoestables. Se han identificado una gran cantidad de enzimas con diferentes especificidades de sustrato, pero son muy pocas las enzimas que han sido obtenidas en su forma pura, y tan solo de un número aún mucho menor de estas últimas se conoce su estructura y función (Hasan *et al.*, 2006).

Dentro de las características deseables de una lipasa están: a) la habilidad de utilizar tanto mono, di y triglicéridos, y ácidos grasos libres en la transesterificación, b) baja inhibición de productos, c) alta actividad y rendimientos en medios no acuosos, d) cortos tiempos de reacción, e) recuperación de la lipasa inmovilizada, e) resistencia a la temperatura y al alcohol (Akoh *et al.*, 2007).

La mayor parte de investigaciones se centran en la producción de alquilésteres a través de reacciones químicas, y una pequeña parte de las investigaciones se enfoca en la obtención de alquilésteres a través de reacciones catalizadas con enzimas, en especial con lipasas como biocatalizadores (Akoh *et al.*, 2002).

La producción de biodiésel a partir de aceite de palma durante los últimos veinte años se ha convertido en una industria fuerte a nivel Nacional gracias a las políticas desarrolladas en torno a los biocombustibles. De esta industria se genera una amplia gama de posibilidades de desarrollo e investigación, dentro de las cuales se encuentra el aislamiento de enzimas obtenidas a partir de microorganismos y hongos. Estudios realizados en aceite de colza han demostrado que los procesos para purificación de los productos por transesterificación enzimática son mucho más sencillos que aquellos procedimientos utilizados en los procesos catalizados por hidróxidos (Fig. 2), y pueden llegar a reducir a la mitad el consumo de vapor y energía (Harding *et al.*, 2008).

3.2.2 Variables en la reacción de transesterificación Las tendencias actuales apuntan hacia el estudio del potencial y el mejoramiento de las enzimas, específicamente las lipasas, para la producción de alquilésteres. El mejoramiento potencial de la actividad y eficiencia de las enzimas a través de la inmovilización, la regeneración de las mismas, el uso de células, ingeniería genética, y la producción de lipasas recombinantes en grandes cantidades con la expectativa de reducir los costos de producción de biodiésel a través de la transesterificación catalizada por enzimas (Akoh *et al.*, 2007).

Por su parte, la investigación de las reacciones de transesterificación está enfocada en identificar las mejores fuentes de enzimas, optimización de las condiciones de la reacción (relaciones estequiométricas, pertinencia del uso de solventes, temperatura, contenido de agua, contenido de ácidos grasos libres, porcentaje de conversión, migración de grupos alquilo y flujos en reactores de lecho empacado) para aumentar los rendimientos y llegar a

hacerlos comparables con los del proceso utilizando bases, pero sobre todo, para poder escalar estos procesos a nivel industrial (Akoh *et al.*, 2007)

A continuación se nombran algunas de las variables más relevantes para llevar a cabo la transesterificación de ácidos grasos a través de lipasas.

3.2.2.1 Solubilidad del aceite Las lipasas necesitan una interfase acuosa para poder realizar su función como catalizador sobre medios hidrofóbicos. Esto presenta dos ventajas principales: se pueden utilizar solventes orgánicos con bajo contenido de agua para solubilizar los sustratos hidrofóbicos y, los bajos niveles de agua generan un cambio en el equilibrio termodinámico entre las reacciones de condensación/hidrólisis hacia la obtención de productos de interés (Stamatis, 1999).

En el caso de la transesterificación, se busca que el medio de reacción en el cual actuará la lipasa tenga características de micelas inversas que se forman en emulsiones agua-aceite, con la ayuda de un surfactante. Los surfactantes son moléculas anfifílicas que tienen partes hidrofílicas e hidrofóbicas. Estos pueden ser naturales, como por ejemplo los lípidos que forman membranas, o pueden ser sintéticos.

Las micelas se forman en una emulsión de manera que las partículas de grasa quedan dispersas en la fase acuosa, como en el caso de la grasa en la leche. Las micelas inversas, como su nombre lo indica, son suspensiones de partículas de agua en compuestos orgánicos. Básicamente son partículas de agua sumamente pequeñas y estables termodinámicamente, dispersas en una fase orgánica con la ayuda de un surfactante (Stamatis, 1999). La solubilización de enzimas en micelas inversas es de gran interés debido al atrapamiento de la enzima en las partículas de agua evitando su potencial desnaturalización con la fase orgánica, además que el área de la interfase es de alrededor de $100 \text{ m}^2/\text{ml}$, y al aumentar el área interfacial, incrementa el número de moléculas disponibles para la reacción.

Estudios realizados por Boocock (1996) con hidróxidos demostraron que la solubilidad del metanol en aceite de palma es baja a 40°C y agitación constante, demandando tiempo para alcanzar la concentración de saturación. El catalizador inicialmente se encuentra en el metanol, por lo cual la velocidad de la reacción está en función de la solubilidad de este en el aceite, la cual aumenta con la temperatura.

La aplicación de solventes insolubles en agua como el n-hexano en las reacciones de modificación de lípidos tiene como propósitos manejar el contenido de agua, y por tanto, la actividad de esta en la reacción; y en segundo lugar, disminuir la temperatura de la reacción al disolver el aceite en el alcohol a bajas temperaturas y de esta manera disminuir la energía necesaria para homogenizar el medio de reacción (Akoh *et al.*, 2002).

Otras ventajas de utilizar solventes inmiscibles en agua es la reducción de la viscosidad del aceite, la posibilidad de conservar la enzima en una forma insoluble, facilitar la recuperación y reutilización de la enzima, al igual que la separación de los productos de la reacción, se incrementa la estabilidad de la enzima por el bajo contenido de agua y por lo tanto, se reduce el costo total del producto final (Akoh *et al.*, 2007). Sin embargo, el biodiésel puede ser obtenido enzimáticamente en sistemas con solventes o sin solventes, utilizando agitación (Akoh *et al.*, 2002).

3.2.2.2 pH Los iones hidronio juegan un papel importante en las reacciones catalizadas por enzimas, generando un equilibrio entre aspectos como la desnaturalización de la enzima a pH alto o bajo y definiendo la configuración de acuerdo al estado cargado de esta (grupos carboxilato o aminas protonadas), los sustratos, o ambos (Murray, 2010).

Muchas moléculas proteicas solo retienen su actividad biológica en un rango limitado de temperatura y pH. Al exponer las proteínas globulares a pH y temperaturas extremas fuera de este rango, se da la desnaturalización de estas alterando la estructura terciaria y

cuaternaria, siendo el efecto más visible un descenso en la solubilidad, y la consecuencia más significativa es la pérdida de su actividad biológica característica (Nelson y Cox, 2006).

Las lipasas tienen un pH óptimo alrededor de un pH neutro (Devanesan, 2007). En estudios realizados por Gilbert (1991) y Sharon (1998), determinaron que la actividad de las lipasas de *P. aeruginosa* son estables en un rango de pH alcalino entre 7 y 10 y temperaturas entre 30°C y 50°C. Igualmente Chartrain (1993) estableció para una lipasa de *P. aeruginosa* MB 5001 una máxima acción enzimática con una temperatura de 55°C y un pH de 8, sin embargo, bajo estos parámetros la enzima no era estable.

3.2.2.3 Cantidad de enzima La teoría cinética o de colisión en cinética química incorpora dos conceptos claves: 1) sólo las moléculas que chocan; es decir, que se acercan una de otra a distancias suficientes para formar enlaces, pueden reaccionar; y 2) para cada reacción química hay una barrera energética que debe superarse para que la reacción tenga lugar. Para que una colisión termine en una reacción, las moléculas reactantes deben poseer energía suficiente para superar esta barrera energética. Por tanto, cualquier cosa que: a) eleve la energía cinética de las moléculas reactantes, b) abata la barrera energética para la reacción ó c) incremente la frecuencia de colisión, deberá aumentar la velocidad de reacción (Murray, 2010)

Dentro de estas variables, la temperatura y la concentración de reactantes juegan un papel importante. A concentraciones elevadas de reactantes, tanto la cantidad de energía suficiente en la reacción, así como la frecuencia de colisión aumentan (Murray, 2010).

Oliveira y Alves (2000) encontraron en su trabajo al inmovilizar una lipasa de *Candida rugosa* que a mayor cantidad de enzima menor tiempo de reacción; XU (2003) a su vez

mostró que agregando 30% de enzima en relación con la cantidad de aceite usado, la reacción se demora sólo 10 horas.

En general, el uso de 4% a 10% en peso de catalizador enzimático da origen a rendimientos entre 55% a 97% de metilésteres, en reacciones con tiempos entre 3 y 120 horas, y con temperaturas entre 30 a 50°C (Pinto, 2005).

3.2.2.4 Relación aceite-alcohol Es una de las variables más críticas en la producción de metilésteres. A medida que aumenta esta relación se reduce la producción de ácidos grasos y se aumenta la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Con base en las relaciones estequiométricas determinadas en la reacción, se necesitan 3 moles de alcohol y una mol de triglicérido para obtener 3 moles de alquilésteres y una mol residual de glicerol (Fig. 1).

De acuerdo a estudios realizados por Freedman (1984) se encontró que a mayor relación aceite-alcohol mejoran los rendimientos de ésteres metílicos o etílicos, obteniendo la máxima producción con una relación 1:6, relaciones superiores no tienen diferencia significativa alguna en los rendimientos, pero conllevan problemas en la purificación. Hsu, An-Fei (2002) determinaron en su estudio una relación 1:4 como estándar de su trabajo. y Joshua (1999) sugiere que el etanol debe estar en un 30% de exceso con relación a la estequiometría de la reacción (Abbaszaadeh *et al.*, 2012) .

Uno de los problemas conocidos en las reacciones catalizadas con enzimas es la inactivación de las mismas por el exceso de alcohol. El uso de alcoholes de cadena corta es ampliamente difundido debido a sus ventajas con los alcoholes secundarios, siendo metanol, etanol, y butanol los más utilizados. Es conocido que estos alcoholes forman gotas que se insolubilizan en el medio de reacción y al entrar en contacto con la enzima la inactivan. Este problema fue investigado por Shimada (2002), quien reportó que la adición secuencial en tres etapas de metanol al medio de reacción en lugar de realizar la adición en

exceso desde el comienzo alivia la inactivación de la lipasa de *Candida antártica* Novozym 435 obteniendo rendimientos del 90% de metilésteres a partir de aceite de desecho, siendo mayor que el rendimiento teórico del 66% planteado y prolongando la actividad de la lipasa por más de tres meses sin pérdida de su actividad

El uso de diferentes fuentes de donantes acilo ha sido estudiado. Li (2006) utilizó tertbutanol como medio de reacción en transesterificación con aceite de colza obteniendo rendimientos de 95% de alquilésteres con relaciones 1:1 en volumen tertbutanol/aceite, eliminando la inhibición por exceso de etanol y facilitando la eliminación del glicerol.

3.2.2.5 Fase acuosa La fase acuosa es un elemento crucial en las reacciones de transesterificación catalizadas con lipasas. La solvatación de la lipasa en el medio es crucial debido a la formación de puentes de hidrogeno que permiten la conformación tridimensional necesaria para que la lipasa posea su actividad (Murray, 2010).

La cantidad de agua en el medio de reacción garantiza que la lipasa tenga su conformación tridimensional y la capacidad de abrir su sitio catalítico, por tanto se conserva su actividad enzimática predeterminada naturalmente para llevar a cabo su acción catalítica. Sin embargo, un exceso de fase acuosa genera un aislamiento de la enzima con los sustratos (alcohol y aceite), por lo tanto se reduce su capacidad de catálisis la reacción (Dominguez, 2002).

3.2.2.6 Fuente de triglicéridos Los aceites usados de fritura, aceites crudos y aceites de desecho de las refinерías contienen ácidos grasos libres (Free Fatty Acids – FFA), fosfolípidos y muchos otros tipos de impurezas que pueden inactivar la enzima durante la reacción de transesterificación. Por tanto, la calidad del aceite o grasa es determinante en los rendimientos finales obtenidos de biodiésel. Watanabe (2002) encontró que el aceite de soya sin desgomar contiene fosfolípidos que no hacen posible la transesterificación del mismo con lipasa inmovilizada Novozym 435 (lipasa de *C. antártica*), mientras que el

aceite desgomado fue transformado en biodiésel con dicha lipasa obteniendo un rendimiento del 93,8%, con una adición secuencial en tres etapas y sin pérdida de la actividad reutilizando la lipasa en 25 ocasiones.

Por otro lado, Royón (2007) realizó ensayos con la misma enzima (Novozym 435) como catalizador utilizando tert-butanol como solvente para obtener biodiésel en varios tipos aceite, entre ellos aceite de soya refinado y crudo, obteniendo como resultado que el uso de un solvente aumenta la velocidad de reacción y el grado de refinación del aceite no tiene una influencia significativa en el rendimiento final de la transesterificación.

3.2.2.7 Temperatura Las reacciones en presencia de un catalizador, como por ejemplo la transesterificación de triglicéridos (Fig. 1) presentan estados intermedios conocidos como estados de transición, los cuales se representan con dos reacciones parciales: una de formación del complejo sustrato-enzima, y otra de liberación del producto del complejo enzima-producto (desintegración del complejo), teniendo una variación de la energía libre en cada reacción parcial, siendo la suma de estas energías el cambio de energía libre global de la reacción. A medida que las reacciones son más complejas, se involucran varios sucesivos estados de transición a través de una serie de reacciones parciales, cada una con un cambio de energía libre (Murray, 2010). La función de las lipasas es disminuir la energía necesaria para la formación de estos estados de transición.

Como se mencionó anteriormente (3.2.2.3), para que una colisión de moléculas termine en una reacción, estas deben poseer energía suficiente para sobrepasar la barrera energética de la reacción. La temperatura aumenta la energía cinética, incrementando la frecuencia de los choques entre los reactantes, haciendo a su vez que se exceda dicha barrera energética. Sin embargo, existe una temperatura límite para cada enzima en la cual las moléculas ya no son estables. Por otro lado, a concentraciones elevadas de reactantes, tanto la cantidad de energía suficiente para reaccionar, así como la frecuencia de colisión aumentan y de

acuerdo a la teoría de Michaelis-Menten, la velocidad de reacción está en función del índice de la reacción y de la concentración de enzima ($V=k[E]$) (Murray, 2010).

Las condiciones óptimas de temperatura para el desempeño de las lipasas se encuentran en el rango de 37° a 60°C. La temperatura de fusión del aceite de palma a 2.600 msnm esta alrededor de 37°C, necesitando temperaturas superiores a esta para su conservación en estado líquido.

3.3 Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* es el más importante del orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*, y agrupa bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados que se desplazan mediante uno o varios flagelos polares y carecen de prostecas o vainas. Estas bacterias quimioheterótrofas son aerobias y llevan a cabo un metabolismo respiratorio, utilizando O₂ (y a veces nitrato) como aceptor de electrones. Todas las *Pseudomonas* tienen un ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional y pueden oxidar sustratos a CO₂ (Prescott, 2004).

De acuerdo a Prescott, en la primera edición del Manual Bergey, este género aparece como un taxón heterogéneo compuesto por 70 o más especies. Muchas pueden clasificarse en uno de cinco grupos por homología del rRNA. Los tres grupos mejor caracterizados de rRNA, I-III, se subdividen en función de propiedades tales como la presencia de poli-3-hidroxi-*butirato* (PHB), la producción de un pigmento fluorescente, la patogenicidad, la presencia de arginina dihidrolasa y la utilización de glucosa, entre otras. Por ejemplo, el subgrupo fluorescente no acumula PHB y produce un pigmento verde-amarillento, difusivo e hidrosoluble, que produce fluorescencia bajo radiación UV. A este grupo pertenecen *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. syringae*. La segunda edición del manual ha reducido drásticamente el tamaño del género *Pseudomonas* al transferir especies

a nuevos géneros (p. ej., *Burkholderia*, *Hydrogenophaga* y *Methylobacterium*) (Prescott, 2004).

Este género tiene grandes implicaciones prácticas, entre ellas: 1) la degradación de gran variedad de moléculas orgánicas (mineralización en la naturaleza, tratamiento de aguas residuales), 2) experimentación (avances en fisiología y bioquímica), 3) son patógenos importantes tanto en plantas como en animales y 4) están implicadas en la alteración de alimentos como pescados, carne, huevos y leche, dado que crece a 4°C y degrada lípidos y proteínas (Prescott, 2004).

De acuerdo a la base de datos de secuencias de aminoácidos de enzimas del sistema de información BRENDA, existen 69 lipasas secuenciadas de *Pseudomonas*, de las cuales 11 pertenecen a *P. aeruginosa* (Department of Bioinformatics & Biochemistry Technische Universität Braunschweig). Sin embargo, existen una gran cantidad de lipasas encontradas que aún no han sido secuenciadas, y que son objeto de estudio en la actualidad.

3.3.1 Resultados de transesterificación con lipasas del género *Pseudomonas* Zhao (2007) obtuvo un rendimiento de 71% en transesterificación con una lipasa solubilizada de *P. fluorescens* y observó que la solubilización de la enzima en compuestos alquílicos de cadena corta brinda estabilidad térmica a la enzima, reportando una temperatura óptima para la lipasa solubilizada de 70°C, frente a 30°C de la lipasa nativa. Este tratamiento reduce los reprocesos, más sin embargo aumenta el consumo energético, por lo cual este método está presto a futuros desarrollos.

También se han realizado trabajos en donde los microorganismos trabajan directamente sobre los sustratos. Devanesan (2007) utilizó células inmovilizadas de *P. fluorescens* en aceite de jatropha como catalizador de la reacción de transesterificación con metanol. Obtuvo un máximo rendimiento de 72% de conversión con una temperatura de 40°C, pH 7,

tiempo de reacción de 48 horas, 4 gramos de inóculo para 50 gramos de aceite, y una relación aceite alcohol de 1:4.

3.3.2 Trabajos realizados con *Pseudomonas aeruginosa* Al buscar en la base de datos BRENDA, se pueden encontrar diversos trabajos con lipasas de *P. aeruginosa*, en donde se realiza su aislamiento, caracterización, mejoramiento a través de bioingeniería y se realizan pruebas para su aplicación en diferentes procesos (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig).

Peng (2011) realizó la coexpresión de una lipasa de *P. aeruginosa* CS2 y su respectiva foldasa (proteína de plegamiento) en *Escherichia coli* BL21 obteniendo una lipasa soluble. La lipasa recombinante y su foldasa fueron aisladas alcanzando un factor de purificación de 10,2 y 40,9 % de recuperación. Los pesos moleculares de la lipasa recombinante y su foldasa fueron 35,7 y 38,3 kDa respectivamente. Esta lipasa fue inmovilizada y usada para la síntesis de butil acetato, obteniendo un rendimiento de 98,2%.

Dharmsthiti (1998) obtuvo una lipasa de *P. aeruginosa* de agua residual doméstica para utilizarla en la transesterificación de aceite de oliva, obteniendo la mejor conversión a una temperatura de 55°C sin lograr estabilidad de la enzima, y un pH óptimo de 8 en el cual la enzima sí es estable y trabaja efectivamente. La enzima fue desarrollada con el fin de tratar las aguas residuales de restaurantes, las cuales vienen con altos contenidos de lípidos de diferente índole, sobre los cuales la enzima actuó efectivamente.

Como antecedente al presente trabajo, Peña realizó el aislamiento y crioconservación de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* directamente del fruto de la palma, identificando actividad hidrolítica en dicha cepa (Peña, 2006).

3.4 Aceite de palma africana (*Elaeis guineensis*)

En Europa la fuente de aceite vegetal suele ser aceite de colza, ya que es una especie con alto contenido de aceite que se adapta bien a los climas fríos. Sin embargo, en la zona del trópico existen otras variedades con mayor rendimiento por hectárea, tales como la jatropha (*Jatopha curcas*), sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*), el ricino ó mamona en portugués (*Ricinus communis*) y la palma aceitera (*Elaeis guineensis*), siendo esta última la de mayor rendimiento por hectárea (Mekhilef, 2011).

La transesterificación de ácidos grasos se ha realizado a partir de diferentes aceites y grasas vegetales y animales. El aceite de palma se obtiene a partir del mesocarpio de los frutos de la *Elaeis guineensis* ó palma de aceite. Esta planta tiene la particularidad que tanto la almendra como la pulpa presentan altos contenidos de aceite. De la primera se extrae el aceite conocido como aceite de palmiste ó núcleo (Kernel Oil - KO), y de la segunda se obtiene el aceite crudo de palma (Crude Palm Oil – CPO) (Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite FEDEPALMA)

Las principales características fisicoquímicas del aceite de palma se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del aceite de palma.

Características fisicoquímicas	MIN	MAX
Punto de fusión (°C)	34	40
Densidad 40/25°C	0,868	0,879
Índice de yodo	50	58
Materia insaponificable	---	1,5
Índice de refracción a 40°C	1,449	1,455
Índice de saponificación	195	205
Poder calorífico (Calorías)	88225	

Tabla 2. (Continuación)

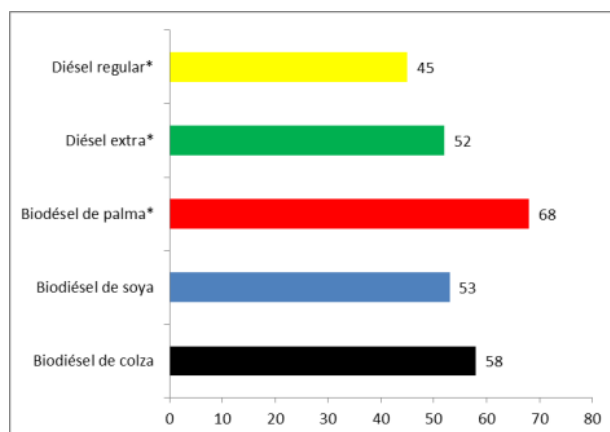
Características fisicoquímicas	MIN	MAX
Punto de chispa	280	
Viscosidad absoluta a 40°C (cp)	37,8	
Viscosidad absoluta a 70°C (cp)	13,6	
Índice de cetano	35	

Fuente: INDUPALMA

En el mundo entero –con excepción de África, donde se consume crudo de manera masiva– el aceite de palma se somete a un proceso de refinación mediante el cual se le reduce la humedad, se blanquea y se desodoriza (Refined, Bleached and Deodorized – RBD) para finalmente ser fraccionado y obtener oleína y estearina de palma. Algunos procesadores lo comercializan solo, pero es más común que lo presenten al consumidor mezclado con otros aceites vegetales.

Al fraccionar el aceite de palma se obtienen dos productos: la oleína y la estearina de palma. La primera es líquida en climas cálidos y se puede mezclar con cualquier aceite vegetal. La otra parte es la fracción sólida y sirve para producir grasas, principalmente margarinas y jabones. Las propiedades de cada una de las porciones del aceite de palma explican su versatilidad, así como sus numerosas aplicaciones (Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite FEDEPALMA)

El aceite de palma y el aceite de palmiste son utilizados para consumo humano y sirven de manera especial en la fabricación de productos oleoquímicos como los ácidos grasos, ésteres grasos, alcoholes grasos, compuestos de nitrógeno graso y glicerol (Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite FEDEPALMA). En los últimos tiempos, ha venido tomando fuerza su utilización como biocombustible gracias al alto número de cetano de sus ésteres en comparación con ésteres obtenidos de otras fuentes orgánicas (Fig. 5).



* Resultados proyecto ECOPETROL, ICP Y CENIPALMA

Fuente: ECOPETROL-ICP y CENIPALMA (2006)

Figura 5. Número de cetano para algunos tipos de Biodiésel. Adaptado de ECOPETROL-ICP y CENIPALMA (2006)

El número de cetano es un parámetro que se utiliza para medir la volatilidad y facilidad de inflamación de los combustibles utilizados en los motores diésel, comparando una muestra de combustible con un patrón de referencia conformado por una mezcla de cetano puro con alfa metil naftaleno, realizando el análisis en un motor de prueba. El cetano puro es un hidrocarburo con una gran facilidad de inflamación, por lo cual se le asigna un índice de 100, mientras el naftametil naftaleno es también un hidrocarburo de baja facilidad de inflamación asignándosele un índice de 0. Estos hidrocarburos se mezclan y la proporción que se comporte de manera equivalente a la muestra indicará su índice. (American Society for Testing Materials ASTM)

El número de cetano es la medida clave de la calidad de la combustión de un carburante diésel debido a que guarda relación con el tiempo que transcurre entre la inyección del carburante y el comienzo de su combustión. Una combustión de calidad ocurre cuando se produce una ignición rápida seguida de un quemado total y uniforme del carburante.

Cuanto más elevado es el número de cetano, menor es el retraso de la ignición y mejor es la calidad de combustión.

Colombia adoptó como estrategia la producción de biodiésel a partir de aceite de palma el cual, mezclado con diésel, permite mover miles de autos y máquinas que utilizan motores de este tipo en el país, con beneficios para el medioambiente, el empleo y la oferta de energía renovable.

Para el 2011, en el país existían 427.367 hectáreas sembradas en palma de aceite, de las cuales 160.375 se encontraban en plena producción y 266.992 se encontraban en desarrollo (Tabla 3). Para este mismo año, el país tuvo una producción neta de 942.000 toneladas de aceite provenientes de la cuatro zonas productoras del país: norte (Magdalena, Norte del Cesar, Atlántico, Guajira), centro (Santander, Norte de Santander, Sur del Cesar, Bolivar), oriente (Meta, Cundinamarca, Casanare, Cesar), y occidente (Nariño) (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia FEDEBIOCOMBUSTIBLES, 2012). En el año 2009, Colombia figuraba como el quinto país exportador de aceite de palma con el 1% de las exportaciones globales, y la industria del biodiésel compró 153.496 toneladas que representaron un incremento del 277% con respecto al año anterior (Federación Nacional de cultivadores de Palma FEDEPALMA)

Tabla 3. Información estadística del sector de biodiésel de palma de aceite en Colombia.

Indicador	2008	2009	2010	2011	2012**
Producción de biodiésel (Ton)	.	169.411	337.713	443.037	.
Ventas Biodiésel (Ton)	-	169.065	337.718	-	-
Ventas aceite de palma para biodiésel (Ton)	40.700	153.496	337.700	385.000	439.000
Producción de aceite crudo de palma (Ton)*	775.500	801.000	846.000	942.000	1.039.400

Tabla 3. (Continuación)

Indicador	2008	2009	2010	2011	2012**
Hectáreas sembradas de palma*	336.956	360.536	403.684	427.367	-
Hectáreas sembradas de palma en desarrollo	115.690	126.188	153.022	266.992	-
Hectáreas sembradas de palma en producción	221.266	234.349	250.662	160.375	-

* Cifra correspondiente al total nacional destinado para todos los productos y subproductos relacionados (biodiésel, aceite crudo, aceite refinado, etc)

** Valores proyectados

Fuente: FEDEBIOCOMBUSTIBLES 2012

A través de la evolución, los organismos se adaptan para sacar provecho a los recursos que se encuentran a su alrededor para subsistir. Aquellos organismos que se adaptan a las condiciones cambiantes en su medio ambiente son los que finalmente sobreviven y transmiten estas aptitudes a su descendencia (Prescott, 2004).

En el caso del fruto de la palma de aceite, se presenta naturalmente su degradación a través de la acción en conjunto de varios tipos de organismos involucrados. Cuando el fruto tiene un alto contenido de azúcares se convierte en una excelente fuente de nutrientes para muchos macro y microorganismos. Al estar completamente desarrollado (fruto maduro), el fruto alcanza también su máximo contenido de aceite (Peña, 2006).

Por esta razón, algunos microorganismos aislados directamente del fruto de la palma tienen potencial para hidrolizar los ácidos grasos complejos con la ayuda de lipasas en presencia de medios ricos en agua, para utilizarlos como fuente de carbono. La parte crucial en este tipo de metabolismos es la actividad del agua dentro del fruto (a_w), ya que si se encuentra por encima de 1.0 se mantiene la reacción hacia la hidrólisis de los lípidos, pero si está por debajo, la constante de equilibrio del sistema y la reacción se direccionan inversamente hacia la síntesis de los mismos, en la cual como subproducto se genera agua, hasta el punto de aumentar nuevamente la actividad de la misma (Akoh *et al.*, 2007).

4. METODOLOGIA

4.1 REACTIVOS

4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* La *P. aeruginosa* se aisló de frutos de palma africana maduros obtenidos en la finca de la empresa Manuelita S.A en el proyecto “Obtención de enzimas lipolíticas a partir de microorganismos aislados del fruto de palma aceitera” (Prieto, 2006). Esta cepa se aisló, purificó y caracterizó molecularmente y se encuentra crioconservada a -80°C de en la Universidad de La Sabana.

4.1.2 Aceite y reactivos El aceite de palma, tanto crudo (CPO) como refinado (RBD), fue suministrado por la empresa DEL LLANO S.A, cuya planta de producción está ubicada en el municipio de Villavicencio (Meta). Cada aceite fue entregado con su respectiva ficha técnica de parámetros fisicoquímicos, los cuales se encuentran resumidos en el Anexo A.

Para determinar el peso molecular del aceite de palma se tomó como base de cálculo los datos de caracterización por GC obtenidos en el trabajo de Montenegro (Anexo B), quien utilizó diferentes tipos de aceite de palma procedente de la zona de los Llanos Orientales para transesterificación enzimática con bioetanol bajo catálisis con Novozym 435 (Montenegro, 2005).

Para el cálculo se asumió que un triglicérido está formado por un solo tipo de ácido graso (Anexo C). De igual forma, se conoce que una mol de aceite crudo tiene el mismo peso molecular que una de aceite refinado, ya que los procesos de refinación, blanqueamiento y desodorización son operaciones físicas y no afectan la estructura de los triglicéridos.

El metanol utilizado fue grado reactivo (99,9%) de la marca J.T.Baker. Para realizar la extracción de metilésteres se utilizó n-Hexano grado analítico (97,5%) de la marca Chemi (Merck). Los reactivos utilizados para los análisis de muestras (proteína, actividad y electroforesis) fueron grado reactivo.

4.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIOFILIZADO Y LA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

4.2.1 Obtención del extracto liofilizado El extracto liofilizado se obtuvo mediante la metodología planteada por Uscátegui (2007), llevando a cabo la fermentación con *P. aeruginosa* en medio líquido (Anexo D). El producto de la fermentación se centrifugó y el sobrenadante obtenido se filtró obteniendo el extracto enzimático.

El extracto enzimático se concentró en un equipo de ultrafiltración tangencial (MILLIPORE Labscale TFF System, cassette MILLIPORE Pellicon XL Biomax 5) para eliminar las proteínas de peso molecular menor a 5 kDa y concentrarlo hasta obtener un volumen final de 50 mL. El extracto concentrado y el permeado obtenidos se analizaron cuantificando proteína, actividad lipolítica y electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente se liofilizó utilizando viales de 40 mL (Labconco Freezone 1, 0,04 mbar, -40°C) y se analizó para confirmar su actividad antes de ser utilizado como biocatalizador para las pruebas preliminares de transesterificación.

Se evaluó el extracto enzimático y la enzima parcialmente purificada en las diferentes etapas del procesos (Fig. 6 y Fig.7 respectivamente) a través de 3 técnicas: 1) concentración de proteína a través del método de Bradford modificado (Zor, 1996) en microplatos (equipo BIO-RAD iMark Microplate reader); 2) actividad lipolítica utilizando para-nitrofenil palmitato (p-NPP) (Ateslier y Metin, 2006; Gaur *et al.*, 2008) en un espectrofotómetro (UV/Vis PerkinElmer Lambda 35, con sistema Peltier PTP 6, agitación media alrededor de

900 rpm); y 3) electroforesis (sistema BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell System) de acuerdo a la metodología planteada por Laemmli (1970).

Para la cuantificación de proteína por Bradford modificado se preparó el reactivo utilizando azul de Comassie G-250 (10 mg), etanol RA (96%) (5 mL) y ácido fosfórico 85% (10 mL) aforando a 100 mL con agua destilada y filtrando dos veces, de acuerdo al procedimiento planteado por Zor, realizando la respectiva curva de calibración con albumina de suero bovino (Anexo E). Se colocaron 200 μ L de reactivo en cada celda del microplato y 50 μ L de muestra. Se agitó para homogenizar y se dejó estabilizar el color por 5 minutos para medir absorbancias en el espectrofotómetro a 595 y 450 nm.



Figura 6. Procedimiento para la obtención del extracto liofilizado

La cuantificación de actividad lipolítica se realizó llevando a cabo la hidrólisis de p-NPP por 30 minutos, realizando una variación a la metodología planteada por Gaur. Se preparó el medio de reacción utilizando una solución con cloruro de sodio 0,15 M con 0,5% de Triton X-100 en búfer Tris HCl pH10. Se utilizó p-NPP 100 mM en acetonitrilo como sustrato, llevando a cabo la reacción a 54°C.

El cálculo de la actividad específica se realizó de acuerdo al método de Ateslier y Metin con base en la ley de Lambert-Beer (Ec. 1), teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra. Se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 400 nm y los resultados se presentan en unidades de actividad enzimática (U), que se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la conversión de una μmol de sustrato ó producto por minuto bajo las condiciones del ensayo (Yapazan, 2008).

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta Abs (min^{-1}) \times V_{Ensayo} (mL)}{\varepsilon (mM) \times V_{Cat.} (mL)}$$

ΔAbs = Variación de la absorbancia por minuto

V_{Ensayo} = Volumen total del ensayo

ε = Coeficiente extinción milimolar a 400 nm ($14,8 \text{ mM}^{-1} = 14,8 \text{ mL reacción}/\mu\text{moles p-NP}$)

$V_{Cat.}$ = Volumen de catalizador colocado

Ecuación 1. Ecuación para cálculo de unidad de actividad enzimática (U). Fuente: Yapazan (2008)

La electroforesis se realizó de acuerdo al procedimiento para SDS-PAGE establecido en el manual del equipo, utilizando un gel al 12% de poliacrilamida y adicionando 2-mercapto-etanol en el búfer de preparación de la muestra, usando búfer Tris-glicina como búfer de corrida. El marcador de peso molecular utilizado fue un Opti-Protein Marker G-252 de la marca Applied Biotechnological Materials Inc. (ABM), con 11 bandas y un rango de 10 a 175 kDa.

Estas técnicas se repitieron en cada paso de la obtención y purificación de la enzima, realizando la estandarización de cada una previamente.

4.2.2 Purificación parcial de la lipasa Para obtener la lipasa parcialmente purificada se realizó una variación a la metodología utilizada en la obtención del extracto liofilizado (Fig. 7). Antes de liofilización, el extracto concentrado fue sometido a Diálisis-Filtración, de acuerdo al método propuesto en la guía para el usuario del equipo de ultrafiltración tangencial, con el fin de retirar las sales y demás compuestos solubilizados que se encuentran presentes en el medio de fermentación. Se utilizó búfer Tris HCl pH 8 (25 mM) como búfer de diálisis. La diálisis se continuó hasta que la conductividad del permeado de filtración se igualó a la del búfer de diálisis (3 mS aproximadamente, conductivímetro Hanna). El concentrado dializado y el permeado se analizaron nuevamente cuantificando proteína, actividad y electroforesis SDS-PAGE.



Figura 7. Procedimiento de purificación parcial de la lipasa

El extracto dializado y liofilizado obtenido se reconstituyó en búfer Tris HCl pH 8 y se sometió a cromatografía de exclusión molecular (BIO-RAD BioLogic LP, columna de 30x1,5 cm, BIO-RAD Bio-gel P-60, volumen de inyección 1,5 mL, flujo de corrida 0,15 mL/min, búfer de corrida: Tris HCl pH 8 25 mM). Se reunieron los conjuntos de fracciones para las señales detectadas a 280 nm, sometiendo cada conjunto al análisis estándar (actividad, proteína y electroforesis) e identificando el conjunto con mayor actividad lipolítica. El conjunto de fracciones identificado se liofilizó y reconstituyó en el búfer de corrida. La reunión de fracciones que presentó actividad se almacenó a -4°C. Este procedimiento se repitió hasta obtener la enzima parcialmente purificada.

4.3 CAPACIDAD DE TRANSESTERIFICACIÓN

4.3.1 Extracto liofilizado

4.3.1.1 Pruebas preliminares Se estandarizó el procedimiento para llevar a cabo la reacción de transesterificación realizando diferentes pruebas para definir el montaje experimental, evaluando la pertinencia de diferentes tipos de recipientes, teniendo en cuenta que el metanol tiene una alta presión de vapor y era necesario conservar constante el volumen de los reactivos a lo largo de la reacción.

Se realizaron pruebas con 6 mL de aceite de palma crudo con 36 mL de metanol grado reactivo (RA) y 1 ml de extracto concentrado. Se utilizó una incubadora con agitación (JELO IS-971, 200 RPM). La reacción se llevó a cabo durante 48 horas, a una temperatura de 58°C. (Temperatura máxima de prueba para el extracto en los ensayos preliminares), eligiendo finalmente erlenmeyers de 100 mL con tapa esmerilada.

Se definieron las variables del ensayo (Tabla 4) y se planteó un diseño experimental factorial completo 2^5 para un total de 32 tratamientos con 3 réplicas cada uno (Anexo F).

Tabla 4. Variables y niveles definidos para el ensayo preliminar

Parámetro	-1	+1
Temperatura	42 °C	58°C
pH	6	8
Tipo de aceite	Crudo (CPO)	Refinado (RBD)
Relación v/v aceite:metanol (Relación estequiométrica)	1:4 (1:100)	1:6 (1:148,6)
Fase acuosa (% v aceite)*	10	30

* Concentración: 20 mg de extracto liofilizado por mL de búfer

Para analizar el comportamiento de estas interacciones en los niveles utilizados para cada factor, se utilizaron superficies de respuesta. Estos gráficos son útiles cuando se tienen dos factores; sin embargo, para más de dos factores disminuyen su efectividad porque no se puede dibujar una superficie en cuatro o más dimensiones (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

Al término de cada ensayo se realizó la extracción de los metilésteres con hexano centrifugando para retirar la lipasa y el aceite (centrifuga Hettich Universal 32R, 9.000 rpm, 30 minutos, 4°C). De la parte superficial del sobrenadante obtenido en la separación se tomaron 1 mL de muestra y se analizó la cantidad de metilésteres por cromatografía de gases (GC) llevada a cabo en la parte preliminar en el laboratorio de cromatografía de la universidad de La Sabana (cromatógrafo Varian), y para los ensayos posteriores en el laboratorio de ensayos fisicoquímicos PROQUIFAR S.A. (cromatógrafo Agilent Technologies 7890A GC System, columna HP88, volumen de inyección 1µL, Split 1:10). El gas de arrastre usado fue Helio. Las temperaturas de inyector y detector fueron 250°C, y 280°C respectivamente, fijando un flujo de 1 mL/min.

Para el ensayo preliminar se realizó el análisis en función del área de la señal obtenida para cada uno de los cuatro metilésteres de interés, asumiendo que el área es proporcional a la concentración del metiléster en la mezcla de reacción. Para los demás ensayos se realizó en función de los rendimientos molares de la reacción.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó una regresión lineal apoyada en un modelo de superficie de respuesta de primer orden con el programa JMP 8.0.2 ($\alpha = 0,05$). Con esta metodología (Fig. 8) se busca mejorar progresivamente las condiciones del ensayo (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

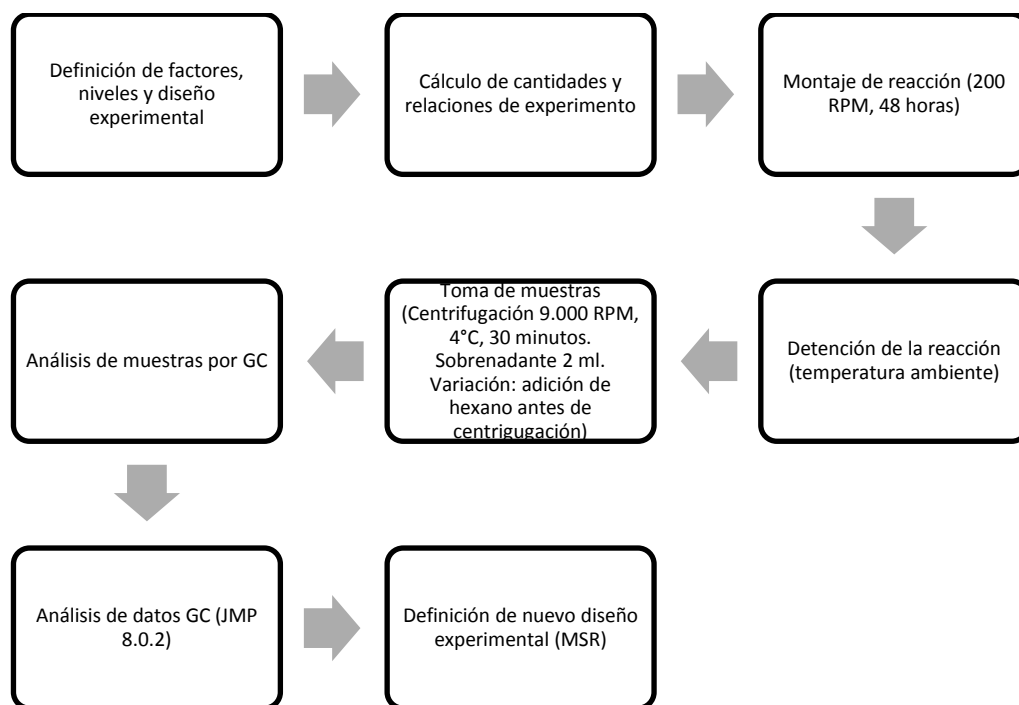


Figura 8. Procedimiento utilizando metodología de superficies de respuesta para el análisis de los factores involucrados en la transesterificación de aceite de palma utilizando extracto enzimático como biocatalizador

Después de encontrar la mejor combinación de factores para la reacción bajo el efecto del extracto liofilizado, este tratamiento definió como condiciones estándar para las pruebas posteriores.

4.3.1.2 Escala y relación aceite-alcohol Se realizó un ensayo para establecer la posibilidad de llevar la reacción a una escala menor debido a la baja disponibilidad del extracto enzimático y la necesidad de aumentar las concentraciones del mismo. Se tomó como variables dos escalas o recipientes: erlenmeyers de vidrio de 100 mL con tapa esmerilada y viales de vidrio de 10 mL con tapa de caucho, reduciendo en estos últimos las cantidades de reactivo.

Se realizó un diseño factorial 2x2 con tres réplicas (Anexo G), teniendo como factores: la escala del ensayo y la comparación entre la relación estequiométrica contra la relación en volumen entre el aceite y el alcohol (Tabla 5). La reacción se llevó a cabo con agitación a 200 rpm durante 48 horas, analizando las muestras obtenidas a través de GC.

Tabla 5. Niveles definidos para el ensayo de escala y relación aceite:metanol

Parámetro	-1	+1
Escala (Capacidad envase)	10	100
Relación 1:6 aceite:metanol	Estequiométrica	Volumen

A diferencia del ensayo preliminar, se analizaron las áreas en función del volumen total de la reacción para poder hacer una comparación de la cantidad de metilésteres obtenidos en cada caso en función del volumen de reacción.

Se calculó la concentración de metilésteres para cada tratamiento al final del ensayo relacionando las áreas (GC) de las señales de interés (palmitato, oleato, linoleato y

estearato) con las áreas obtenidas del estándar utilizado, teniendo en cuenta el peso molecular (Tabla 6), la concentración de cada metiléster y la sumatoria final de las cuatro respectivas áreas (Anexo G).

Finalmente, con estos rendimientos se realizó el análisis de la reacción por superficies de respuesta de acuerdo a la metodología utilizada por Gao (2009).

Tabla 6. Cálculo de peso promedio de metilésteres analizados

Ester	Peso molecular (g/mol)
Palmitato de metilo	270,4
Oleato de metilo	296,4
Linoleato de metilo	294,4
Estearato de metilo	298,4
Peso molecular promedio	289,9

El rendimiento de la reacción se calculó siguiendo una modificación del método propuesto por Sim (2009), relacionando las moles de metilésteres obtenidas en el cromatograma con el factor de dilución utilizado (FD) en la extracción de estos, y con la cantidad de moles de aceite iniciales (Ecuación 2).

$$Rendimiento\ FAME\ (\%) = FD \times \frac{M_{FAMES}}{M_{Aceite}} \times 100\%$$

FD=Factor de dilución

M_{FAMES}=Moles de metilésteres al final de la reacción

M_{Aceite}=Moles iniciales de aceite

FUENTE: Sim 2009 (adaptación)

Ecuación 2. Cálculo del rendimiento de la reacción

4.3.1.3 Concentración de enzima y relación estequiométrica Para poder definir el comportamiento de la concentración de la lipasa frente a diferentes relaciones estequiométricas (Tabla 7), se definió diseño factorial 4x3 con 12 tratamientos y 2 réplicas (Anexo H).

Tabla 7. Niveles definidos para el ensayo de relación estequiométrica y concentración de extracto

Parámetro	Niveles			
	Relación estequiométrica	1:56	1:106	1:156
Concentración (mg/mL)	20		80	
			140	

4.3.1.4 Relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción Para este ensayo se establecieron 4 factores con dos niveles cada uno (Tabla 8). Se estableció un diseño factorial completo 2_{IV}^4 con 2 réplicas (Anexo I).

Tabla 8. Niveles definidos para el ensayo de relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción

Parámetros	-1	+1
Relación estequiométrica (RE)	1:6	1:156
Adición secuencial	Sin adición secuencial	Adición (1/3 relación estequiométrica final a las 0, 12, 24 horas de reacción)
Cosolvente	Sin adición	Aceite:Hexano 1:1 v/v
Agua (% v/v agua:aceite)	2%	10%

4.3.2 Análisis del efecto de la purificación Teniendo los resultados de las diferentes pruebas de transesterificación con extracto liofilizado, se definió un diseño final para determinar el efecto de la purificación de la lipasa.

De acuerdo a lo planteado por Gutiérrez, cuando se tienen diseños factoriales 2^k completos con una réplica con más de 4 factores, se adquiere suficiente información para analizar todas las interacciones, incluyendo las de alto orden. Este exceso de información permite a su vez fraccionar estos diseños, obteniendo suficientes datos para una estimación válida de todos los efectos. Sin embargo, a partir del tercer orden, las interacciones generalmente no son significativas y se utilizan para la estimación del error (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

El diseño se estableció con los factores de interés que presentaron interacciones significativas de primer orden entre dos variables en los ensayos anteriormente realizados y se definieron nuevos niveles de acuerdo a las tendencias observadas en las gráficas de superficie de respuesta. Los niveles seleccionados para cada factor se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Variables y niveles seleccionados para ensayo final

Factor	-1	+1
A. Catalizador	Extracto Liofilizado (EL)	Enzima Parcialmente Purificada (EPP)
B. Fase acuosa	5%	10%
C. Cosolvente (% v/v)	10	30
D. Relación estequiométrica	1:140	1:170
E. pH	8	10

Cuando se incrementa el número de factores en los diseños factoriales completos 2^k , aumentan a su vez el número de tratamientos. Gracias al exceso de datos que acumulan estos diseños, es posible sacrificar información poco importante en aras de obtener un diseño manejable con menor número de corridas. Con los diseños factoriales fraccionados se reduce de manera importante el número de tratamientos, evitando la pérdida de información valiosa (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

A su vez, si al diseño factorial se le agregan repeticiones al centro ($2k + \text{centro}$), en el modelo se puede incluir sólo uno de los términos cuadráticos puros, cualquiera de ellos, ya que son alias. Las repeticiones al centro no son suficientes para investigar cuál o cuáles de los términos cuadráticos están activos, pero sí permiten detectar la presencia de curvatura.

Se planteó un diseño experimental factorial fraccionado 2_V^{5-1} a través de la metodología planteada por Gutiérrez, para generar un diseño con dos fracciones iguales (principal y complementaria), definiendo la fracción principal para el experimento con cinco puntos centrales (Anexo J). Para los puntos centrales se utilizó 7,5% de fase acuosa, 20% de cosolvente, relación estequiométrica 1:156 y pH 10, sin catalizador.

Con base en los resultados de los ensayos previos, los demás factores involucrados se definieron como constantes para el ensayo (Tabla 10) a excepción de pH, factor para el cual existe un efecto individual que será confrontado con el efecto de su interacción con cada catalizador (EL y EPP), motivo por el cual se definió pH 10 como punto central.

Tabla 10. Variables definidas como constantes para el ensayo final

Factor	Parámetro
Tipo de aceite	Aceite de palma RBD
Cantidad de catalizador	37 mg (4,16% m/m catalizador/aceite)
Temperatura	54 °C
Extracción	Hexano
Agitación	200 RPM
Tiempo	48 Horas

Dentro de la caracterización de la lipasa en el proyecto “Caracterización y mejoramiento de la acción de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* para su utilización en la producción de biodiésel y oleoquímicos” (Prieto, 2012) se determinó que la mayor actividad específica se presenta a 54°C, razón por la cual se definió esta temperatura para el ensayo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACTO LIOFILIZADO Y ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

5.1.1 Obtención del extracto liofilizado El extracto se obtuvo por fermentación en medio líquido, almacenando en volúmenes de 500 mL. Las muestras que no se liofilizaron o procesaron los días inmediatamente posteriores a la fermentación fueron almacenadas en congelación a -4°C para evitar su deterioro.

Como se puede observar en la figura 9, el sobrenadante obtenido de la fermentación presenta una proteína con peso molecular alrededor de 29 kDa. Sin embargo, al pasar la muestra por ultrafiltración tangencial, la muestra se concentra y en el gel de electroforesis se revelan proteínas que no se podían observar inicialmente en el sobrenadante.

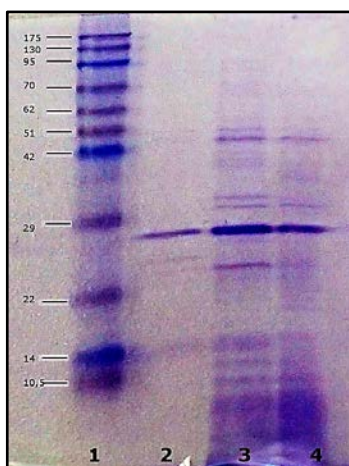


Figura 9. Gel de SDS-PAGE con muestras al final de la electroforesis. 1. Marcador de peso molecular (kDa); 2.Sobrenadante de fermentación con *P. aeruginosa* pasado por membrana de $0,2\ \mu\text{m}$; 3. Sobrenadante de fermentación concentrado por filtración tangencial y 4.Sobrenadante de fermentación concentrado y dializado

El peso molecular de la proteína que revela una mayor concentración en el gel es coherente con el peso de 29 kDa reportado por Borkar para una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9, quien a su vez afirma que muchas lipasas de *Pseudomonas sp* tienen un peso molecular entre 29 y 30 kDa (Borkar *et al.*, 2009). Se puede observar en la electroforesis que a través de las etapas de purificación esta proteína se conserva en mayor concentración con respecto a las demás proteínas presentes en la muestra. Así mismo, se estableció que con la ultrafiltración aumenta la actividad específica de la enzima (Tabla 11), lo cual indica que a pesar de que hay una disminución de la proteína total en la muestra, esta conserva la actividad enzimática.

Tabla 11. Reporte de análisis de proteína y actividad lipolítica para el proceso de obtención del extracto liofilizado

Etapa	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	mU	mU/mg	Porcentaje Recuperación	Factor de purificación
Sobrenadante	400 mL	138,0308	4020,4500	29,1272	100,0000	1,0000
[5 kDa]	75 mL	41,0583	1403,5364	34,1840	34,9099	1,1736

Con la liofilización del extracto enzimático se busca eliminar la actividad acuosa que puede propiciar el deterioro de la enzima por contaminación con microorganismos, proteasas u otros agentes, tanto internos como externos, que pueden generar alteraciones en la proteína y propiciar disminución de la actividad de la enzima. Adicionalmente, con la liofilización se busca concentrar al máximo todas las proteínas de manera que se pueda optimizar su manejo en forma sólida y poder controlar la concentración de extracto en las soluciones utilizadas como biocatalizador para la reacción de transesterificación. Por otro lado, se puede observar que la proteína no se altera con la liofilización (Fig. 10).

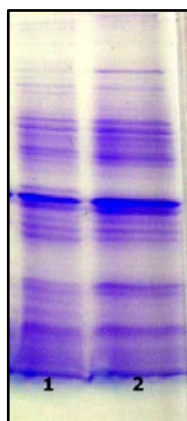


Figura 10. Extracto concentrado por filtración tangencial (1) y extracto concentrado liofilizado reconstituido en búfer PBS pH 8 (2).

5.1.2 Purificación de la lipasa El extracto concentrado obtenido se colocó en el equipo de ultrafiltración para dializarlo con el fin de retirar sales y otros compuestos que se encuentran en el medio de fermentación. Posteriormente, la muestra liofilizada se reconstituyó en búfer Tris HCl pH 8 (25 mM) y se tomaron 1,5 mL para inyectar en la columna de exclusión molecular.

En el cromatograma se pueden identificar dos señales de absorbancia sin definición (Fig. 11), lo cual indica una separación parcial por tamaño de partícula de las proteínas presentes en el sobrenadante. Este hecho se hace evidente en la electroforesis de las señales reunidas (Fig. 12), en donde la primera fracción presenta la mayor actividad específica (Tabla 12).

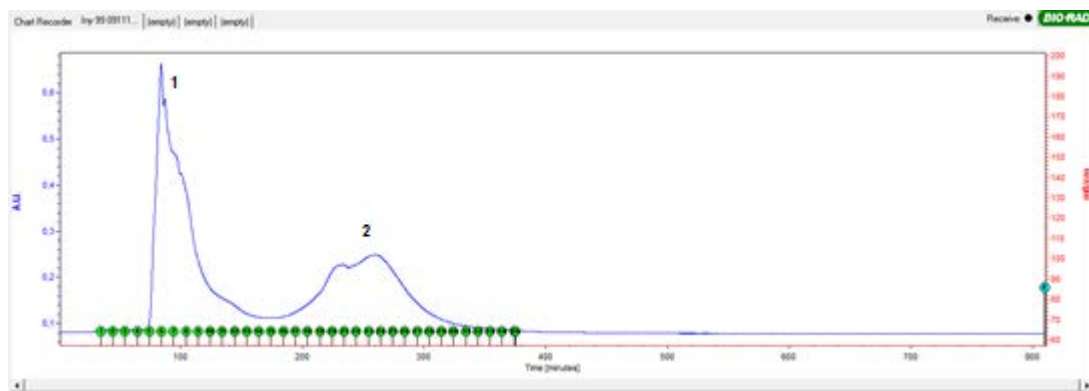


Figura 11. Cromatograma obtenido de la inyección de extracto concentrado dializado en columna de cromatografía de exclusión molecular

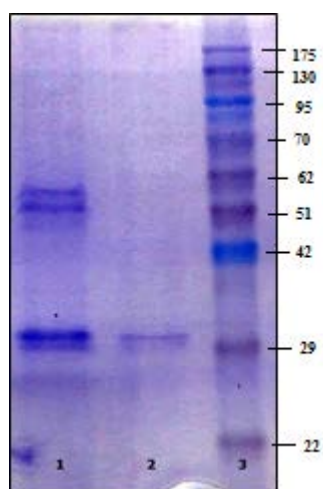


Figura 12. Electroforesis de las señales obtenidas en la muestra de concentrado dializado pasado por columna de exclusión molecular (Fig. 11). Pozo 1: fracciones 5 a 15 (señal 1), Pozo 2: fracciones 16 a 37 (señal 2), Pozo 3: marcador de peso molecular.

Tabla 12. Resumen de proceso de purificación parcial de la lipasa de *P. aeruginosa*

Etapa	Volumen	Proteína			Porcentaje Recuperación	Factor de purificación
		total (mg)	mU	mU/mg		
Sobrenadante	500 mL	156,2415	3699,5178	23,6782	100,00	1
Ultrafiltración dializado	45 mL	20,0468	760,8088	37,9516	20,57	1,6028
Fracción exclusión	15 mL*	0,4989	67,6918	135,6914	1,83	5,7306

*66 mg después de liofilización

La actividad específica obtenida de la purificación parcial de la lipasa (135,69 mU mg⁻¹, ó 0,135 µmol min⁻¹ mg⁻¹) se encuentra en el rango de valores de actividad reportados por diferentes autores en la base de datos BRENDA para lipasas purificadas de *P. aeruginosa*, encontrándose valores desde 6x10⁻⁶ hasta 19.280 µmol min⁻¹ mg⁻¹ (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig) .

En esta base de datos se encuentran reportes de lipasas con pesos moleculares desde 29.000 hasta 840.000 Da. Dentro de estos reportes aparece solo una lipasa de 29 kDa aislada de *P. aeruginosa* EF2 reportada por Gilbert (1991), con un factor de purificación de 31 y una actividad específica de 6.606 U/mg. Así mismo, la lipasa con peso molecular superior más cercano a la anterior que aparece en esta base de datos tiene un peso molecular de 60 kDa y fue aislada de *P. aeruginosa* PseA por Gaur (2008), con un factor de purificación de 8,6 y actividad específica de 143,3 U/mg (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig).

En la electroforesis se identificaron 4 bandas de proteína, dos cercanas a 29 kDa y dos alrededor de 51 kDa (Fig. 12). Estas proteínas tienen pesos similares a las lipasas reportadas por Gilbert y Gaur en sus respectivos trabajos, por tanto, no se puede identificar cuál tiene actividad lipolítica, o si quizás las dos la tengan, como reportó Saeed, quien aisló dos lipasas monoméricas diferentes aisladas de *P. aeruginosa* Ps-x, de 15,5 y 54,97 kDa respectivamente (Saeed, 2005).

Con base en estos resultados, se hace evidente la necesidad de continuar con procesos adicionales de purificación, además que la lipasa parcialmente purificada es tan solo el 0,75 % de la masa seca obtenida por liofilización y su factor de purificación es de 5,73 (Tabla 12).

Por otro lado, Lee afirma que las lipasas obtenidas de microorganismos mesófilos pueden abarcar un rango de pesos moleculares entre 19,4 a 76 kDa y plantea que las proteínas pequeñas y compactas pueden otorgar una mayor estabilidad térmica frente a las proteínas

más pesadas (Lee *et al.*, 1999). Así mismo, Murray afirma que las enzimas necesitan algunas proteínas de bajo peso molecular para mantener su estructura y conservar su actividad enzimática (Murray, 2010).

Chartrain (1993) purificó una lipasa de *P. aeruginosa* MB5001 usando un procedimiento de 3 etapas: ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico y filtración por gel, obteniendo una lipasa de 29 kDa por SDS-PAGE (Sharma *et al.*, 2001). Para nuestro caso se puede observar en la electroforesis de la enzima parcialmente purificada una proteína alrededor de 29 kDa acompañada la mayoría de veces por una banda ligeramente menor (Fig. 12).

5.2 CAPACIDAD DE TRANSESTERIFICACIÓN

5.2.1 Extracto liofilizado

5.2.1.1 Pruebas preliminares Al final de la reacción se observó un precipitado blanco en diferentes muestras. Esto está relacionado con lo reportado por Avellaneda (2010), quien afirma que si la cantidad de alcohol no es suficiente, el producto contendrá monoglicéridos y diglicéridos los cuales cristalizan muy fácilmente en el biodiésel y pueden causar obstrucción de los filtros y otros problemas en el motor. Además, al analizar las diferentes etapas de la reacción (Fig. 1), estos también se encuentran como productos intermedios en la transesterificación.

Por otro lado, la transesterificación es una reacción de equilibrio reversible que necesita un exceso de alcohol para conducirla hacia la obtención de metilésteres, recuperándose al final el volumen en exceso. Un valor muy alto de relación molar de alcohol afecta la separación

de glicerina debido al incremento de su solubilidad, y al permanecer esta en el medio, hace que la reacción se revierta, disminuyendo el rendimiento de los ésteres (Avellaneda, 2010)

Con base en lo anterior, al tener un medio con alcohol se presume que estos cristales son producto del direccionamiento de la reacción hacia la transesterificación con metanol en lugar de hidrólisis, obteniendo mono y diglicéridos junto a los metilésteres respectivos.

De acuerdo a Avellaneda (2010), el etanol y el metanol no forman una mezcla homogénea con los triglicéridos a temperatura ambiente, por tanto es necesario agitar mecánicamente para permitir la difusión, formando durante la reacción una emulsión. Al final de la metanólisis, en ausencia de cosolvente o surfactante, esta emulsión se desintegra rápidamente formándose una capa rica en glicerol en la parte inferior y una capa rica en éster metílico en la parte superior.

Avellaneda habla de dos fases al final de la reacción debido a que utilizó relaciones estequiométricas hasta de 6 moles de metanol por mol de aceite equivalente a una relación en volumen 1:5 alcohol-aceite. Con este volumen de alcohol es muy difícil evidenciar las diferentes fases que forman los compuestos presentes en la reacción. Para el presente ensayo, al utilizar una relación en volumen aceite:alcohol 1:6, se evidenció las diferentes capas formadas de acuerdo a la densidad de cada compuesto (Fig. 13).

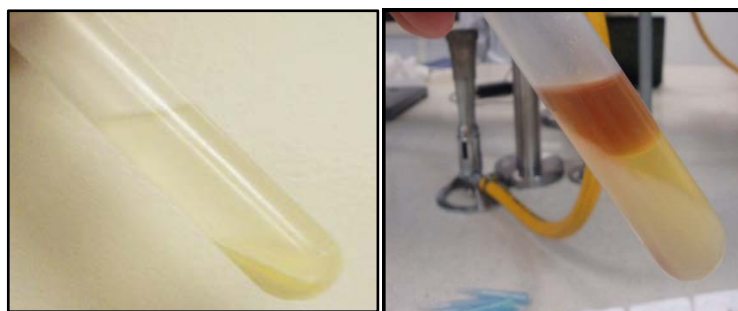


Figura 13. Formación de fases en el medio de reacción después de centrifugación de muestras.

Izquierda: muestra con aceite refinado. Derecha: muestra con aceite crudo

A diferencia de Avellaneda, en este ensayo se pueden diferenciar tres capas durante la separación de los metilésteres para el análisis por GC. Se observa una capa superior con metanol y una intermedia, que para el caso de Avellaneda probablemente observó como una sola debido al volumen manejado en su ensayo. En esta capa intermedia probablemente se encuentran los metilésteres, que tienen una densidad entre 860 a 900 kg/m³ de acuerdo a los parámetros establecidos en la norma técnica NTC 5444 (Anexo K). En la parte inferior se encontraría el aceite sin reaccionar junto a los mono y diglicéridos formados, el búfer de la solución de extracto enzimático (fase acuosa), el glicerol liberado y el extracto enzimático precipitado.

Al analizar estadísticamente los efectos individuales de cada uno de los factores involucrados dentro del ensayo, se observa que todos presentan una incidencia significativa en la reacción ($P < 0,0001$), a excepción de la temperatura ($P = 0,4389$).

Con respecto a la temperatura, Fjerbaek (2009) reporta que “el calor de reacción para la transesterificación es pequeño (estimado alrededor de 18,5 kJ/mol de FAME a 25°C en Poling (2002)), por tanto es de esperarse que el equilibrio de la reacción no sea influenciado significativamente por temperaturas dentro del rango viable para producción de biodiésel con enzimas, es decir, entre 20°C y 70°C”.

Algunos experimentos por lotes y largos tiempos de reacción han demostrado que una enzima puede generar los mismos rendimientos finales a diferentes temperaturas, lo cual no genera mucha información acerca del efecto de esta en la reacción, por lo tanto da indicios que la enzima no es totalmente desactivada al aumentar la cantidad de calor. Solo experimentos que relacionen el rendimiento en función del tiempo, con reactores de producción continua y reactores de lecho empacado, pueden suministrar información acerca de la temperatura óptima para reacciones rápidas en el primer caso, y los efectos a largo plazo de la producción prolongada, pero desafortunadamente hasta la fecha no hay trabajos al respecto (Fjerbaek *et al.*, 2009).

Conociendo que las condiciones para cada lipasa son específicas y con base en el trabajo de Shimada (Tabla 13), es posible encontrar una temperatura superior a 42°C en donde la velocidad de reacción se incrementa, teniendo en cuenta que el rango de trabajo encontrado por varios autores para lipasas del género *Pseudomonas* está entre 25°C y 70°C. Sin embargo, en este punto de experimentación no es posible determinar la estabilidad a largo plazo de la lipasa a temperaturas mayores de 42°C, aspecto que posiblemente afecte la reacción a 58°C durante 48 horas. Esto se analizará en el capítulo 5.2.2.

Tabla 13. Influencia de la temperatura en la producción enzimática de biodiésel

Temperatura	Lipasa, aceite/grasa, alcohol	Condiciones y observaciones	Referencias
50-60°C	<i>P. fluorescens</i> , ácido oleico, propanol+butanol	Óptima tanto para enzima libre como para la enzima inmovilizada en caolinita	Iso et al. (2001)
70°C	<i>P. fluorescens</i> , ácido oleico, propanol+butanol	Mayor estabilidad térmica en la enzima inmovilizada en caolinita que en la enzima libre	Iso et al. (2001)
Rango de 20-60°C	Novozym 435, mezcla de aceite de soya y girasol, metanol	Incremento de la conversión con el incremento de la temperatura después de 6 horas, pero similar conversión después de 24 horas con todas las temperaturas	Shimada et al. (1999)
Rango de 25-60°C	Novozym 435, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, aceite de soya, etanol	60°C es la temperatura óptima para todas las enzimas con la mayor conversión después de 1 hora, mientras que para 24 horas la temperatura óptima es 25°C para RM y TL, y 60°C para Novozym 435	Hernández-Martin y Otero (2008)

Fuente: Fjerbaek 2009 (Adaptación)

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que trabajar temperaturas cercanas al punto de ebullición del metanol (65 °C, 1 atm) genera inconvenientes de presión de vapor alta y

posible disminución de volumen, dando origen a un factor adicional que se debe controlar a través de la hermeticidad del recipiente en el cual se lleva a cabo la reacción. Parte de este problema se ha estudiado con las reacciones de transesterificación llevadas a cabo con fluidos supercríticos, en donde se manejan altas presiones y temperatura (K. T. Tan *et al.*, 2009).

En relación con las interacciones entre factores, se puede observar que se presentan interacciones significativas entre Tipo de aceite-pH, Tipo de aceite-Fase acuosa, pH-Fase acuosa, Tipo de aceite-Relación Vol. Aceite/alcohol, pH-Relación Vol. Aceite/alcohol y Fase acuosa-Temperatura (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros estimados y error para el ensayo preliminar

Parameter Estimates			
Term	Estimate	Std Error	Prob> t
Intercept	-11345,08	2772,988	0,0001 *
pH	1570,3288	287,7327	<,0001 *
Tipo de aceite	4664,8425	540,5557	<,0001 *
Temperatura	-28,01453	35,96659	0,4389
Fase acuosa	-123,0164	27,02779	<,0001 *
Relación Volumen	854,64625	270,2779	0,0024 *
(pH-7,2)*(Tipo de aceite-0,5)	3324,9111	569,7957	<,0001 *
(pH-7,2)*(Temperatura-48,4)	-15,07201	37,77248	0,6912
(pH-7,2)*(Fase acuosa-20)	-72,08986	28,48979	0,0139 *
(pH-7,2)*(Relación Volumen-5)	723,05	284,8979	0,0136 *
(Tipo de aceite-0,5)*(Temperatura-48,4)	-67,23993	71,22447	0,3487
(Tipo de aceite-0,5)*(Fase acuosa-20)	-236,3878	54,05557	<,0001 *
(Tipo de aceite-0,5)*(Relación Volumen-5)	1652,2725	540,5557	0,0033 *
(Temperatura-48,4)*(Fase acuosa-20)	11,007899	3,561223	0,0030 *
(Temperatura-48,4)*(Relación Volumen-5)	-16,62552	35,61223	0,6422
(Fase acuosa-20)*(Relación Volumen-5)	-7,060375	27,02779	0,7948

Para las interacciones significativas se puede observar los siguientes aspectos:

- En la superficie de respuesta para Tipo de aceite y pH ($P < 0,0001$) se encontró que a pH 8 y aceite refinado se obtiene la mayor cantidad de metilésteres (Fig. 14),

mientras que el efecto de la interacción del aceite crudo con los dos pH evaluados es menor.

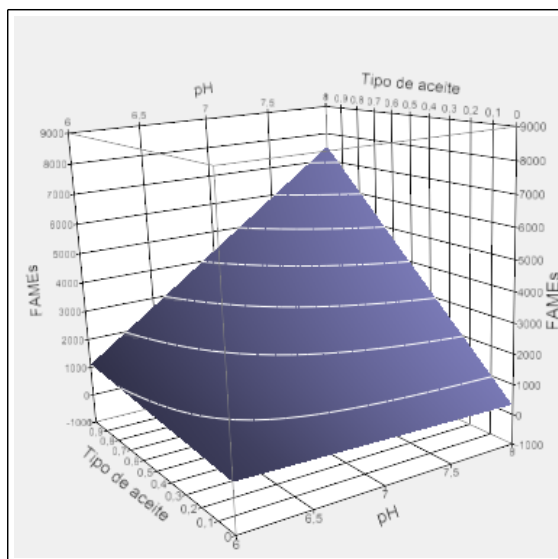


Figura 14. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de tipo de aceite y pH para el ensayo preliminar

Esto es coherente con los resultados obtenidos por Talukder (2009), quien encontró que el contenido de fosfolípidos presentes en el aceite crudo interfiere en el rendimiento de la reacción. Los fosfolípidos son el principal componente de la goma del aceite, la cual aumenta la viscosidad y reduce la transferencia de masa. Al retirar esta goma, la metanólisis del aceite de palma se desarrolla más rápido, sin embargo el rendimiento de la reacción tanto en aceite crudo como refinado es equiparable.

Sim (2010) centrifugó el aceite crudo a 3600 RPM a 30°C por 10 minutos para decantar impurezas y fosfolípidos sólidos. El sobrenadante obtenido fue utilizado como fuente de triglicéridos en la transesterificación con metanol y tertbutanol

como cosolvente y Lipozyme TL IM (lipasa de *Thermomyces lanuginosus*), obteniendo rendimientos alrededor de 85% después de 6 horas de reacción.

Watanabe (2002) también obtuvo los mismos resultados al comparar el efecto de fosfolípidos obtenidos del aceite de soya con los obtenidos de la yema de huevo en la transesterificación de aceite de soya con Novozym 435, encontrando que los fosfolípidos del aceite vegetal se unen con mayor fuerza que los de la yema de huevo a la enzima inmovilizada al ser más difíciles de retirar y regenerar la enzima, infiriendo que esto se debe a la diferencia en la composición de ambos fosfolípidos, u otros compuestos presentes en el aceite de soya que ayudan a la unión de estos a la enzima.

Para nuestro caso no se realizó ningún procedimiento preliminar para retirar los fosfolípidos en el aceite crudo, por tanto se podría considerar que este es un factor no controlado que puede afectar la reacción. A su vez, al analizar las líneas de contorno en la superficie de respuesta, se observa que la tendencia es ascendente hacia el valor más alto de pH, es decir, a mayor pH, mayor rendimiento molar.

- La interacción entre el tipo de aceite y fase acuosa ($P < 0,0001$) presenta una mayor producción de metilésteres con aceite refinado y 10% de fase acuosa (Fig. 15). El aumento de la fase acuosa de 10% a 30% con aceite crudo genera un incremento no significativo en la cantidad final de metilésteres. Por el contrario, con aceite refinado, la reducción de fase acuosa genera un aumento en la respuesta. De acuerdo a lo anterior, el efecto de la fase acuosa es diferente e inverso para cada tipo de aceite en este caso.

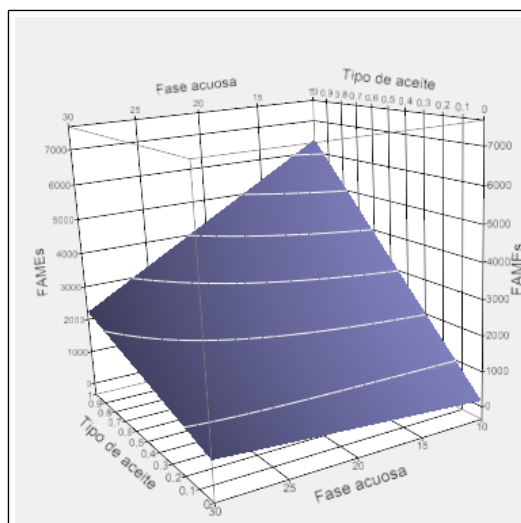


Figura 15. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de tipo de aceite y fase acuosa para el ensayo preliminar

Atadashi (2012) afirma que el agua es muy importante en la reacción de transesterificación debido a que es necesaria una cantidad mínima para que la lipasa conserve su actividad en solventes orgánicos. Al mismo tiempo, la lipasa cambia su papel dependiendo si la interfase en la que se encuentra es acuosa o si es un solvente orgánico. El agua propicia el aumento del área interfacial; pero por otro lado, la lipasa es más flexible cuando hay un exceso de agua, lo que resulta en reacciones secundarias no deseadas como la hidrólisis de los ácidos en las reacciones de transesterificación. Por tanto, la cantidad de agua requerida para maximizar la actividad es determinada para cada lipasa en particular, dependiendo de las materias primas, la lipasa, el soporte de inmovilización y el solvente utilizado.

De acuerdo a Fjerbaek (2009), el agua es importante para la configuración de la enzima y el retiro de esta puede generar cambios reversibles e irreversibles en la estructura. La cantidad de agua óptima en un sistema, al igual que el sustrato, el solvente y posiblemente también el material de inmovilización o soporte influyen en la reacción y son específicos para cada tipo de enzima como se observó en los

resultados de Kaieda *et al.* (2001), Linko *et al.* (1995), Tan *et al.* (2006), Zhang *et al.* (2002, 2005), y Lu *et al.* (2008).

Al analizar las líneas de contorno en la superficie de respuesta (Fig. 15) se observa que la tendencia de estas apunta hacia un máximo al disminuir la fase acuosa.

- La interacción entre pH y fase acuosa es significativa ($P=0,0139$) y en la superficie de respuesta generada (Fig. 16) se observa que a pH 6 no hay diferencia con los dos volúmenes de fase acuosa analizados, mientras que a pH 8 la respuesta es mayor con el uso de 10% de fase. En la gráfica también se observa el efecto individual del pH al tener pendientes positivas con su aumento para los dos niveles de fase acuosa.

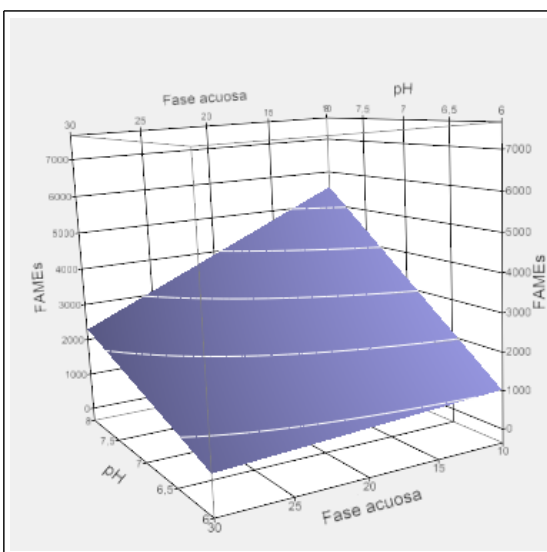


Figura 16. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de pH y fase acuosa para el ensayo preliminar

Chartrain (1993) reportó como resultado de su trabajo con una lipasa de *P. aeruginosa* MB5001 una máxima actividad a 55°C y pH óptimo de 8.0. De igual manera, Borkar (2009) reportó una actividad máxima a 55°C y pH 6,9 con una

lipasa de *P. aeruginosa* SRT9 y afirma que esta lipasa es más estable comparada con la lipasa de *P. aeruginosa* EF2 reportada por Gilbert con una temperatura óptima de 55°C y un rango de pH entre 6,5 a 7,5. Las anteriores lipasas son similares a la lipasa estudiada en el presente trabajo, pues se encuentran alrededor de un peso molecular de 29 kDa y muestran mejores rendimientos hacia pH alcalinos como pH óptimo para la reacción de transesterificación.

Por otro lado Gaur (2008) encontró una lipasa de *P. aeruginosa* PseA con un peso molecular alrededor de 60 kDa que trabaja a 40°C y pH 8, siendo estable en pH entre 6 a 8.5. Con estos resultados de estabilidad obtenidos afirma que este tipo de lipasas en su forma natural son alcalinas y a su vez es coherente con otros rangos de trabajo para lipasas obtenidas de *P. aeruginosa* reportadas por otros autores.

- En la interacción entre la relación volumen aceite-alcohol y tipo de aceite (P=0,0033) se observa una mayor producción de metilésteres con la relación aceite-alcohol 1:6 y aceite refinado (Fig. 17).

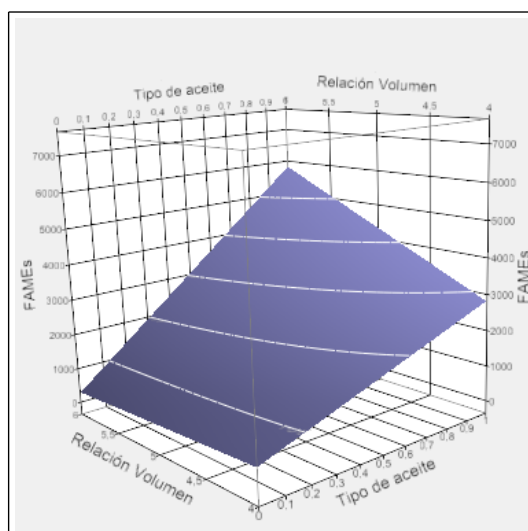


Figura 17. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de la relación volumen aceite-alcohol y tipo de aceite para el ensayo preliminar

Al utilizar aceite crudo se observa que no hay diferencia entre las dos relaciones aceite-alcohol analizadas. De igual manera, la gráfica muestra el efecto individual del tipo de aceite al tener una mayor respuesta para las dos relaciones aceite-alcohol al cambiar de aceite crudo a aceite refinado (variables codificadas como 0 y 1 respectivamente).

Ana (2007) realizó pruebas con una lipasa obtenida de *P. fluorescens* transesterificando aceite de palma con etanol utilizando una relación estequiométrica 1:18 a 58°C y 20% de enzima, obteniendo conversión del 98% en menos de 24 horas. Bajo la misma línea, Stamenkovic (2011) trabajó con una lipasa (lipasa AK) de *P. fluorescens* con aceite de palma y etanol a 40°C bajo las mismas condiciones del trabajo mencionado anteriormente, obteniendo el mismo porcentaje de conversión (98%) (Babu y Goud, 2012).

De acuerdo a Abbaszadeh (2012), para la síntesis por transesterificación se requiere como mínimo la cantidad estequiométrica de metanol para la conversión completa de los triglicéridos a sus correspondientes ésteres. Sin embargo, la metanólisis disminuye significativamente al adicionar la mitad de las moles necesarias al principio de la reacción de transesterificación biocatalizada. Esta reducción en la actividad causada por los alcoholes polares de cadena corta es el mayor obstáculo para la producción enzimática de biodiésel (T. Tan *et al.*, 2010).

Al analizar las líneas de contorno en la gráfica (Fig. 17), se observa que tienden hacia un máximo al aumentar la relación volumen aceite:alcohol, contrario a los resultados reportados para este tipo de enzimas, por tanto fue uno de los factores primordiales en los diseños experimentales posteriores.

- En la interacción entre la relación de volumen aceite-alcohol y pH ($P=0,0136$) se observa que a pH 6, la interacción con las dos relaciones aceite-alcohol no presenta una diferencia considerable, mientras que a pH 8 se observa una interacción positiva

al utilizar la relación de volumen aceite-alcohol 1:6 (Fig. 18). En esta superficie de respuesta también se puede evidenciar el efecto individual del pH para las dos relaciones aceite-alcohol al observar pendientes positivas y por tanto, un incremento en la cantidad de metilésteres para ambos casos con el pH más alto.

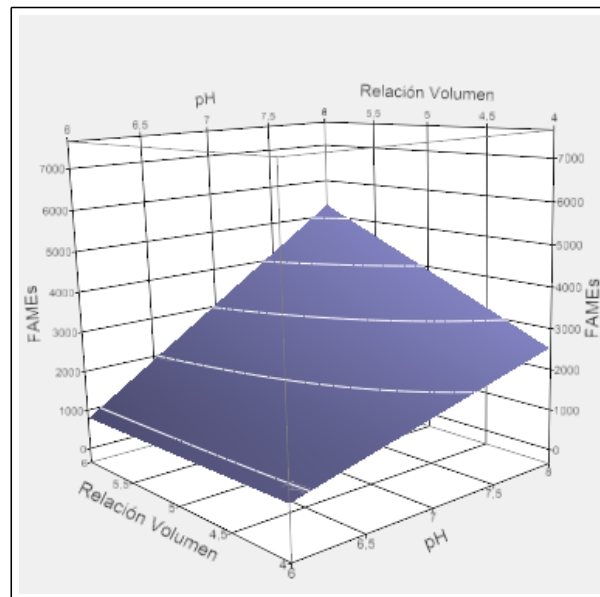


Figura 18. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación volumen aceite-alcohol y pH para el ensayo preliminar

- En la interacción de temperatura-fase acuosa ($P=0,0033$) se observa una mayor cantidad de metilésteres a 42°C y 10% de fase acuosa. La interacción entre la temperatura más alta (58°C) y los volúmenes de fase acuosa no tiene efecto, posiblemente por la alteración de la proteína a esta temperatura, mientras que a 42°C se observa una interacción fuerte con la cantidad de fase acuosa al disminuir esta a 10%.

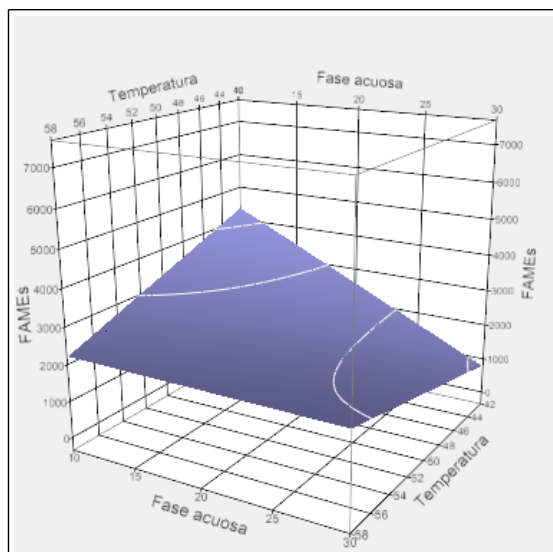


Figura 19. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de temperatura y fase acuosa para el ensayo preliminar

El efecto individual de la fase acuosa concuerda con el efecto individual observado en las gráficas de superficie de respuesta analizadas previamente (aceite-fase acuosa y pH-fase acuosa), en donde no presenta efecto la interacción para 30% de fase, mientras que en todos los casos la mayor respuesta se obtiene con 10% de agua. De igual forma, al analizar las líneas de contorno sobre las superficies de respuesta, se observa que tienen una tendencia hacia un punto máximo que se presenta en el vértice de 10% de fase acuosa (optimización descendente).

De acuerdo a los resultados obtenidos, todos los factores presentan interacciones de primer orden significativas a pesar de que no todos tienen significancia a nivel individual. En consecuencia, todos deben ser tenidos en cuenta en la reacción al ser más importantes los efectos de las interacciones frente a los efectos individuales (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

El mejor tratamiento encontrado para la obtención de metilésteres en la transesterificación catalizada con el extracto enzimático liofilizado fueron: Temperatura 42°C, Relación en volumen Aceite:alcohol 1:6, 10% volumen de fase acuosa con base en la cantidad de aceite, pH 8 y aceite refinado RBD. Esto se puede confirmar por medio del análisis de varianza generado por el programa JMP, en el cual se obtuvo una correlación lineal con un coeficiente de determinación de 0,7737 utilizando un $\alpha=0,05$ (Anexo F).|

Por otro lado, al descomponer el error en falta de ajuste (*Lack of fit*) y error puro, se observa que la falta de ajuste no es significativa, por tanto no hay evidencia de curvaturas en las interacciones analizadas. Esto quiere decir que el área de experimentación en este ensayo está dentro del área de operatividad de la reacción, pero aún no está cerca de un punto óptimo en donde se ubique un posible máximo.

5.2.1.2 Escala y relación aceite-alcohol Para este ensayo, los datos arrojados por GC se transformaron para compararlos en función del volumen de reacción y poder tomar decisiones acerca del cambio de escala (100 y 10 mL) para manejar menores cantidades de extracto y reactivos (Anexo G).

El ensayo permitió identificar a través de gráficos de barras de las medias de respuesta en función de los dos factores (Fig. 20) que el uso de la relación en volumen 1:6 (relación estequiométrica 1:148,6) en lugar de la relación estequiométrica 1:6 tienen un efecto positivo en la cantidad de metilésteres. Además, se observó que la cantidad de metilésteres por mililitro obtenida bajo las dos escalas de reacción evaluadas varía considerablemente, observando un incremento con la escala más pequeña (vial de 10 mL). Este incremento probablemente está relacionado con el aumento del contacto entre los elementos del sistema (aceite-metanol-interfase) generado por la disminución del volumen o espacio en el cual se lleva a cabo la reacción, lo que conlleva a un mayor número de interacciones entre las fases, generando un aumento en la respuesta.

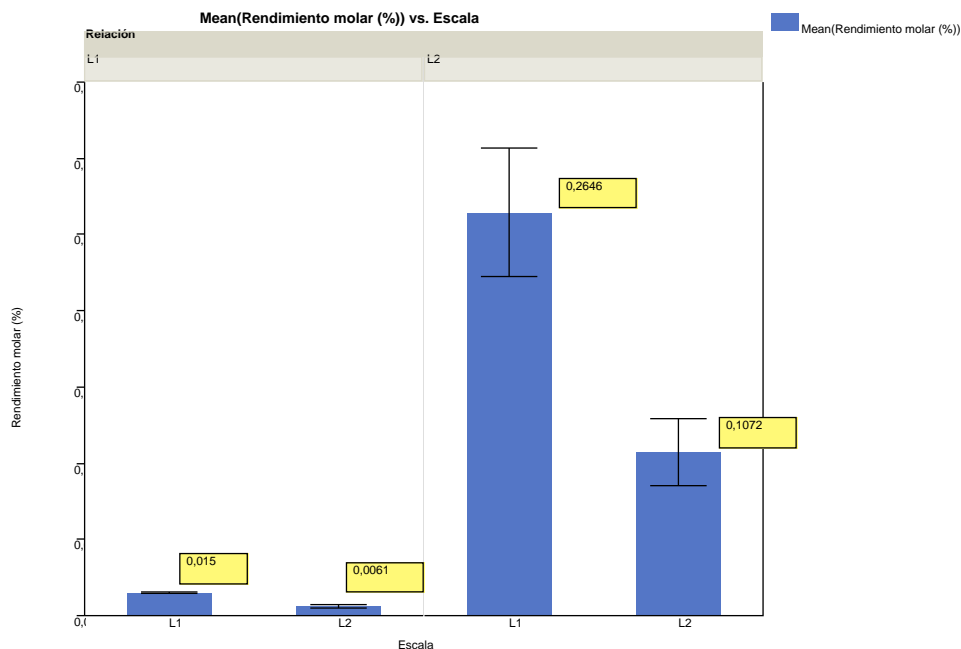


Figura 20. Gráfico de barras para la media de respuesta en función de la escala y el tipo de relación aceite:metanol

Este resultado es coherente con las afirmaciones de Itabaiana (2013) en relación a que los reactores que mejor desempeño presentan para las reacciones enzimáticas son los de lecho empacado, en donde se empaqueta el catalizador en una columna y se hace pasar medio de reacción a un flujo continuo durante un tiempo de residencia que permita que la reacción se lleve a cabo. La ventaja de este tipo de reactores es el aumento del área de contacto al disminuir el volumen en el cual se lleva a cabo la reacción, generando mayores interacciones entre la enzima y el sustrato.

De acuerdo a la exploración de los datos, se obtuvo un rendimiento promedio de 0,0982% (mediana: 0,0514%), con un máximo de 0,3% (Anexo G).

5.2.1.3 Concentración de enzima y relación estequiométrica De acuerdo a los pesos calculados (Anexo C) y con base en los porcentajes presentes de cada ácido en el aceite, se determinó que una mol de aceite de palma tiene un peso de 902 gramos.

Siguiendo la tendencia de los resultados anteriores (5.2.1.2), se realizó un diseño experimental para determinar el efecto de la cantidad de metanol presente en la reacción, calculando las cantidades a utilizar en cada tratamiento (Tabla 15)

Tabla 15. Cantidades calculadas de aceite y alcohol para diferentes relaciones estequiométricas en la reacción de transesterificación

Relación estequiométrica aceite:alcohol	Volumen de aceite (mL)	Peso aceite (g)	Moles de aceite	Moles de alcohol	Peso alcohol (g)	Volumen alcohol (mL)
1:56	1	890 mg	$9,867 \times 10^{-4}$	0,0553	1,7680	2,2329
1:106	1	890 mg	$9,867 \times 10^{-4}$	0,1046	3,3469	4,2269
1:156	1	890 mg	$9,867 \times 10^{-4}$	0,1539	4,9254	6,2206
1:206	1	890 mg	$9,867 \times 10^{-4}$	0,2032	6,5043	8,2146

De acuerdo a la literatura, es necesario un exceso de moles en la reacción de transesterificación. Sin embargo, las relaciones estequiométricas superiores a 6 moles de alcoholes de cadena corta por mol de aceite generan inactivación en las lipasas utilizadas para la obtención de metilésteres a partir de triglicéridos.

Según los parámetros estimados (Tabla 16), los dos factores de manera individual y la interacción tienen efectos significativos en el resultado ($P < 0,0001$ y $P = 0,0002$ respectivamente).

Tabla 16. Parámetros estimados y error para el ensayo de concentración de extracto y relación estequiométrica

Parameter Estimates			
Term	Estimate	Std Error	Prob> t
Intercept	-0,527451	0,177992	0,0087 *
Concentración	0,0080844	0,001074	<,0001 *
Relación estequiometrica	0,0098473	0,000911	<,0001 *
(Concentración-77,3913)*(Concentración-77,3913)	-1,857e-5	3,014e-5	0,5460
(Concentración-77,3913)*(Relación estequiometrica-132,087)	0,0000884	1,859e-5	0,0002 *
(Relación estequiometrica-132,087)*(Relación estequiometrica-132,087)	-5,033e-5	2,072e-5	0,0265 *

Se puede observar en la superficie de respuesta (Fig. 21) que al utilizar la relación estequiométrica 1:56 la concentración de enzima no afecta la cantidad de metilésteres obtenidos, pero al aumentar el nivel de ambos factores, la respuesta mejora mostrando una tendencia hacia un punto máximo.

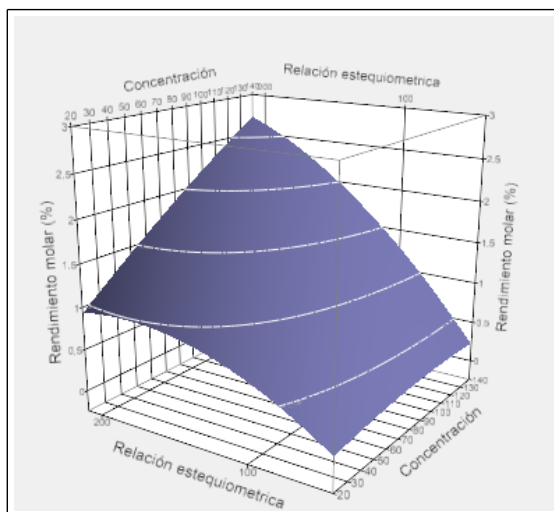


Figura 21. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de Relación estequiométrica y Concentración

Por otro lado, el efecto de inhibición por exceso de alcohol típico en este tipo de reacciones no es evidente en esta gráfica. Para descartar este efecto fue necesario analizar de manera

independiente las relaciones estequiométricas en función de las concentraciones de solución del extracto enzimático utilizadas (Fig. 22).

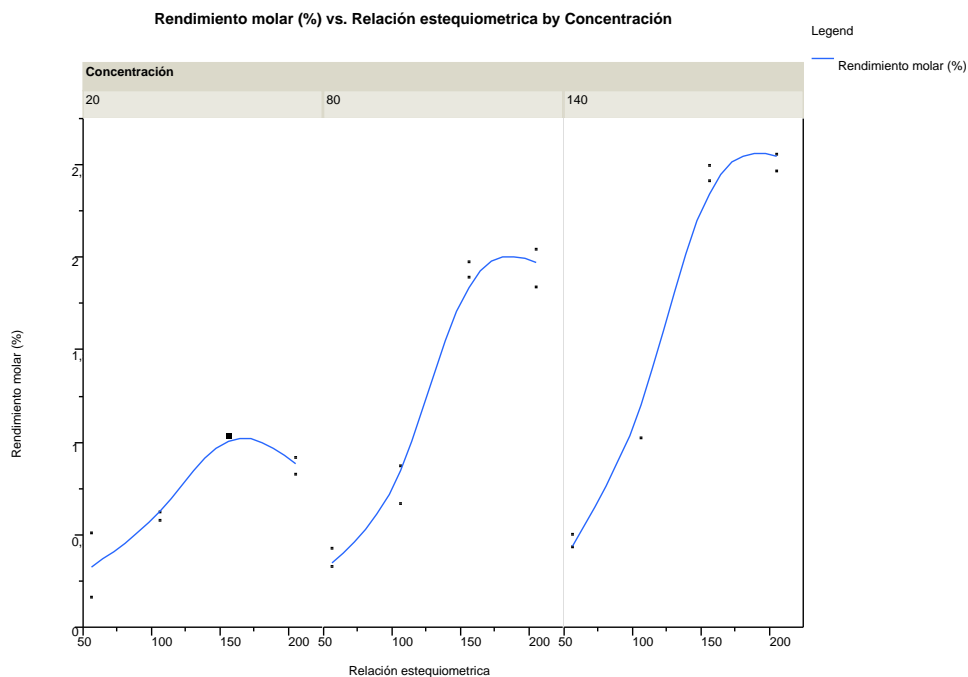


Figura 22. Efecto de la concentración y la relación estequiométrica en la reacción

En la figura 22 se observa que a medida que aumenta la relación estequiométrica hay un aumento de la cantidad de metilésteres generados hasta llegar a una relación estequiométrica máxima de 1:156 para cada concentración de extracto. Así mismo, relaciones estequiométricas superiores a 1:156 inciden de forma negativa en los tres niveles analizados de concentración de extracto.

Este comportamiento indica que probablemente en la medida que la concentración de extracto aumenta, se incrementa la cantidad de enzima disponible para la reacción y se genera una mayor cantidad de complejos enzima-sustrato, aumentando a su vez la cantidad de metilésteres obtenidos antes de generarse el bloqueo de los sitios catalíticos. Sin

embargo, el aumento de concentración de 60 mg por mL tiene un efecto mayor al pasar de 20 a 80 mg por mL que al pasar de 80 a 140 mg por mL (1% y 0,5% respectivamente).

Este comportamiento es similar al resultado obtenido por Shah (2007) con una lipasa de *P. cepacia* (Fig. 23), quien probó concentraciones entre 2,5 y 20% en peso de lipasa con respecto al aceite, obteniendo los mayores rendimientos (70%) al utilizar 15% de lipasa. El presente ensayo solo se pudo llevar a cabo con un máximo de 9,44% de extracto enzimático (Tabla 17), debido a la disponibilidad de este.

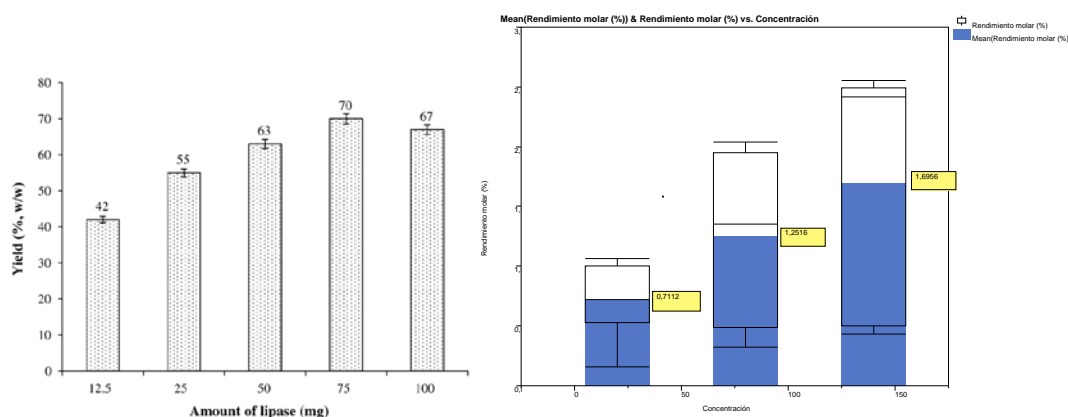


Figura 23. Efecto de diferentes porcentajes de lipasa con respecto a la cantidad de aceite. Izquierda: Resultados para una lipasa de *P. cepacia* como catalizador en la transesterificación de aceite de *Jatropha* (0,5 g) con etanol utilizando una relación molar 1:4. Fuente: Shah (2007). Derecha: Resultados obtenidos con las tres concentraciones de lipasa evaluadas.

Tabla 17. Cálculo del porcentaje de enzima con respecto al aceite presente en el medio de reacción

Concentración de extracto (mg. Extracto liofilizado/ml Sln)	Extracto enzimático en la reacción (mg)	% Extracto en relación con el aceite (% m/m)
20	12	1,35
80	48	5,39
140	84	9,44

El patrón observado se confirma con el análisis estadístico. Ambos factores presentan un efecto individual, pero el efecto más fuerte lo presenta la concentración de enzima (Tabla 16). Sin embargo, el efecto prioritario para la reacción en este ensayo es la interacción entre ambos factores. Estos resultados están soportados en el análisis de superficie de respuesta, en donde se analizaron los datos utilizando un $\alpha=0,05$ obteniendo un coeficiente de determinación de 0,93 (Anexo H).

Al descomponer el error se observa que la falta de ajuste no es significativa, lo cual indica que las interacciones analizadas son lineales y no hay curvaturas en el efecto de las mismas, a pesar de que existe una interacción de segundo orden con significancia (Relación estequiométrica*Relación estequiométrica, $P=0,0265$).

Se debe tener en cuenta que al aumentar la concentración de extracto enzimático en la solución, se está dejando constante la cantidad de agua que conforma la interfase de reacción, proveyendo al medio más moléculas de enzima. Por tanto, es necesario establecer si la cantidad de agua en el medio de reacción afecta la cantidad de metilésteres obtenidos.

Para esto, se calculó el porcentaje de extracto enzimático frente al aceite (Tabla 17). La literatura reporta el uso entre el 2 y el 10%, y para este ensayo se obtuvo la mayor conversión con 9,44% de extracto (84 mg de extracto enzimático liofilizado para 890 miligramos de aceite de palma RBD). Además, se obtuvo un rendimiento molar promedio en el ensayo de 1,1987% (mediana: 0,9156%), con un máximo de 2,55% y un mínimo de 0,32%.

5.2.1.4 Relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua en el medio de reacción De acuerdo a la literatura revisada, el exceso de alcohol por encima de la relación estequiométrica balanceada aceite-alcohol 1:3 genera inhibición de la enzima por bloqueo de los sitios catalíticos por parte de las moléculas de alcohol, evitando la formación del complejo enzima-sustrato. Se han estudiado diferentes maneras de evitar esta

inhibición planteando formas de manejo de la relación estequiométrica y evitar la saturación por alcohol, encontrándose la relación 1:6 como la máxima recomendada.

Otra forma de evitar la inhibición por exceso de alcohol es realizar la adición de moles de este por etapas teniendo en cuenta que la reacción es secuencial, evitando el exceso que se genera al colocar el total del volumen definido para la reacción desde el inicio.

Una tercera forma de evitar la inhibición por alcohol es utilizando un solvente orgánico que ayude a la solubilización del aceite en el alcohol logrando un medio de reacción homogéneo.

Dentro de los parámetros que afectan la reacción está la cantidad de agua presente en el medio. Es necesaria una fase acuosa en la cual se encuentra la lipasa y a través de la cual se forma una interfase entre el aceite y el alcohol.

Se calculó las cantidades de sustrato y metanol para cada tratamiento, de acuerdo a la tabla 18.

Tabla 18. Cantidades calculadas de aceite y alcohol para las relaciones estequiométricas a probar en la reacción de transesterificación

Relación estequiométrica aceite:alcohol	Volumen de aceite (mL)	Peso aceite (g)	Moles de aceite	Moles de alcohol	Peso alcohol (g)	Volumen alcohol (mL)
1:6	5	4,45	$4,933 \times 10^{-3}$	0,0296	0,9484	1,1975
1:156	1	0,89	$9,867 \times 10^{-4}$	0,1539	4,9254	6,2146

De acuerdo a los parámetros estimados (Tabla 19) se puede observar que la relación estequiométrica es el único factor que tiene un efecto fuerte de manera individual

($P < 0,0001$), coincidiendo con la significancia mostrada por este factor en el ensayo anterior (5.2.1.3). Al analizar las interacciones entre factores, solo la interacción entre el solvente y el agua tiene un efecto significativo ($P = 0,0194$).

Tabla 19. Parámetros estimados y error para el ensayo de relación estequiométrica aceite-alcohol, adición secuencial y volumen de agua y aceite

Parameter Estimates			
Term	Estimate	Std Error	Prob> t
Intercept	1,5744875	0,126528	<,0001 *
Relación estequiometrica	0,8825063	0,126528	<,0001 *
Agua	-0,037619	0,126528	0,7696
Adición secuencial	-0,135463	0,126528	0,2985
Cosolvente	-0,194775	0,126528	0,1411
Block[1]	-0,364737	0,219152	0,1134
Block[2]	0,3077	0,219152	0,1773
Block[3]	-0,026262	0,219152	0,9059
Relación estequiometrica*Agua	-0,134613	0,126528	0,3014
Relación estequiometrica*Adición secuencial	-0,095094	0,126528	0,4620
Relación estequiometrica*Cosolvente	-0,071956	0,126528	0,5766
Agua*Adición secuencial	-0,205544	0,126528	0,1217
Agua*Cosolvente	-0,324819	0,126528	0,0194 *
Adición secuencial*Cosolvente	-0,109737	0,126528	0,3972

Para analizar mejor esta interacción, se graficó su respectiva superficie de respuesta (Fig. 24). El mayor rendimiento se obtuvo en ausencia de cosolvente y 10% v/v de agua, coincidiendo con el resultado del ensayo preliminar (5.2.1.1).

Por otro lado, al utilizar cosolvente (1:1 volumen aceite-hexano), se observa que una menor cantidad de agua en el medio de reacción genera un incremento en la respuesta (rendimiento molar 1,7421% y 1,0172%, para 2% y 10% de fase acuosa respectivamente), por lo tanto se puede afirmar que la enzima en presencia de hexano conserva su actividad y este tiene un efecto positivo. Este efecto combinado confirma la necesidad de una interfase acuosa mínima para que la lipasa pueda actuar sobre los sustratos, y los resultados parecen

indicar de manera preliminar que la lipasa es estable en solventes orgánicos. En este caso, el hexano ayuda a mejorar la interacción entre el sustrato y la enzima.

Este resultado es coherente con el trabajo de Kaieda (2001), quien probó que al disminuir la cantidad de agua por debajo de 4% en peso de sustrato, las lipasas de *P. fluorescens* y *C. rugosa* presentaron rendimientos entre 13% a 40%, pero con cantidades superiores de agua obtuvo rendimientos del 80%. Así mismo, al utilizar lipasa de *P. cepacia* con 1% hasta 20% obtuvo rendimientos del 80%, probando que esta lipasa tiene mayor resistencia al metanol, y para el caso de las otras dos lipasas probadas, al no tener suficiente agua en el medio de reacción, estas fueron inactivadas por el alcohol.

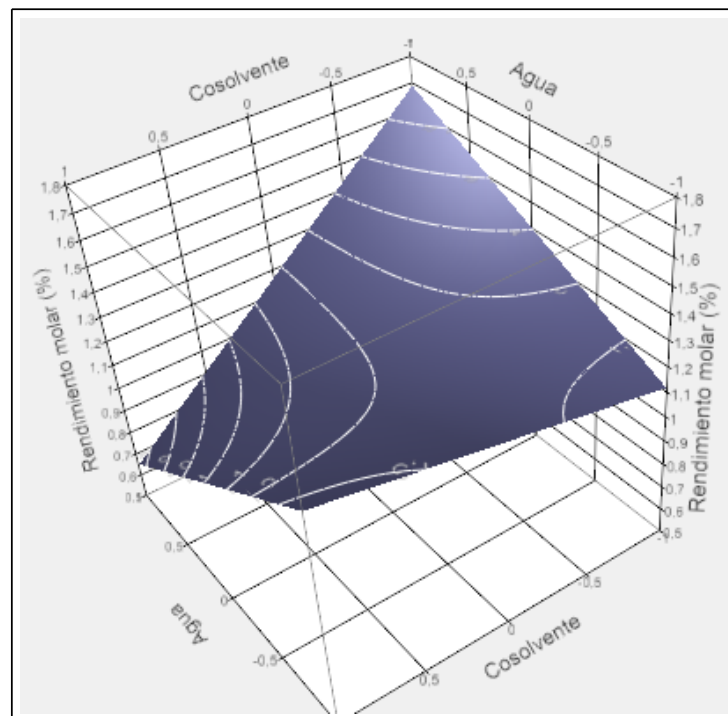


Figura 24. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y cantidad de agua presente en el medio de reacción

La disminución del rendimiento con el uso de cosolvente comparado con la reacción en ausencia de este puede ser debido al aumento del área de la interfase de reacción (agua-sustrato) por un exceso de volumen de hexano, provocando aislamiento de la lipasa. Esto es evidente en este ensayo debido a que la cantidad de agua tiene un efecto fuerte en ausencia de hexano (Fig. 24), lo cual es de esperarse ya que siempre es necesario un volumen mínimo de agua para la reacción.

A partir de los resultados obtenidos en este punto, es necesario establecer más adelante la cantidad de cosolvente adecuada para homogenizar el medio y generar una microemulsión, sin generar el aislamiento por volumen (5.2.2).

Para este ensayo, se obtuvo un rendimiento molar promedio de 1,5744% (mediana: 0,9963%), con un máximo de 4,2453% y un mínimo de 0,2016%. Los resultados obtenidos están soportados en el análisis de varianza, el cual arrojó una correlación de 0,79 con un α de 0,05 (Anexo I). Además, no se evidencia presencia de curvaturas al descomponer la falta de ajuste en el análisis.

5.2.2 Análisis del efecto de la purificación

5.2.2.1 Análisis de cromatografía de gases Al observar los resultados de las áreas en los cromatogramas obtenidos por GC (Anexo L), los porcentajes de las áreas de cada uno de los metilésteres obtenidos coinciden con la composición teórica asumida de ácidos grasos del aceite de palma, permitiendo afirmar que la lipasa no presenta selectividad frente a un ácido graso específico. Este resultado coincide con lo reportado con Kaieda (2001), quien trabajó con lipasa de *P. cepacia* y *P. fluorescens*, afirmando que estas lipasas no presentan especificidad

5.2.2.2 Análisis de superficies de respuesta El análisis de los metilésteres identificados por GC con regresión lineal en el programa JMP ($\alpha=0,05$), permitió establecer que todas las interacciones entre los factores involucrados en el ensayo son significativas. A su vez, los efectos individuales del aumento de cada factor son negativos, a excepción del pH, demostrando que el pH tiene una alta incidencia en los resultados obtenidos (Tabla 20).

Tabla 20. Parámetros estimados y error para el ensayo final

Parameter Estimates					
Term		Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	Biased	7,8096274	1,113595	7,01	0,0022 *
Catalizador		-1,932725	0,543379	-3,56	0,0027 *
Fase Acuosa		-4,961863	0,543379	-9,13	0,0008 *
Cosolvente		-3,375432	0,543379	-6,21	0,0034 *
Relación estequiometrica		-1,684848	0,543379	-3,10	0,0362 *
pH		4,333731	0,543379	7,97	0,0013 *
Catalizador*Catalizador	Biased	2,1431576	1,239094	1,73	0,1588
Catalizador*Fase Acuosa		2,6513834	0,543379	4,88	0,0082 *
Fase Acuosa*Fase Acuosa	Zeroed	0	0	.	.
Catalizador*Cosolvente		2,0741413	0,543379	3,82	0,0188 *
Fase Acuosa*Cosolvente		2,4252106	0,543379	4,46	0,0111 *
Cosolvente*Cosolvente	Zeroed	0	0	.	.
Catalizador*Relación estequiometrica		1,6952809	0,543379	3,12	0,0355 *
Fase Acuosa*Relación estequiometrica		2,3150374	0,543379	4,26	0,0130 *
Cosolvente*Relación estequiometrica		4,3403218	0,543379	7,99	0,0013 *
Relación estequiometrica*Relación estequiometrica	Zeroed	0	0	.	.
Catalizador*pH		-4,500936	0,543379	-8,28	0,0012 *
Fase Acuosa*pH		-3,623709	0,543379	-6,67	0,0026 *
Cosolvente*pH		-1,602121	0,543379	-2,95	0,0420 *
Relación estequiometrica*pH		-2,12292	0,543379	-3,91	0,0174 *
pH*pH	Zeroed	0	0	.	.

Para confirmar la significancia de las interacciones estadísticamente, se realizó un diagrama de Pareto con los parámetros estandarizados (Tabla 21), es decir, relacionándolos con su respectivo error estándar (Gutiérrez P y De la Vara, 2008).

Tabla 21. Cálculo de los parámetros estandarizados para graficar el diagrama de Pareto

Parameter Estimate Population					
Term	Estimate	t Ratio	Orthog Coded	Orthog	Orthog t-Ratio > t
Intercept	7,80963	7,0130	10,4743	22,0836	<.0001 *
Catalizador	-1,93272	-3,5569	-1,6870	-3,5569	0,0237 *
Fase Acuosa	-4,96186	-9,1315	-4,3311	-9,1315	0,0008 *
Cosolvente	-3,37543	-6,2119	-2,9463	-6,2119	0,0034 *
Relación estequiometrica	-1,68485	-3,1007	-1,4707	-3,1007	0,0362 *
pH	4,33337	7,9749	3,8085	8,0296	0,0013 *
Catalizador*Catalizador	2,14316	1,7296	0,8204	1,7296	0,1588
Catalizador*Fase Acuosa	2,65138	4,8794	2,3143	4,8794	0,0082 *
Fase Acuosa*Fase Acuosa
Catalizador*Cosolvente	2,07414	3,8171	1,8105	3,8171	0,0188 *
Fase Acuosa*Cosolvente	2,42521	4,4632	2,1169	4,4632	0,0111 *
Cosolvente*Cosolvente
Catalizador*Relación estequiometrica	1,69528	3,1199	1,4798	3,1199	0,0355 *
Fase Acuosa*Relación estequiometrica	2,31504	4,2604	2,0207	4,2604	0,0130 *
Cosolvente*Relación estequiometrica	4,34032	7,9877	3,7885	7,9877	0,0013 *
Relación estequiometrica*Relación estequiometrica
Catalizador*pH	-4,50094	-8,2832	-3,9287	-8,2832	0,0012 *
Fase Acuosa*pH	-3,62371	-6,6688	-3,1630	-6,6688	0,0026 *
Cosolvente*pH	-1,60212	-2,9484	-1,3984	-2,9484	0,0420 *
Relación estequiometrica*pH	-2,12292	-3,9069	-1,8530	-3,9069	0,0174 *
pH*pH

A partir de las tablas de distribución T de Student y utilizando un $\alpha/2$ de 0,025 y 4 grados de libertad, se obtiene un valor crítico de 2,7764. Observando los valores estandarizados, se confirma que los efectos de las interacciones tienen significancia y por esta razón, estos efectos pasan a ser más importantes frente a los efectos significativos individuales (Gutiérrez P & De la Vara, 2008). En consecuencia, es necesario analizar las interacciones una a una a través de superficies de respuesta para identificar el efecto de los niveles de cada factor.

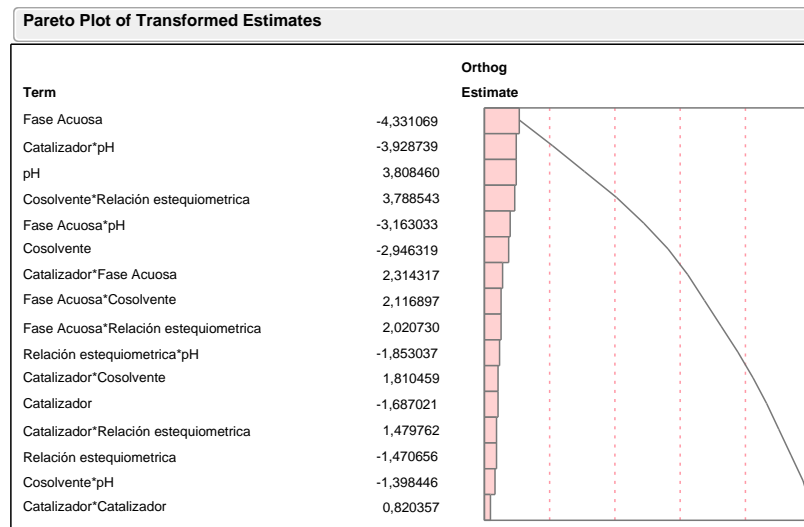


Figura 25. Diagrama de Pareto para los efectos identificados en el ensayo de optimización

Con base en el diagrama de Pareto, el efecto con mayor incidencia en este ensayo es la cantidad de agua presente en el medio de reacción ($P < 0,0008$), confirmando su importancia en el proceso.

Dentro de las interacciones, la relación entre Catalizador y pH ($P < 0,0012$) resulta ser la más importante (Fig. 25). Al analizar esta interacción en una superficie de respuesta (Fig. 26) se observa que para la enzima parcialmente purificada la respuesta es indiferente al cambio de pH, mientras que para el extracto liofilizado la respuesta se incrementa con el aumento de este.

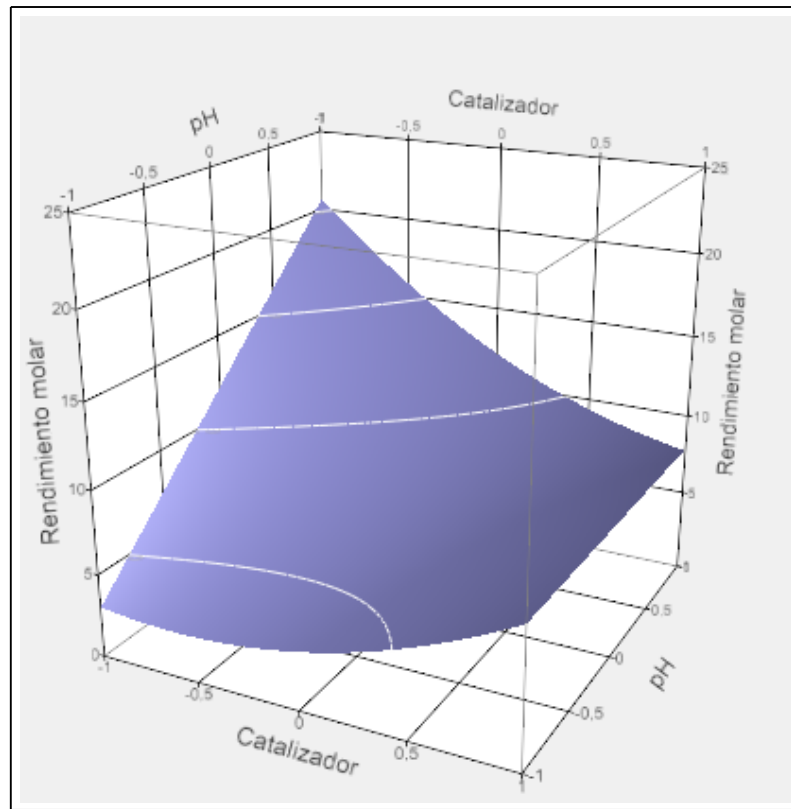


Figura 26. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de catalizador y pH

Sin embargo, al observar los parámetros estimados (Tabla 21) la interacción entre Catalizador-pH es negativa, mientras el efecto individual del pH es positivo. Para determinar el efecto del pH frente a cada tipo de enzima se realizó una gráfica de barras de la media de respuesta para esta interacción (Fig. 27).

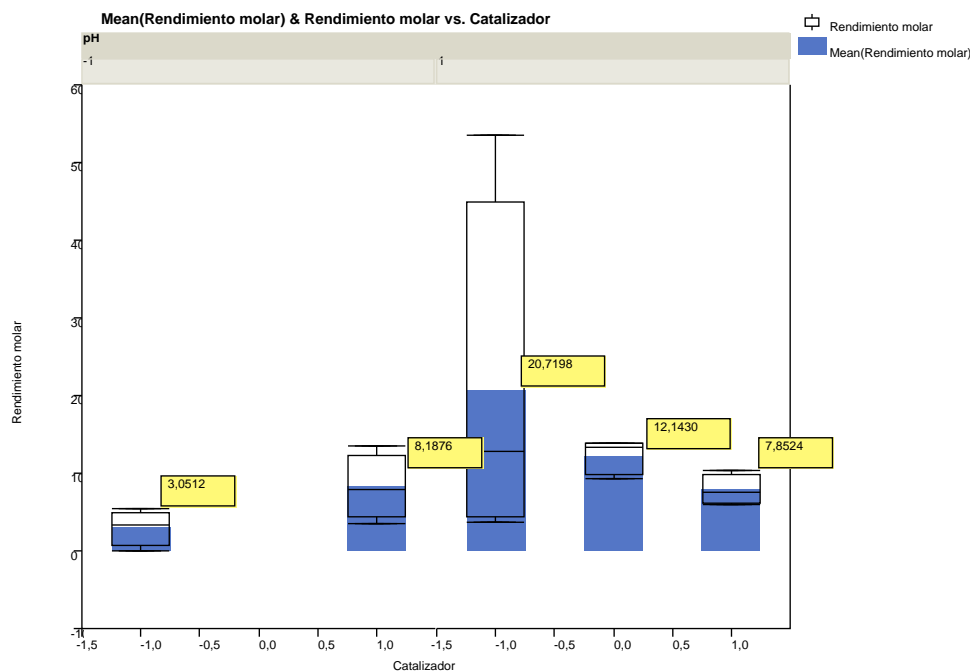


Figura 27. Efecto del pH para cada tipo de enzima (variables codificadas)

Al observar el efecto en los puntos centrales en la gráfica (solo para pH, variables codificadas), el pH 10 por sí solo tiene un efecto individual en la transesterificación. Esto es de esperarse debido a que la transesterificación puede llevarse a cabo a pH elevado a través de un álcali. Este hecho explica los metilésteres obtenidos a pH 10 sin lipasa.

Así mismo se puede observar que a pH 8 la lipasa parcialmente purificada tiene una mejor respuesta comparada con el extracto liofilizado, mientras que a pH 10 se da el caso contrario, posiblemente debido a que la enzima parcialmente purificada es más vulnerable a pH altos que el extracto liofilizado.

Estos resultados a pH 8 coinciden con lo reportado por Alcántara (2004), quien después de obtener etilésteres afirmó que la respuesta está influenciada por el grado de purificación de la enzima porque, a pesar de tener las mismas cantidades de proteína, la cantidad de biocatalizador es diferente, y a mayor grado de purificación, mayor el rendimiento de la reacción, afirmando que este comportamiento está asociado con un incremento de la constante

de especificidad ($k_s=k_{cat}/k_m$). Esto se confirma al analizar la media y la mediana para el extracto y la enzima en la figura 28.

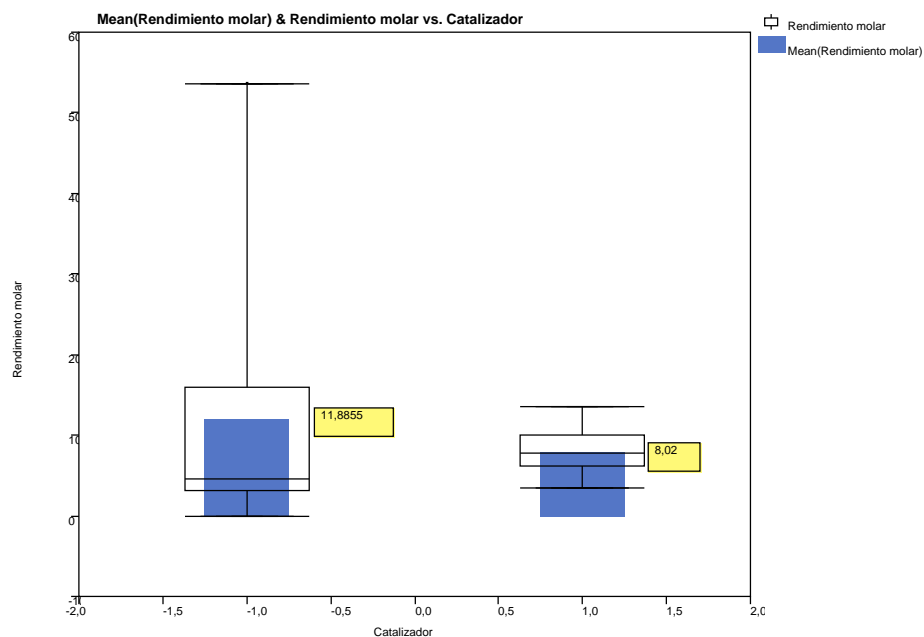


Figura 28. Comparación entre respuestas de extracto liofilizado (izquierda) y enzima parcialmente purificada (derecha)

En la interacción entre Relación estequiométrica y Cosolvente ($P < 0,0013$), se observa que para la relación estequiométrica 1:170 el aumento de 10% a 30% de cosolvente no mejora el rendimiento (Fig. 29). Esto se debe probablemente a que esta relación estequiométrica genera inhibición en el catalizador, al igual que el exceso de solvente posiblemente genera aislamiento.

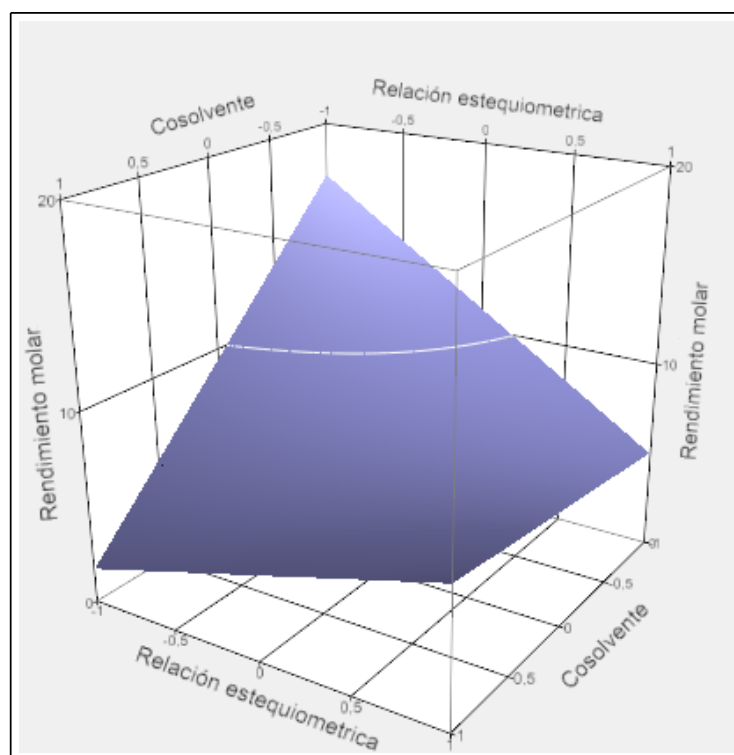


Figura 29. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y cosolvente

Con la relación estequiométrica 1:140 se da el caso contrario. Esta relación está por debajo de la mejor relación molar encontrada previamente (1:156 aceite:metanol), pero a su vez, la disminución de cosolvente de 30% a 10% aumenta considerablemente la cantidad de metilésteres. Por tanto, el mejor resultado se obtuvo con 10% de cosolvente y relación estequiométrica 1:140, confirmando el aislamiento generado por exceso de cosolvente observado en el ensayo anterior (5.2.1.4).

Para la interacción entre Fase acuosa y pH ($P < 0,0026$), se observa que para 10% de fase acuosa el aumento de pH 8 a 10 no incide en la respuesta, mientras que para 5% de fase acuosa este aumento genera un incremento significativo en la respuesta (Anexo M). Sin embargo, el pH 10 tiene un efecto individual y su efecto combinado con la menor cantidad

de agua potencia este efecto al generar una menor interfase. Este resultado coincide con la tendencia observada de esta interacción en el ensayo preliminar con extracto, donde a pH 8 la respuesta aumentó al disminuir el volumen de fase, lo que lleva a la conclusión que la lipasa presenta su mejor actividad para transesterificación a un pH cercano a 8 y baja cantidad de agua.

Al analizar la interacción entre Fase acuosa y Catalizador ($P < 0,0082$) se observa de nuevo que el aumento de la fase acuosa disminuye la cantidad de metilésteres, (Fig. 30).

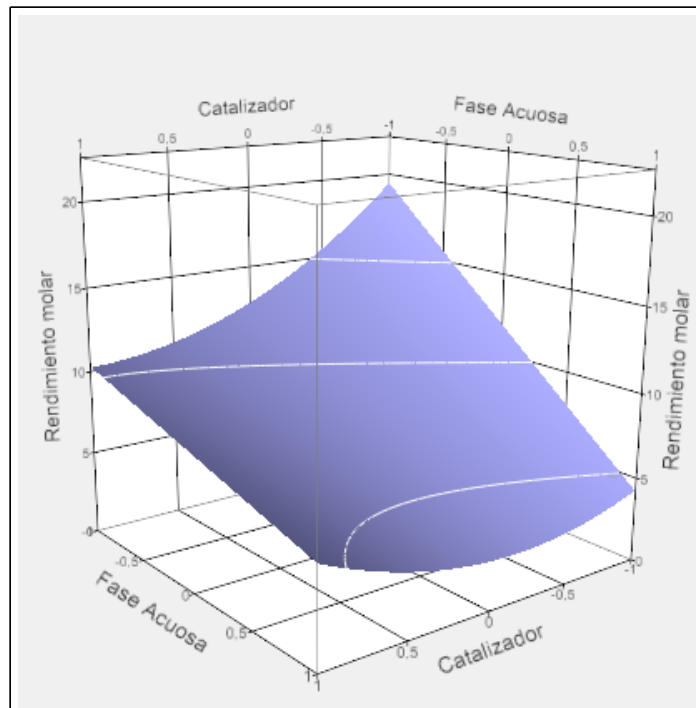


Figura 30. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de fase acuosa y catalizador

Con respecto al tipo de catalizador, se observa un aumento considerable en la cantidad de metilésteres al usar 5% de fase acuosa (variable codificada como -1) tanto con el extracto liofilizado como con la enzima parcialmente purificada, siendo menor este aumento para el segundo caso. Este efecto positivo para ambos se debe al aumento del área interfacial al

disminuir la interfase acuosa, lo cual es coherente con los resultados anteriores. Esta propiedad demuestra que la lipasa necesita bajas cantidades de agua para generar los sistemas de miscelas inversas necesarios para la reacción, aumentando de esta manera el área superficial de la interfase donde actúa.

En la interacción entre Cosolvente y Fase acuosa ($P < 0,0111$) se observa un efecto positivo tanto para la disminución de fase acuosa como para la disminución de cosolvente (5% y 10% v/v en relación con el aceite respectivamente, Anexo N). Esta es una tendencia que confirma las hipótesis realizadas a partir de los ensayos previos (5.2.1.4) en lo referente a la formación de una interfase aislante entre agua-cosolvente-sustrato,

En la interacción entre Relación estequiométrica y Fase acuosa ($P < 0,0130$) se observa un efecto positivo de esta interacción al reducir el nivel en ambos factores (Anexo O), obteniendo el mejor resultado con relación estequiométrica 1:140 aceite:metanol y 5% v/v de fase acuosa, concordando con los efectos de las interacciones de estos factores analizados previamente.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kaieda (2001) en donde con lipasas de *P. fluorescens* y *C. rugosa* fue necesario un mínimo de agua (4% y 8%) en el medio para evitar la inactivación por metanol, mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, no mostró inactivación a bajas cantidades de agua (hasta 1%).

En la superficie de la interacción entre Relación estequiométrica y pH ($P < 0,0174$), se observa un efecto positivo al aumentar el pH (Anexo P). Este efecto reafirma que el aumento de pH tiene un efecto individual significativo identificado en el análisis de las interacciones anteriores. Por otra parte, el aumento de relación estequiométrica de 1:140 a 1:170 no tiene un efecto considerable a pH 8 (teniendo en cuenta que la mejor relación molar encontrada para el extracto fue 1:156 aceite:metanol), mientras que a pH 10 se

observa una disminución en la cantidad de metilésteres, indicando como posibles causas la alteración de la enzima a este pH y la inactivación por exceso de alcohol.

Al analizar la interacción entre Cosolvente y Catalizador ($P < 0,0188$), se observa un efecto positivo al disminuir el cosolvente de 30% a 10% v/v, tanto para el extracto liofilizado como para la enzima parcialmente purificada, siendo mayor la respuesta para el extracto liofilizado de acuerdo a la superficie de respuesta (Fig. 31).

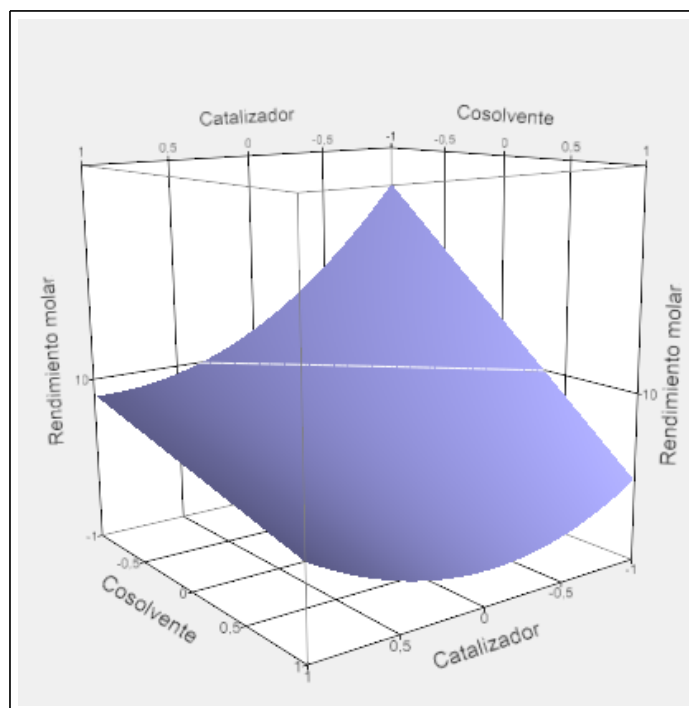


Figura 31. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y catalizador

Para confirmar el efecto de la interacción del cosolvente con la lipasa, se generó un gráfico de barras para la media de respuesta junto con un diagrama de cajas para observar la tendencia real (Fig.32). Se observa una mejor respuesta promedio con 10% de cosolvente en comparación con 30%, tanto para extracto liofilizado como para enzima parcialmente

purificada, siendo mayor la respuesta promedio para el extracto liofilizado (9,3213% y 17,3350% respectivamente).

Sin embargo, al analizar la mediana de respuesta en el diagrama de cajas, se observa una mayor respuesta con la lipasa parcialmente purificada frente al extracto enzimático (8,6151% y 5,99% respectivamente). Esto indica que la respuesta promedio se ve afectada por datos atípicos que no se reflejan en este estadístico.

De igual manera, al analizar la media de respuesta, con 30% de cosolvente parece no haber diferencia entre los catalizadores, pero al analizar la mediana se observa una mejor respuesta para la lipasa parcialmente purificada. Esto reafirma que la lipasa presenta estabilidad en bajas concentraciones de solventes orgánicos, siendo necesaria una cantidad pequeña de este para solubilizar el aceite.

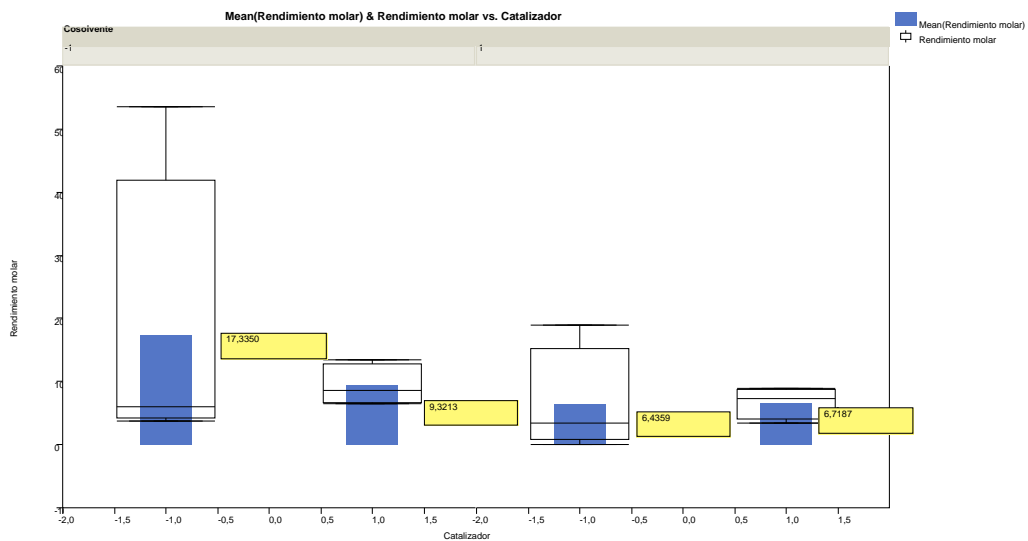


Figura 32. Efecto del cosolvente en cada tipo de catalizador (variable codificada)

En la interacción entre Relación estequiométrica y Catalizador ($P < 0,0355$) se observa un efecto positivo para la menor relación estequiométrica con el extracto liofilizado, pero para la enzima parcialmente purificada este efecto no es evidente (Fig. 33).

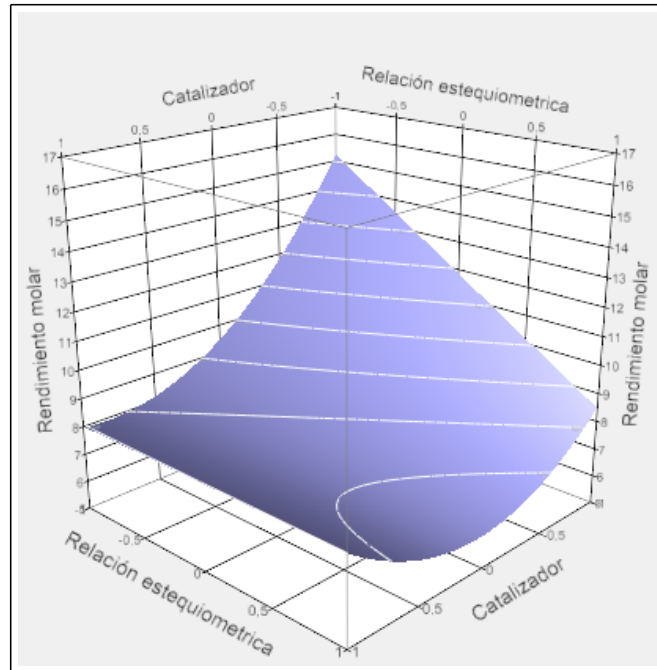


Figura 33. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y catalizador

Para confirmar el posible efecto de bloqueo de los sitios catalíticos por exceso de metanol se realizó un gráfico de barras de la media de respuesta para cada factor junto a su respectivo diagrama de cajas (Fig. 34). Al analizar la respuesta promedio se observa que el aumento de la relación estequiométrica afecta negativamente el extracto liofilizado, pero al analizar la mediana en el gráfico de cajas, la tendencia muestra un aumento en la respuesta, mostrando nuevamente el efecto de los datos atípicos sobre el promedio.

Por otro lado, la mediana de respuesta con la lipasa parcialmente purificada no cambia significativamente con el aumento de relación estequiométrica de 1:140 a 1:170 (7,5397%

y 7,8957% respectivamente), y es mayor comparada con la mediana del extracto liofilizado para las dos relaciones (3,5372% para relación 1:140 y 5,99% para 1:170).

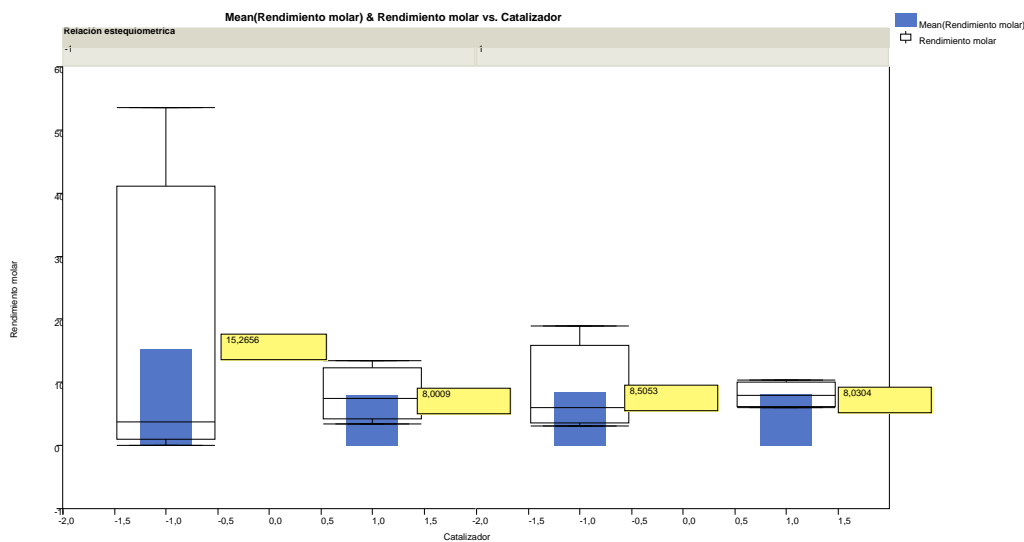


Figura 34. Efecto de la relación estequiométrica en el catalizador (variables codificadas)

Con base en lo anterior y en los resultados analizados de la interacción entre Cosolvente y lipasa, se concluye que la lipasa parcialmente purificada presenta resistencia a solventes orgánicos, en este caso metanol y hexano, debido a que la mediana del rendimiento molar no se afecta significativamente al aumentar la cantidad de estos en el medio de reacción, a pesar que las medias de respuesta muestran tendencias diferentes, las cuales están alteradas por datos atípicos.

La interacción entre Cosolvente y pH ($P < 0,0420$) muestra el efecto positivo al aumentar el pH (pH 10) y disminuir la cantidad de cosolvente (10% v/v, Fig. 35) siendo coherente con los efectos de las interacciones de estos factores analizadas previamente con respecto al efecto individual del pH 10.

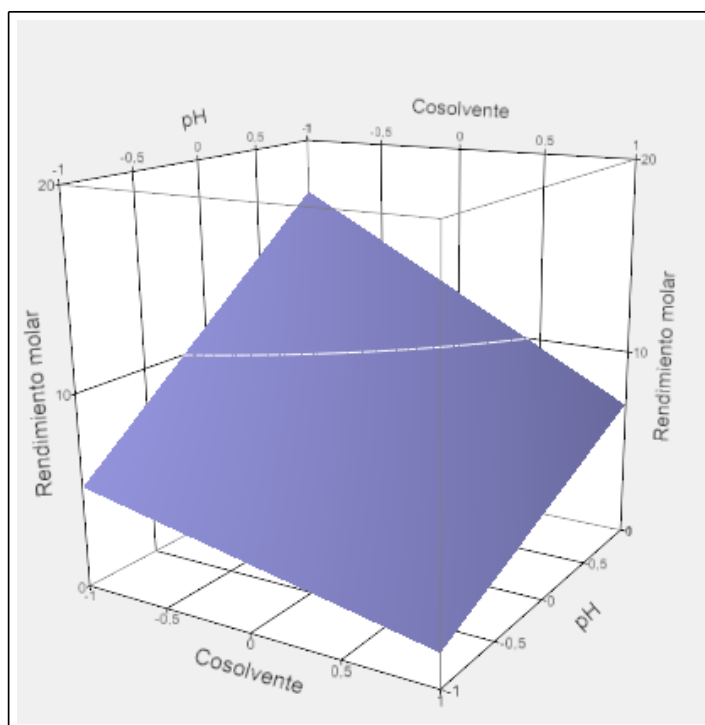


Figura 35. Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y pH

El promedio del rendimiento molar para el extracto fue de 11,8855% con una mediana de 4,5836%, y para el extracto el promedio fue de 8,02% con una mediana de 7,7140%.

A partir del modelo matemático del análisis de regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9920 con un α de 0,05, observándose este ajuste en la gráfica de los valores predichos por el modelo frente a los valores experimentales (Anexo J).

Como resultado de la regresión lineal y el análisis de las superficies de respuesta, se obtiene un modelo matemático que permite predecir el rendimiento teórico de la reacción de acuerdo a la variación de cada factor.

Para definir el modelo es necesaria una ecuación lineal que involucre tanto los efectos individuales como las interacciones de primer orden (Ecuación 3).

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^5 \beta_{ki} X_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{kij} X_i X_j$$

Ecuación 3. Modelo de regresión lineal múltiple. El término Y es la respuesta, β_{k0} , β_{ki} , β_{kij} , son coeficientes constantes (parámetros estimados), y X_i y X_j son las variables independientes decodificadas. Fuente: Gutiérrez (2008)

A partir de los parámetros estimados y el modelo de ecuación lineal múltiple se obtuvo la ecuación que define el modelo para predecir la conversión de metilésteres (Ecuación 4).

Rendimiento molar (%)

$$\begin{aligned} &= 7,8096 + (-1,9327 * \text{Catalizador}) + (-4,9619 * \text{Fase Acuosa}) \\ &+ (-3,3754 * \text{Cosolvente}) + (-1,6848 * \text{Relación Estequiométrica}) \\ &+ 4,3334 * \text{pH} + \text{Catalizador} * (\text{Catalizador} * 2,1431) + \text{Catalizador} \\ &* (\text{Fase Acuosa} * 2,6514) + \text{Catalizador} * (\text{Cosolvente} * 2,0741) \\ &+ \text{Fase Acuosa} * (\text{Cosolvente} * 2,4252) + \text{Catalizador} \\ &* (\text{Relación Estequiométrica} * 1,6953) + \text{Fase Acuosa} \\ &* (\text{Relación Estequiométrica} * 2,3150) + \text{Cosolvente} \\ &* (\text{Relación Estequiométrica} * 4,3403) + \text{Catalizador} * (\text{pH} \\ &* (-4,5009)) + \text{Fase Acuosa} * (\text{pH} * (-3,6237)) + \text{Cosolvente} * (\text{pH} \\ &* (-1,6021)) + \text{Relación Estequiométrica} * (\text{pH} * (-2,1229)) \end{aligned}$$

Ecuación 4. Ecuación obtenida a través de regresión lineal para modelación de la reacción

Esta ecuación servirá más adelante para realizar simulaciones de la reacción bajo diferentes tratamientos con las variables involucradas en el ensayo y definidas dentro del modelo.

6. DISCUSIÓN GENERAL

La *P. aeruginosa* es un microorganismo con capacidad de hidrolizar triglicéridos a través de la secreción de una lipasa extracelular para utilizarlos como fuente de carbono en su metabolismo (Peña, 2006; Prescott, 2004). Existe un gran número de reportes en revistas y bases de datos de lipasas obtenidas de este microorganismo que presentan adicionalmente capacidad para transesterificar ácidos grasos en medios específicos (Akoh *et al.*, 2007; Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig; Swiss Institute of Bioinformatics).

Las variables en la transesterificación enzimática han sido estudiadas por diferentes autores (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Akoh *et al.*, 2007; Atadashi *et al.*, 2012; Fjerbaek *et al.*, 2009; Gao, 2009). Sin embargo, hay pocos trabajos sobre las interacciones entre los diferentes factores enfocados a tener una visión holística de todo el proceso a través de metodología de superficies de respuesta (Gao, 2009; Rodrigues, 2010; Shie, 2003; Sim *et al.*, 2009).

De acuerdo a la literatura revisada, las variables que más se han estudiado en la transesterificación con enzimas son la temperatura, pH, relación estequiométrica, uso de cosolventes, cantidad de agua en la reacción, fuente de triglicéridos y cantidad de catalizador. Sin embargo, todas estas variables actúan en conjunto y finalmente, la correcta combinación de las mismas permite obtener mayores rendimientos al final de la reacción. Esto se pudo comprobar en el ensayo final realizado, en donde todas las variables definidas presentaron interacciones con otras y algunas interacciones potenciaron los efectos individuales de cada variable, mientras que otras tuvieron efectos negativos.

La temperatura incide de manera indirecta al no tener un efecto significativo por sí sola, pero presenta una interacción significativa con la fase acuosa de acuerdo a los resultados del ensayo preliminar, convirtiéndola en un factor a ser tenido en cuenta por su efecto sobre

la velocidad de reacción. Sin embargo, diferentes autores reportan rendimientos finales equivalentes, tanto en altas como bajas temperaturas, después de tiempos prolongados de reacción (Fjerbaek *et al.*, 2009; Shimada, 2002). Por esta razón, el tiempo de reacción es una variable controlable que se puede analizar a su vez como una variable respuesta al hacer el seguimiento de la reacción en función de las variables controladas.

La lipasa presenta los mayores rendimientos a 54°C, encontrándose dentro del rango de trabajo reportado para lipasas de este tipo (desde 21°C hasta 90°C para algunas lipasas provenientes de cepas de termofílicas) (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig) A temperaturas superiores parece presentarse desnaturalización de la enzima, confirmando lo reportado por Prieto (2012). Sharma (2001) y Borkar (2009) encontraron una temperatura óptima de 55°C para sus respectivas lipasas de *P. aeruginosa*, concordando con los resultados obtenidos.

Con relación al tipo de aceite, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportes de diferentes autores refiriéndose a las desventajas que presentan los fosfolípidos presentes en aceites crudos, los cuales se adhieren a la enzima y la inactivan (Sim *et al.*, 2009; Talukder *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2002). Sim encontró que con un pretratamiento se puede evitar este efecto en el aceite crudo, encontrando resultados equivalentes con este frente al aceite refinado.

La fase acuosa presenta interacciones con todos los factores analizados: tipo de aceite, pH, temperatura, concentración de enzima, cosolvente y grado de purificación de la lipasa. Al disminuir genera un aumento de la cantidad de metilésteres excepto en presencia de cosolvente, en donde es necesaria una cantidad que varía de acuerdo a la resistencia de la lipasa (2001) (Kaieda M. , 2001), pero también depende del sustrato, el alcohol y soportes en caso de estar inmovilizada (Atadashi *et al.*, 2012; Fjerbaek *et al.*, 2009; Sha y Gupta, 2007).

El pH presentó interacción con fase acuosa, relación estequiométrica y grado de purificación de la lipasa, obteniendo mejores resultados con pH cercanos a 8. A pH 10 presenta una interacción negativa con la lipasa en los dos grados de purificación analizados, concordando con la afirmación de Murray respecto a que este tiene un papel importante en la correcta conformación de la enzima, definiendo en gran parte su actividad catalítica (Murray, 2010), y a su vez, estos resultados coinciden con reportes de diferentes autores para lipasas de *P. aeruginosa* (Chartrain *et al.*, 1993; Gaur *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2001).

La relación estequiométrica aceite:metanol mostró interacciones con el tipo de aceite, pH, cantidad de enzima en el medio, cantidad de solvente, cantidad de agua y grado de purificación de la enzima. Esta lipasa presentó los mejores resultados con la relación 1:156 para extracto enzimático y 1:140 para enzima parcialmente purificada, no encontrándose reportes de este tipo de resistencias en la literatura. En la gran mayoría de trabajos con lipasas de *Pseudomonas* se han encontrado los mejores resultados con relaciones estequiométricas aceite:alcohol 1:6 para evitar inactivación de la enzima. Sin embargo, se encuentran reportes con exceso de alcohol en un rango de 4 moles hasta un máximo de 18 moles de alcohol (Ana y Victor, 2007; Stamenkovic *et al.*, 2011), considerándose como lipasas con alta resistencia. Esta característica es importante para la transesterificación debido a la posibilidad de reutilización de la enzima para disminuir los costos de producción (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Akoh *et al.*, 2002; Babu y Goud, 2012; Fukuda *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2009) .

Con respecto al uso de cosolvente, se observó que a una concentración de 10% con 5% de agua tiene un efecto positivo en el rendimiento de la reacción. Esto es coherente con los reportes encontrados en las bases de datos para *P. aeruginosa*, que presentan tolerancia a diferentes solventes como glicol, piridina, acetonitrilo, dimetil sulfoxido, benceno, tolueno, hexano, heptano, octano, entre otros (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig). Gaur (2008) analizó el comportamiento de una lipasa de *P. aeruginosa* PseA con 25% de diferentes solventes polares y no polares,

encontrando para metanol y etanol una alta resistencia. Afirma que este tipo de resistencias no son comunes debido a que los solventes polares desplazan las moléculas de agua de los sitios activos, y por esta razón se prefieren solventes hidrofóbicos en reacciones enzimáticas con bajas cantidades de agua. Así mismo, probó hexano, n-heptano y DMSO (solvente polar) a una concentración de 50%, reteniendo la actividad de la lipasa por encima del 90%, reconfirmando la resistencia de la enzima.

Se observó que el volumen o espacio en el cual se lleva a cabo la reacción presenta una fuerte incidencia en el rendimiento debido a que la reducción de dicho espacio genera mayor interacción entre el sustrato, la lipasa y el alcohol. Este aspecto ha sido trabajado por diferentes autores a través de reactores de lecho empacado para reacciones de transesterificación enzimática (Chen, 2011; Hama, 2011; Yoshida, 2012) y reactores de membrana (Cao, 2008; Sheng, 2011).

La cantidad de enzima resulta ser un factor que incide también en el rendimiento y la velocidad de la reacción debido a la mayor disponibilidad de la enzima para atacar el sustrato (Murray, 2010). Este efecto fue referenciado anteriormente por Shah (2008) y Sim (2009).

Se encuentran diferentes trabajos en donde se recomienda la adición secuencial para evitar la inactivación de la enzima por exceso de alcohol desde el inicio de la reacción (Rodrigues, 2010; Talukder, 2010). Sin embargo, la adición secuencial no tuvo efecto en el rendimiento de la reacción. Esto posiblemente se deba a la alta resistencia que presenta la lipasa frente al metanol, motivo por el cual no se inactiva. Además, el extracto enzimático mostró mayor actividad con la relación 1:156 desde el inicio hasta el final de la reacción (48 horas).

A pesar de lograr un factor de purificación de 5,73 y un rendimiento de 1,83%, se observó que la purificación de la lipasa tuvo un efecto positivo en el resultado de la reacción. La electroforesis después del paso por cromatografía muestra que la lipasa todavía se

encuentra junto a proteínas de mayor peso molecular, por lo que es necesario seguir con el proceso. Se tiene reportes en bases de datos (Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig) donde se han logrado factores de purificación por encima de 300, aumentando la actividad hasta 1.000 veces con respecto al extracto enzimático (Borkar *et al.*, 2009; Gaur *et al.*, 2008; Saeed, 2005)

7. CONCLUSIONES

El extracto enzimático y la lipasa parcialmente purificada de *P. aeruginosa* aislada del fruto de palma aceitera presentan la capacidad de catalizar la reacción de transesterificación de aceite de palma con metanol, identificándose los principales parámetros que influyen en esta reacción (temperatura, pH, relación estequiométrica y fuente de triglicéridos). La lipasa obtenida presentó un peso molecular similar a lipasas reportadas por varios autores.

La temperatura no presenta un efecto significativo por sí sola. Sin embargo, por su interacción con los demás factores, su incremento genera un aumento de velocidad, obteniéndose el mejor resultado con 54°C después de 48 horas de reacción. Esta es una temperatura baja comparada con las temperaturas utilizadas para la transesterificación con bases, lo cual se traduce en una disminución de consumo energético en el proceso.

El uso de aceite RBD como sustrato aumenta 10 veces el rendimiento de la reacción comparado con el aceite crudo.

La lipasa muestra su mayor actividad a pH alcalino, obteniéndose los mejores resultados a pH 8, generando menores cargas contaminantes en los efluentes de los procesos posteriores en comparación con el proceso tradicional. A pH 10 se observa que la solución búfer por sí sola aumenta la respuesta y su interacción con la enzima es negativa, disminuyendo el efecto de esta como catalizador.

La reducción del volumen de reacción mejora el rendimiento molar al propiciar una mayor interacción entre la lipasa y el sustrato, generando la posibilidad de trabajar en microreactores para disminuir las cantidades de reactivos y aumentar la eficiencia de la reacción.

Se encontró que a mayor cantidad de extracto enzimático en el medio de reacción aumenta la cantidad final de metilésteres, siendo 9,44% la cantidad máxima de extracto probada en este trabajo. Sin embargo, al utilizar lipasa parcialmente purificada y mejorar las condiciones de reacción, se obtuvieron mayores rendimientos con una menor cantidad de enzima, siendo necesario seguir con la purificación y optimización del proceso.

La lipasa parcialmente purificada presenta alta resistencia a inactivación en presencia de hexano y altas cantidades de metanol, siendo este un comportamiento atípico y deseable para este tipo de lipasas. De igual manera, el uso de hexano como cosolvente tiene un efecto significativo al utilizarlo en bajas concentraciones en presencia de agua. Tanto esta propiedad como la tolerancia a altas concentraciones de metanol demuestran que esta enzima tiene unas características difíciles de encontrar en lipasas microbiales, presentando alto potencial para su uso en la industria oleoquímica.

Al reducir la cantidad de agua hasta 5% en el medio de reacción, aumenta la cantidad de metilésteres, direccionando la reacción hacia la transesterificación y no hacia la hidrólisis, resultando un producto final con menor contenido de humedad.

Con el mejoramiento de las condiciones de la transesterificación, el extracto enzimático aumentó el rendimiento molar promedio aproximadamente en seis veces.

Bajo las mejores condiciones, el rendimiento molar de la enzima parcialmente purificada aumenta en un 68,3% frente al rendimiento molar del extracto enzimático, haciéndose necesaria la purificación de la enzima.

8. RECOMENDACIONES

Es necesario probar diferentes cantidades de enzima en el medio de reacción de acuerdo a la optimización de las condiciones de trabajo, para determinar una cantidad viable que permita obtener rendimientos molares comparables con los obtenidos por catálisis alcalina.

Es necesario comprobar la selectividad de la enzima con pruebas de esterificación de diferentes ácidos grasos a partir de sus respectivos compuestos con p-nitrofenil palmitato.

De igual manera es necesario realizar pruebas con aceite crudo retirando fosfolípidos y evaluar la viabilidad de la reacción en este sustrato sin refinar, blanquear y desodorizar.

El tiempo de reacción es otro factor que incide en la cantidad de metilésteres obtenidos al tener una reacción inversa en función de las concentraciones de productos, por tanto es necesario evaluar diferentes tiempos.

Se debe trabajar en el mejoramiento de los rendimientos de la fermentación para la obtención de mayor cantidad de enzima a través de la ingeniería genética.

El mejoramiento continuo del proceso de purificación de la lipasa se hace necesario para aumentar el rendimiento del proceso de obtención de metilésteres. A su vez, el desarrollo de procesos de separación, purificación y evaluación de la calidad de los metilésteres obtenidos se hacen indispensables para continuar con la investigación en esta línea.

La implementación de reactores de lecho empacado ó reactores de membrana en la transesterificación traería ventajas como menor estrés de la enzima frente a la agitación, reutilización de catalizador y prolongación del tiempo de estabilidad de la enzima.

BIBLIOGRAFIA

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., y Omidkhah, M. R. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*,
- Akoh, C. C., Sellappan, S., Fomuso, L. B., y Yankah, V. V. (2002). Enzymatic synthesis of structured lipids. *Lipid Biotechnology*, , 433-478.
- Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C., y Shaw, J. F. (2007). Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(55), 8995-9005.
- Alcántara, A. R., y al, e. (2004). Resolution of racemic acids, esters and amines by candida rugosa lipase in slightly hydrated organic media. *Food Technology and Biotechnology*, (42), 343-354.
- American Society for Testing Materials ASTM. *ASTM D4175 - 09ae2 standard terminology relating to petroleum, petroleum products, and lubricants*. USA:
- Ana, M. B. R., y Victor, P. H. (2007). Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on Silica-PVA composite. *Energy Fuels*, (27), 3689-3694.

- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., Abdul Azis, A. R., y Sulaiman, N. M. N. (2012). The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (16), 3456-3470.
- Ateslier, Z. B. B., y Metin, K. (2006). Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic bacillus sp. *Enzyme and Microbial Technology*, (38), 628-635.
- Avellaneda, F. A. (2010). *Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con un reactor helicoidal. tesis doctoral.* (). Tarragona: Universidad de Rovira.
- Babu, V., y Goud, V. (2012). Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (16), 4763-4784.
- Boocock, D. (1996). Fast one-phase oil-rich processes for the preparation of vegetable oil methyl esters. *Biomass and Bioenergy*, , 43-50.
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., y Rao, S. R. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – pseudomonas aeruginosa SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology*, (40), 358-366.
- Cao, P. (2008). High-purity fatty acid methyl ester production from canola, soybean, palm, and yellow grease lipids by means of a membrane reactor. *Biomass and Bioenergy*, , 1028-1036.

- Chartrain, M., Katz, L., y Marcin, C. (1993). Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from pseudomonas aeruginosa MB 5001. *Enzyme Microbiology Technology*, (15), 575-580.
- Chen, H. C. (2011). Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and enzyme reuse study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*,
- Consejo Nacional de Política Económica y Social. (2008). *DOCUMENTO CONPES 3510 LINEAMIENTOS DE POLITICA PARA PROMOVER LA PRODUCCION SOSTENIBLE DE BIOCOMBUSTIBLES EN COLOMBIA*. (). Bogotá: Departamento Nacional de Planeación.
- Consortio CUE. (2012). *Evaluación del ciclo de vida de la cadena de producción de biocombustibles en colombia*. (). Medellín:
- De, B. K. (1999). Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, , 451-453.
- Demirbas, A. (2005). Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, , 466-487.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, , 14-34.

Department of Bioinformatics & Biochemistry - Technische Universität Braunschweig.*EC*

3.1.1.3 - triacylglycerol lipase

Department of Bioinformatics & Biochemistry Technische Universität
Braunschweig.*Sequence search*

Devanesan, M. G. (2007). Transesterification of jatropha oil using immobilized pseudomonas fluorescens. *African Journal of Biotechnology*, , 2497-2501.

Dharmsthiti, S. (1998). Lipase from pseudomonas aeruginosa LP602: Biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, , 75-80.

Dominguez, P. (2002). Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. *Enzyme and Microbial Technology*, , 283-288.

Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia FEDEBIOCOMBUSTIBLES.
(2012). *Cifras informativas del sector biocombustibles - biodiesel de palma de aceite*

Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite FEDEPALMA.*Federación nacional de cultivadores de palma de aceite*

Federación Nacional de cultivadores de Palma FEDEPALMA. (2009). *Programa de biodiésel en colombia y su potenciial para la generación de energía eléctrica.* ().
Bogotá:

- Fjerbaek, L., Chritensen, K. V., y Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, (102), 1298-1315.
- Fukuda, I., Kondo, A., y Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Jornal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416.
- Gao, Y. (2009). Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and Bioenergy*, , 277-282.
- Gaur, R., Gupta, A., y Khare, S. K. (2008). Purification and characterization of lipase from solvent tolerant pseudomonas aeruginosa PseA. *Process Biochemistry*, (43), 1040-1046.
- Gilbert, E. J. (1991). Purification and properties of extracellular lipase from pseudomonas aeruginosa EF2. *Journal of General Microbiology*, , 2223-2229.
- Gupta, R., Gupta, N., y Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Technology*, (64), 763-781.
- Gutiérrez P, H., y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.) Mc Graw Hill.

- Hama, S. (2011). Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochemical Engineering Journal*, , 66-71.
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H., y Harrison, S. T. L. (2008). A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *Journal of Cleaner Production*, , 1368-1378.
- Hasan, F., Shah, A. A., y Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, , 235-251.
- Instituto Colombiano de Normas Tecnicas y Certificación - ICONTEC. (2006). *Norma técnica colombiana NTC 5444 - BIODIESEL PARA USO EN MOTORES DIESEL.ESPECIFICACIONES*
- Instituto Colombiano de Normas Tecnicas y Certificación - ICONTEC. (2011). *Norma técnica colombiana NTC 1438 - PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS.COMBUSTIBLES PARA MOTORES DIESEL*
- Itabaiana Jr., I. (2013). Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, , 1-9.
- Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., y Ravindra, P. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. *Critical Reviews Biotechnology*, (28), 253-264.

- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., y Fukuda, H. (2001). Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 91(1), 12-15.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (227), 680-685.
- Lee, D., Koh, Y., y Kim, K. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from bacillus thermoleovorans ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, (179), 393-400.
- Li, L. (2006). Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, , 58-62.
- Linko, Y. Y. (1998). Biodegradable products bylipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, (66), 41-58.
- Marchetti, J. M. (2011). A summary of the available technologies for biodiesel production based on a comparison of different feedstock's properties. *Process Safety and Environmental Protection*,
- Mazo, P., Restrepo, G., y Rios, L. (2011). Alternative methods for fatty acid alkyl-esters production: Microwaves, radio-frequency and ultrasound, biodiesel - feedstocks and

- processing technologies. In M. Stoytcheva, & G. Montero (Eds.), *Biodiesel - feedstocks and processing technologies* (1st ed., pp. 269-288) InTech.
- Mekhilef, S. (2011). A review on palm oil biodiesel as a source of renewable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, , 1937-1949.
- Ministerio de Minas y Energía. República de Colombia. (2012). *Sector biocombustibles en colombia.* (). Bogotá:
- Montenegro, C. (2005). *Determinación del rendimiento de la reacción de transesterificación para la obtención de biodiesel a partir de oleína de palma y alcohol de caña, usando como catalizador la enzima novozym 435.* trabajo de grado. (Tesis, Universidad de la Sabana).
- Murray, R. K., et al. (2010). *HARPER. bioquímica ilustrada* (28a ed.) McGraw Hill.
- Nelson, D. L., y Cox, M. L. (2006). *LEHNINGER. principios de bioquímica* (Cuarta ed.) Omega.
- Oliveira, P. C. (2000). Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene±divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, , 63-71.
- Peña, F. (2006). *Aprovechamiento de aceites residuales del proceso de fritura como sustrato para el desarrollo de microorganismos productores de lipasas.* (Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Producción Agroindustrial, Universidad de la Sabana).

- Peng, R. (2011). Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, , 926-937.
- Perancho, D. (2011). *Tesis. estudio del funcionamiento de motores alternativos de combustión interna mediante la utilización de combustibles alternativos.* (). Cataluña: Universitat Politècnica de Catalunya.
- Pinto, A. C. (2005). Biodiesel: An overview. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, , 1313-1330.
- Prescott, L. (2004). *Microbiología* (Quinta ed.). Madrid: Mc. Graw Hill.
- Prieto, R. E. (2006). *Obtención de enzimas lipolíticas a partir de microorganismos aislados del fruto de palma aceitera. informe proyecto COLCIENCIAS.* (). Bogotá:
- Prieto, R. E. (2012). *Caracterización y mejoramiento de la acción de la lipasa de Pseudomonas aeruginosa para su utilización en la producción de biodiesel y oleoquímicos. informe de proyecto COLCIENCIAS.* (). Bogotá:
- Rodrigues, R. (2010). Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, , 1268-1273.
- Royon, D. (2007). Enzymatic production of biodiesel from cottonseed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresources and Biotechnology*, , 648-653.

- Saeed, H. (2005). Purification and characterization of two extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* ps-x. *Polish Journal of Microbiology*, , 233-240.
- Sha, S., y Gupta, M. N. (2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, (42), 409-414.
- Shah, S., y Gupta, N. (2008). The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chemistry Central Journal*,
- Sharma, R., Chisti, Y., y Banarjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, (19), 627-662.
- Sheng, F. L. (2011). Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, , 98-103.
- Shie, C. J. (2003). Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*, , 103-106.
- Shimada, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, , 133-142.
- Sim, J. H., Harun, A., y Bhatia, S. (2009). Effect of mass transfer and enzyme loading on the biodiesel yield and reaction rate in the enzymatic transesterification of crude palm oil. *Energy & Fuels*, (23), 4651-4658.

- Sim, J. H., Kamruddin, A. H., y Bathia, S. (2010). The feasibility study of crude palm oil transesterification at 30 °C operation. *Bioresource Technology*, (101), 8948-8954.
- Stamatis, H., y Xenakis, A: Kolisis, F. N. (1999). Bioorganic reactions in microemulsions: The case of lipases. *Biotechnology Advances*, , 293-318.
- Stamenkovic, O. S., Velickovic, A. V., y Veljkovic. (2011). The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuels*, (90), 3141-3145.
- Swiss Institute of Bioinformatics.*ENZYME entry: EC 3.1.1.3*
- Talukder, M. M. R., Wu, J. C., y Van Nguyen, T. B. (2009). Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (60), 106-112.
- Talukder, M. R. (2010). Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, , 207-212.
- Tan, K. T., Lee, K. T., y Mohamed, A. R. (2009). Production of FAME by palm oil transesterification via supercritical methanol technology. *Biomass and Bioenergy*, (33), 1096-1099.
- Tan, T., Lu, J., y Nie, K. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, (28), 628-634.

- Uscategui, Y. L. (2007). *Evaluación de la cinética de crecimiento en función de la concentración inicial de glucosa, y tiempo de inducción en la producción de enzimas lipolíticas a partir de una bacteria aislada del fruto de palma africana (elaeis guineensis)*. (Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Producción Agroindustrial, Universidad de la Sabana).
- Van Gerpen, J. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, , 1097-1107.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., y Tminaga, Y. (2002). Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized candida antarctica lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (17), 151-155.
- Yapazan, E. (2008). *Partial purification and characterization of lipase enzyme from a pseudomonas strain*. (Trabajo de grado - Maestría, İzmir Institute of Technology).
- Yoshida, A. (2012). Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. *Biochemical Engineering Journal*, , 76-80.
- Zhao, X. (2007). An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, , 236-243.

Zor, T. a. S., Zvi. (1996). Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, (236), 302–308.

ANEXOS

ANEXO A

Parámetros fisicoquímicos aceite de palma crudo (CPO) y aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (RBD).

Análisis	Método	Parámetro - Aceite crudo (CPO)	Parámetro - Aceite refinado (RBD)
Acidez	PR CC 01 - NTC 218	4 % Palmítico Max.	0,05-0,07 % Oleico
Punto de fusión	PR CC 04 - NTC 213	35-39°C	35-39°C
Humedad	PR CC 07 - NTC 287	0,05% Max	0,07% Max
Índice de Yodo	PR CC 03 - NTC 283	50-56 g de I/100 g	50-56 g de I/100 g
Índice de peróxido	PR CC 02 - NTC 236	NA	1 Meq O ₂ /kg Max
Color de Lovibond celda 1"	PR CC 06 - NTC 564	Amarillo 27/Rojo 27/Azul 0	Amarillo 28/Rojo 2,8/Azul 0

Fuente: Alimentos del Llano, 2008

ANEXO B

Composición de ácidos grasos del aceite crudo de palma.

CADENA DE CARBONOS	TIPO DE ACIDO GRASO	%
C12:0	Ácido Láurico	0,3
C14:0	Ácido Mirístico	1,1
C16:0	Ácido Palmítico	42,9
C16:1	Ácido Palmitoleico	0,2
C18:0	Ácido Esteárico	4,6
C18:1	Ácido Oleico	39,3
C18:2	Ácido Linoleico	10,7
C18:3	Ácido Linolénico	0,4
C20:0	Ácido Araquídico	0,3
C22:0	Ácido Behénico	0,1

FUENTE: FEDEPALMA (Montenegro, 2005)

ANEXO C

Pesos moleculares asumidos y estimados para el cálculo del peso de una mol de aceite de palma

Ácido graso	Peso molecular (g/mol)	Porcentaje (%)
Glicerol	92,1	---
Palmítico	256,4	---
Oleico	282,4	---
Linoleico	280,4	---
Esteárico	284,4	---
Tripalmitina	861,3	42,9
Trioleina	933,3	39,3
Trilinoleina	933,3	10,7
Triestearina	945,3	4,6
	TOTAL	97,5

ANEXO D

Metodología para fermentación en medio líquido

Activación de microorganismo

- Tomar una perla de los viales de criocongelación (-70°C) del microorganismo (*Pseudomonas aeruginosa*) y colocar en 5 mL de caldo TSB estéril
- Incubar a 37°C por 18 horas
- Confirmar pureza de la bacteria por medio de tinción Gram

Preinóculo para fermentación

- Tomar 20 μL del microorganismo activado y colocarlo en 5 mL de caldo TSB
- Incubar a 37°C por 18 horas
- Confirmar pureza de la bacteria por medio de tinción Gram

Inductor

- El inductor se prepara de la siguiente forma: Colocar 0.658 mL de tween-20 y 3.158 mL de aceite de palma crudo en 100 mL de agua caliente.
- Mezclar con ayuda de un ultraturrax
- Autoclavar a 121°C con una presión de 15 PSIA durante 15 minutos justo antes de aplicar al medio de cultivo para evitar la separación del aceite.

Medio de cultivo para fermentación

- Preparar el medio de cultivo para obtener lipasa con la siguiente composición:

Compuesto	g/100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.531
Peptona de caseína	1.062
K_2HPO_4	0.531
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.106
Extracto de levadura	0.5

- Ajustar pH del medio a 7.5 con buffer de fosfato de sodio 50 mM

- Preparar una solución de glucosa concentrada (50 g/l)

Fermentación

- Esterilizar cada una de las soluciones anteriores junto al material de vidrio a utilizar, a 121°C con una presión de 15 PSIA durante 15 minutos
- Utilizando cabina de flujo laminar, preparar el medio de fermentación colocando 6 mL de glucosa por cada 100 mL de medio de cultivo en los erlenmeyers donde se llevará a cabo la fermentación. Se debe mantener una relación 1:5 en volumen de medio a Erlenmeyer. Cubrir con un tapón de gasa y algodón.
- Adicionar 1% v/v de preinóculo al medio de cultivo estéril (Ito y col., 2001)
- Incubar a 37°C, 200 rpm por 24 horas (Gao y col., 2000; Kanwar y Goswami, 2002; Snellman y col., 2002)
- En la hora 11 de la fermentación, adicionar 10 mL de inductor estéril por cada 100 mL de medio de fermentación.
- Detener la fermentación mediante centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C
- Separar el sobrenadante y filtrar por papel filtro, membranas de 0,45 y 0,2 μm consecutivamente para retirar las células residuales
- Almacenar el extracto obtenido a -4°C

ANEXO E

Curva de calibración Bradford modificado para microplatos utilizando BSA como estándar con el software MPM 6.0 (BIO-RAD)

Reader Setup Endpoint Dual 595.0 - 450.0nm Mix speed L, time 20s Temp **.*

Reader Model # iMark

Reader Serial # 10681

Reader Version # 1.02.01 Build 01

Comments

Using Standard Data Set from Current Experiment.

Linear Fit: $Y = \text{slope} * X + \text{intercept}$

20/50/80%: X = 6,129 / 11,363 / 16,596 Y = 0,047 / 0,073 / 0,100

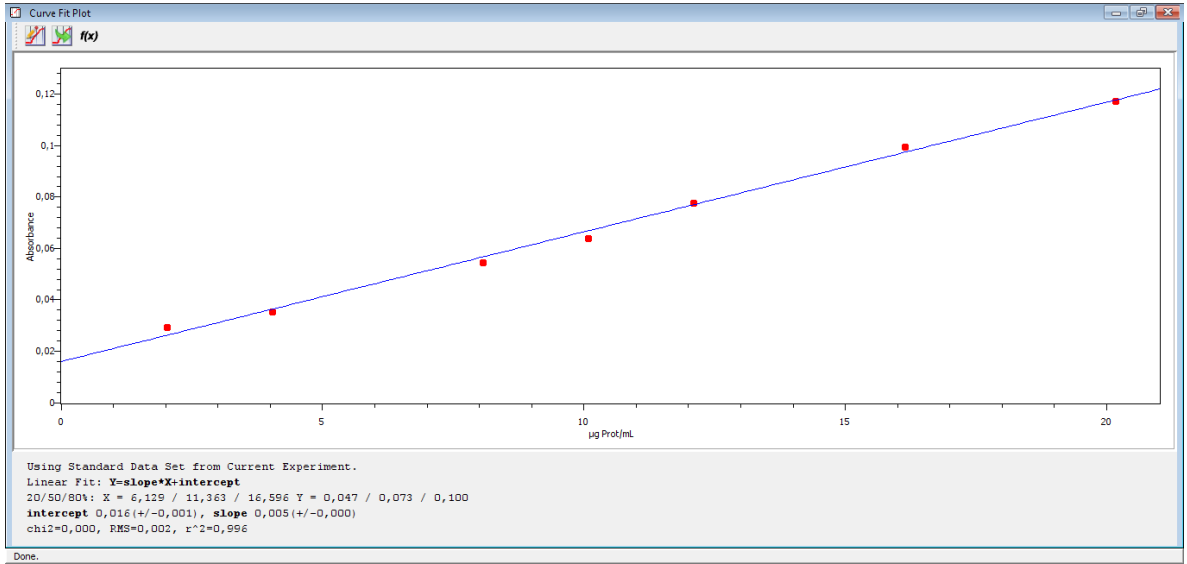
intercept: 0,016 (+/-0,001), slope: 0,005 (+/-0,000)

chi2=0,000, RMS=0,002, r^2=0,996

Standards Report:

Std #	Conc	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
		A2	0,033			
1	2.02	B2	0,031	0,029	0,005	15,792
		C2	0,024			
		A3	0,046			
2	4.03	G3	0,027	0,036	0,010	27,009
		H3	0,034			
		A4	0,052			
		B4	0,048			
3	8.06	C4	0,065	0,055	0,007	12,833
		F4	0,050			
		H4	0,058			
		B5	0,063			
4	10.08	F5	0,065	0,064	0,001	1,570
		F6	0,074			
5	12.10	G6	0,085	0,078	0,006	7,568
		H6	0,075			
		A7	0,083			
6	16.13	F7	0,105	0,100	0,011	11,146

	G7	0,106	
	H7	0,105	
	A8	0,103	
	B8	0,117	
7	C8	0,127	0,117 0,008 7,147
	F8	0,114	
	G8	0,118	
	H8	0,125	



ANEXO F

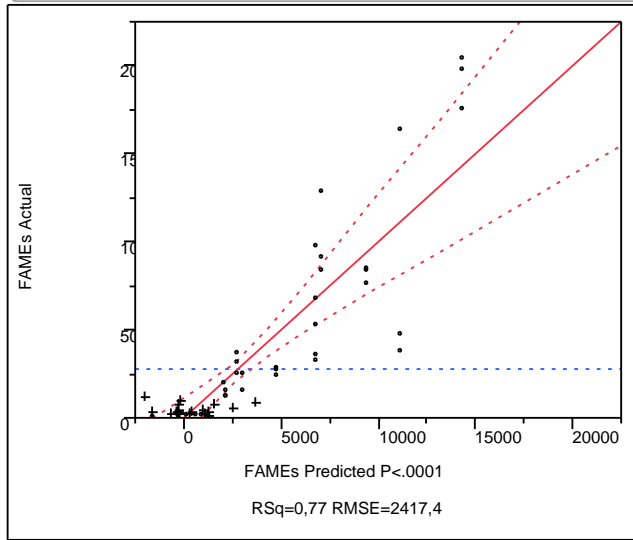
Diseño experimental preliminar. Factorial completo 2⁵ con 3 réplicas

pH	Tipo de aceite	Temperatura (°C)	Fase acuosa	Relación Volumen	AREA MEs
			(% Vol. Aceite)	(mL aceite:mL metanol)	
6	CPO	42	10	1:4	455,5
6	CPO	42	10	1:6	366
6	CPO	42	30	1:4	310,3
6	CPO	42	30	1:6	275,4
6	CPO	58	10	1:4	944
6	CPO	58	10	1:6	1124,9
6	CPO	58	30	1:4	810,9
6	CPO	58	30	1:6	791,6
6	RBD	42	10	1:4	3169,9
6	RBD	42	10	1:6	2796
6	RBD	42	30	1:4	73,6
6	RBD	42	30	1:6	204,4
6	RBD	58	10	1:4	212,4
6	RBD	58	10	1:6	2000,3
6	RBD	58	30	1:4	93,6
6	RBD	58	30	1:6	190,3
8	CPO	42	10	1:4	416,9
8	CPO	42	10	1:6	478,3
8	CPO	42	30	1:4	276,4
8	CPO	42	30	1:6	460,2
8	CPO	58	10	1:4	237,6
8	CPO	58	10	1:6	268,6
8	CPO	58	30	1:4	208,7
8	CPO	58	30	1:6	227,5
8	RBD	42	10	1:4	8488
8	RBD	42	10	1:6	20436,7
8	RBD	42	30	1:4	1328,4
8	RBD	42	30	1:6	3661,6

pH	Tipo de aceite	Temperatura (°C)	Fase acuosa	Relación Volumen	AREA MEs
			(% Vol. Aceite)	(mL aceite:mL metanol)	
8	RBD	58	10	1:4	6773,2
8	RBD	58	10	1:6	4846,5
8	RBD	58	30	1:4	2509,8
8	RBD	58	30	1:6	9129,5
6	CPO	42	10	1:4	455,9
6	CPO	42	10	1:6	345,2
6	CPO	42	30	1:4	133,3
6	CPO	42	30	1:6	260,9
6	RBD	42	10	1:4	3693,9
6	RBD	42	10	1:6	2918,7
6	RBD	42	30	1:4	75,7
6	RBD	42	30	1:6	191,2
8	CPO	42	10	1:4	430,5
8	CPO	42	10	1:6	495,1
8	CPO	42	30	1:4	304,7
8	CPO	42	30	1:6	472
8	CPO	58	10	1:4	234,9
8	CPO	58	10	1:6	238,5
8	CPO	58	30	1:4	171,2
8	CPO	58	30	1:6	225,1
8	RBD	42	10	1:4	8432,4
8	RBD	42	10	1:6	17563,9
8	RBD	42	30	1:4	1622,2
8	RBD	42	30	1:6	3342,6
8	RBD	58	10	1:4	5320,4
8	RBD	58	10	1:6	16404,8
8	RBD	58	30	1:4	1649,6
8	RBD	58	30	1:6	12939,2
6	CPO	42	10	1:4	430,9
6	CPO	42	10	1:6	354,5
6	CPO	42	30	1:4	276,1
6	CPO	42	30	1:6	216,2

pH	Tipo de aceite	Temperatura (°C)	Fase acuosa	Relación Volumen	AREA MEs
			(% Vol. Aceite)	(mL aceite:mL metanol)	
6	RBD	42	10	1:4	2609,3
6	RBD	42	10	1:6	2433,2
6	RBD	42	30	1:4	66,7
6	RBD	42	30	1:6	203,6
8	CPO	42	10	1:4	442
8	CPO	42	10	1:6	512,6
8	CPO	42	30	1:4	270,6
8	CPO	42	30	1:6	717,5
8	CPO	58	10	1:4	229
8	CPO	58	10	1:6	290,5
8	CPO	58	30	1:4	177,3
8	CPO	58	30	1:6	236,5
8	RBD	42	10	1:4	7695,2
8	RBD	42	10	1:6	19870,5
8	RBD	42	30	1:4	1266,4
8	RBD	42	30	1:6	3337,6
8	RBD	58	10	1:4	9861,7
8	RBD	58	10	1:6	3798,8
8	RBD	58	30	1:4	2525,7
8	RBD	58	30	1:6	8430

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,773742
RSquare Adj	0,720712
Root Mean Square Error	2417,439
Mean of Response	2721,766
Observations (or Sum Wgts)	80

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	15	1279033666	85268911	14,5908
Error	64	374016604	5844009,4	Prob > F
C. Total	79	1653050270		<,0001 *

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	16	247163567	15447723	Prob > F
Pure Error	48	126853037	2642771,6	<,0001 *
Total Error	64	374016604		Max RSq
				0,9233

ANEXO G

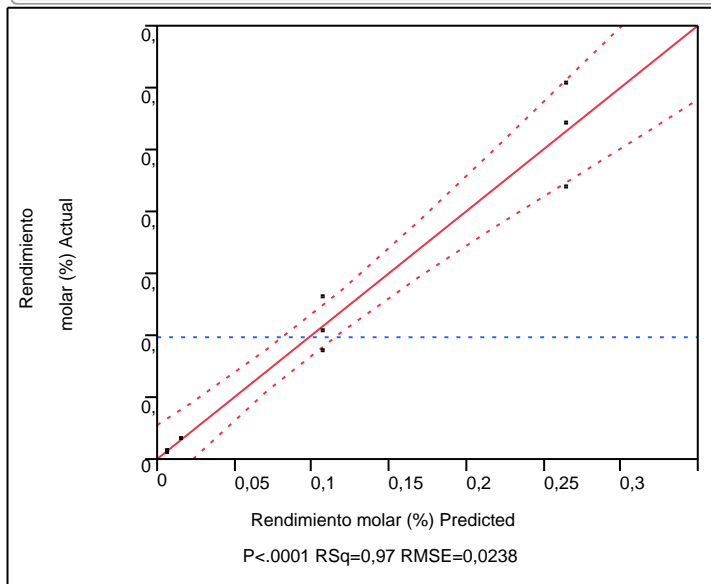
Diseño factorial 2x2 con tres réplicas para escala y relación aceite-metanol

Patrón	Relación aceite:metanol 1:6*	Escala	Área ME	Volumen (mL)	Mol ME	Mol aceite	Rendimiento molar (%)
Blanco			0				
Estandar			1541879				
Estandar			1627963				
—	L1	L1	14318	1,2	1,53701E-07	0,00099	0,0156
—+	L1	L2	37565	7,4	4,03252E-07	0,00592	0,0068
+—	L2	L1	278757	6,2	2,99239E-06	0,00099	0,3033
++	L2	L2	721211	42	7,74204E-06	0,00592	0,1308
—	L1	L1	13593	1,2	1,45918E-07	0,00099	0,0148
—+	L1	L2	26629	7,4	2,85856E-07	0,00592	0,0048
+—	L2	L1	248865	6,2	2,67151E-06	0,00099	0,2708
++	L2	L2	571088	42	6,1305E-06	0,00592	0,1036
—	L1	L1	13583	1,2	1,4581E-07	0,00099	0,0148
—+	L1	L2	37205	7,4	3,99387E-07	0,00592	0,0067
+—	L2	L1	201953	6,2	2,16792E-06	0,00099	0,2197
++	L2	L2	481487	42	5,16865E-06	0,00592	0,0873

*L1=Relación estequiométrica. L2=Relación en volumen

**L1=viales de 10 mL, L2= erlenmeyers de 100 mL

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,966264
RSquare Adj	0,953613
Root Mean Square Error	0,023772
Mean of Response	0,09825
Observations (or Sum Wgts)	12

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Model	3	0,12949234	0,043164	76,3792	
Error	8	0,00452103	0,000565		
C. Total	11	0,13401337			<,0001 *

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	0,09825	0,006863	14,32	<,0001 *
Relación[L1]	-0,087667	0,006863	-12,77	<,0001 *
Escala[L1]	0,0415833	0,006863	6,06	0,0003 *
Relación[L1]*Escala[L1]	-0,0371	0,006863	-5,41	0,0006 *

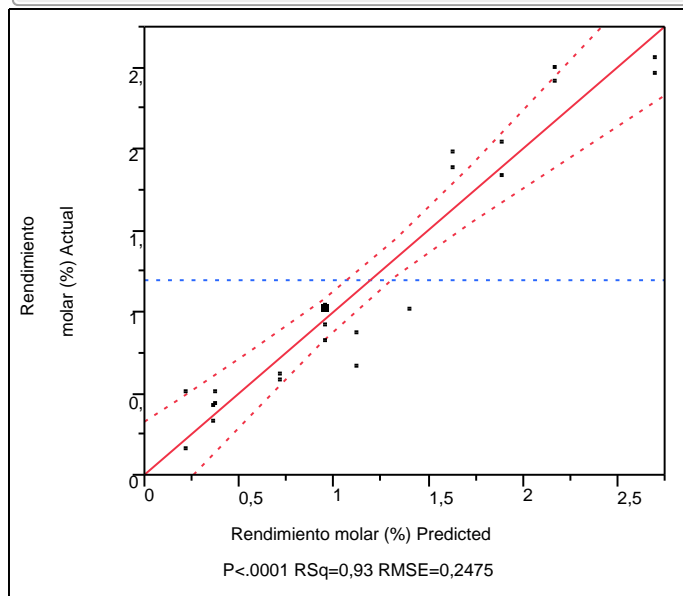
ANEXO H

Diseño factorial completo 4x3 con 12 tratamientos y 2 réplicas para relación estequiométrica y concentración de enzima

Concentración (mg/mL)	Relación estequiométrica aceite:metanol*	Área ME	Moles ME	Rendimiento molar (%)
BLANCO		0	0	
ESTANDAR		1685855	0,0336	
ESTANDAR		1707697	0,034034116	
20	156	151684	1,0469E-05	1,0610
80	56	60526	4,18238E-06	0,4239
80	106	123720	8,53947E-06	0,8655
80	156	283221	1,94831E-05	1,9746
80	206	261141	1,81024E-05	1,8346
140	56	71625	4,95034E-06	0,5017
140	106	145646	1,00366E-05	1,0172
140	156	344769	2,38154E-05	2,4137
140	206	364806	2,51956E-05	2,5535
20	56	72787	5,02041E-06	0,5088
20	106	88088	6,08319E-06	0,6165
20	156	147584	1,01912E-05	1,0329
20	206	130685	9,03402E-06	0,9156
80	56	45837	3,18611E-06	0,3229
80	106	94862	6,55486E-06	0,6643
140	156	355580	2,45764E-05	2,4908
140	206	351138	2,42675E-05	2,4595
20	56	22337	1,556E-06	0,1577
20	106	82011	5,66987E-06	0,5746
20	206	117064	8,11872E-06	0,8228
80	156	269064	1,86104E-05	1,8861
80	206	291065	2,01355E-05	2,0407
140	56	61626	4,26697E-06	0,4325

*Moles de metanol por mol de aceite

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,926613
RSquare Adj	0,905028
Root Mean Square Error	0,247453
Mean of Response	1,198757
Observations (or Sum Wgts)	23

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Model	5	13,143517	2,62870	42,9296	
Error	17	1,040960	0,06123		
C. Total	22	14,184477			<,0001 *

Lack Of Fit

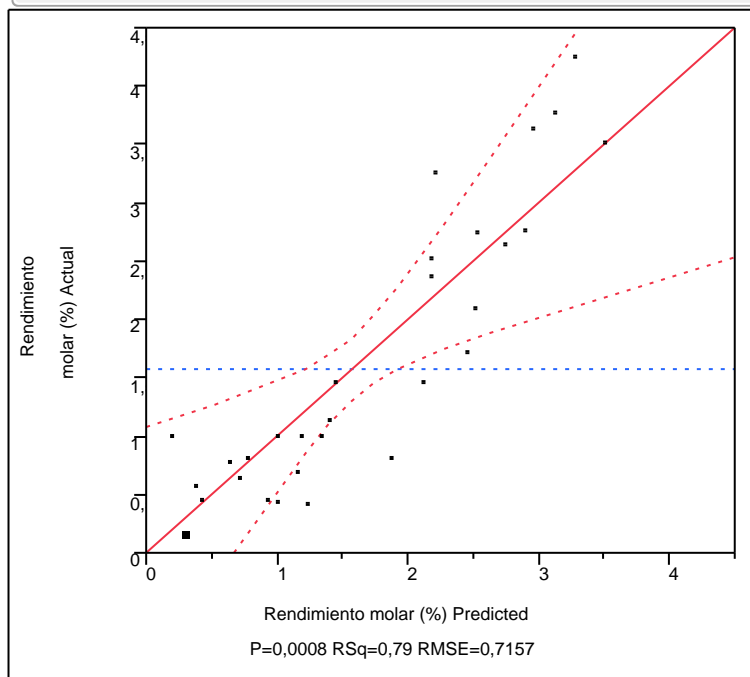
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Lack Of Fit	6	0,9134655	0,152244	13,1354	
Pure Error	11	0,1274946	0,011590	0,0002 *	
Total Error	17	1,0409601			
				Max RSq	
					0,9910

ANEXO I.

Diseño factorial completo 2_{IV}^4 con 2 réplicas, para relación estequiométrica, adición secuencial, cosolvente y cantidad de agua (variables codificadas)

Patrón	Relación estequiométrica	Agua	Adición secuencial	Cosolvente	Area ME	Moles ME	Rendimiento molar (%)
BLANCO	0		
ESTANDAR	4063193		
ESTANDAR	4051329	0,000115862	11,7424
----	-1	-1	-1	-1	99296	3,57521E-05	3,6234
---+	-1	-1	-1	1	125230	5,51075E-06	0,5585
--++	-1	-1	1	-1	43568	2,32265E-05	2,3540
---+	-1	-1	1	1	136158	3,4669E-05	3,5136
+-	-1	1	-1	-1	221472	2,47926E-05	2,5127
++	-1	1	-1	1	95963	4,29634E-06	0,4354
+-	-1	1	1	-1	245943	4,41799E-06	0,4478
+++	-1	1	1	1	155914	1,44134E-05	1,4608
+-	1	-1	-1	-1	299870	2,06873E-06	0,2097
++	1	-1	-1	1	764032	3,72124E-05	3,7714
+-	1	-1	1	-1	754311	6,81788E-06	0,6910
+++	1	-1	1	1	497465	2,69659E-05	2,7330
+-	1	1	-1	-1	724571	9,80525E-06	0,9937
+++	1	1	-1	1	323471	1,10654E-05	1,1215
+++	1	1	1	-1	518154	7,86595E-06	0,7972
++++	1	1	1	1	294460	3,20594E-05	3,2492
----	-1	-1	-1	-1	208344	7,77509E-06	0,7880
---+	-1	-1	-1	1	136992	1,43407E-05	1,4534
--++	-1	-1	1	-1	157497	9,85588E-06	0,9989
---+	-1	-1	1	1	86526	1,689E-05	1,7118
+-	-1	1	-1	-1	200491	7,62086E-06	0,7724
++	-1	1	-1	1	172233	2,59671E-05	2,6317
+-	-1	1	1	-1	191799	6,30798E-06	0,6393
+++	-1	1	1	1	60989	2,71116E-05	2,7477
+-	1	-1	-1	-1	341379	4,36387E-06	0,4423
++	1	-1	-1	1	590982	9,74886E-06	0,9880
+-	1	-1	1	-1	543765	4,18883E-05	4,2453
+++	1	-1	1	1	559849	9,73286E-06	0,9864
+-	1	1	-1	-1	869466	2,06265E-05	2,0905
+++	1	1	-1	1	653008	7,8994E-06	0,8006
+++	1	1	1	-1	414486	1,98941E-06	0,2016
++++	1	1	1	1	145377	4,07354E-06	0,4128

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,790525
RSquare Adj	0,639237
Root Mean Square Error	0,715749
Mean of Response	1,574488
Observations (or Sum Wgts)	32

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Model	13	34,799808	2,67691	5,2253	
Error	18	9,221333	0,51230		Prob > F
C. Total	31	44,021141			0,0008 *

ANEXO J

Diseño experimental de optimización 2^v_{5-1} con cinco puntos centrales

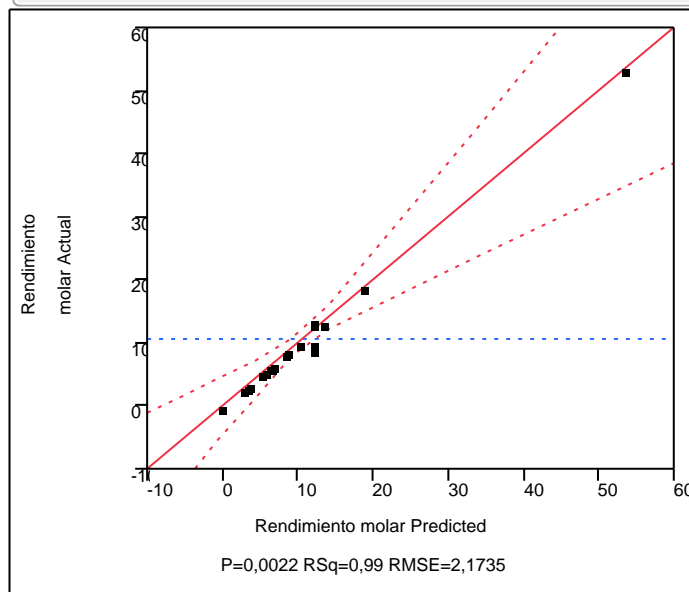
Patrón	Catalizador	Fase Acuosa	Cosolvente	Relación estequiométrica	pH	Área ME	Moles ME (10^{-3})	Rendimiento molar (%)
BLANCO	0	.	.
ESTANDAR	1148385	.	.
MIX 37	2276479	.	.
ESTANDAR	10339465	0,5288	53,5921
MIX 37	-1	-1	-1	-1	1	1041977	0,0533	5,4008
-----+	-1	-1	-1	-1	1	0	0,0000	0,0000
----+-	-1	-1	-1	1	-1	3666052	0,1875	19,0021
---+--	-1	-1	1	-1	-1	726647	0,0372	3,7664
---+++	-1	-1	1	1	1	1269668	0,0649	6,5810
-+----	-1	1	-1	-1	-1	714622	0,0365	3,7041
-++++	-1	1	1	-1	1	586035	0,0300	3,0376
-+++-	-1	1	1	1	-1	2608546	0,1334	13,5208
+----	1	-1	-1	-1	-1	1996327	0,1021	10,3475
+-----	1	-1	-1	1	1	1648628	0,0843	8,5453
+++++	1	-1	1	-1	1	1718736	0,0879	8,9087
+++--	1	1	-1	-1	1	1260651	0,0645	6,5343
++++-	1	1	-1	1	-1	1327907	0,0679	6,8829
+++--	1	1	1	-1	-1	663325	0,0339	3,4382
+++++	1	1	1	1	1	1154289	0,0590	5,9830
00001	0	0	0	0	1	2006214	0,1026	10,3987
00001	0	0	0	0	1	2681389	0,1371	13,8983
00001	0	0	0	0	1	1780683	0,0911	9,2297
00001	0	0	0	0	1	2585426	0,1322	13,4009
00001	0	0	0	0	1	2659981	0,1360	13,7873

Singularity Details

Catalizador*Catalizador = Fase Acuosa*Fase Acuosa = Cosolvente*Cosolvente = Relación

Intercept = pH*pH

Actual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,992044
RSquare Adj	0,960218
Root Mean Square Error	2,173515
Mean of Response	10,47426
Observations (or Sum Wgts)	21

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Model	16	2356,1061	147,257	31,1709	
Error	4	18,8967	4,724		Prob > F
C. Total	20	2375,0028			0,0022 *

ANEXO K

Requisitos del biodiésel para mezcla con combustibles diésel. NTC 5444

Propiedad	Unidades	Requisito	Métodos de ensayo
Densidad a 15 °C	kg/m ³	860 – 900	ASTM D4052 ISO 3675
Número de cetano	Cetanos	47 mínimo	ASTM D613 ISO 5165
Viscosidad (cinemática a 40 °C)	mm ² /s	1,9 – 6.0	ASTM D445 ISO 3104
Contenido de agua	mg/kg	500 máximo	ASTM E203 ISO 12937
Contaminación Total	mg / Kg	24 máximo	EN 12662
Punto de inflamación	°C	120 mínimo	ASTM D93 ISO 2719
Contenido de metanol o etanol	% en masa	0,2 máximo	ISO 14110
Corrosión en lámina de cobre	Unidad	Clase 1	ASTM D130 ISO 2160
Estabilidad a la oxidación (3)	Horas	6 mínimo	EN 14112
Estabilidad térmica	% Reflectancia	70 % mínimo	ASTM D6468
Cenizas sulfatadas	% en masa	0,02 máximo	ASTM D874 ISO 3987
Destilación (PFE)	°C	360 máximo	ASTM D86 ISO 3405
Número ácido	mg de KOH/g	0,5 máximo	ASTM D664 EN 14104
Índice de yodo	gr yodo / 100 gr	120 máximo	EN 14111
Punto de fluidez	°C	Reportar (1)	ASTM D97
Temperatura de Obturación del filtro (CFPP)	°C	Reportar (1)	ASTM D6371 EN 116
Punto de nube/ enturbiamiento	°C	Reportar (1)	ASTM D2500 ISO 3015
Carbón residual	% en masa	0,3 máximo	ASTM D4530 (2) ISO 10370
Contenido de fósforo	mg/Kg	10,0 máximo	ASTM D4951 / Plasma-Masas ISO 14107
Contenido de Na + K	mg/kg	5,0 máximo	ASTM D5863 EN 14108 / EN 14109
Contenido de Ca + Mg	mg/kg	5,0 máximo	ASTM D5863 EN 14108 / EN 14109
Contenido de éster	% en masa	96,5 mínimo	EN 14103
Contenido de alquil ester de ácido linolénico	% en masa	12,0 máximo	EN 14103
Glicerina libre	% en masa	0,02 máximo	ASTM D6584 EN 14105 / EN 14106
Glicerina total	% en masa	0,25 máximo	ASTM D6584 ISO 14105
Contenido de Monoglicéridos	% en masa	0,80 máximo	ASTM D6584 ISO 14105
Contenido de Diglicéridos	% en masa	0,20 máximo	ASTM D 6584 ISO 14105
Contenido de Triglicéridos	% en masa	0,20 máximo	ASTM D 6584 ISO 14105

(1) Los valores para estos parámetros deberán establecerse en las normas técnicas específicas que se definan para cualquier mezcla biodiesel - diesel en cualquier proporción. Los valores definidos deberán ser sustentados en estudios realizados en laboratorios acreditados y avalados por autoridad competente.

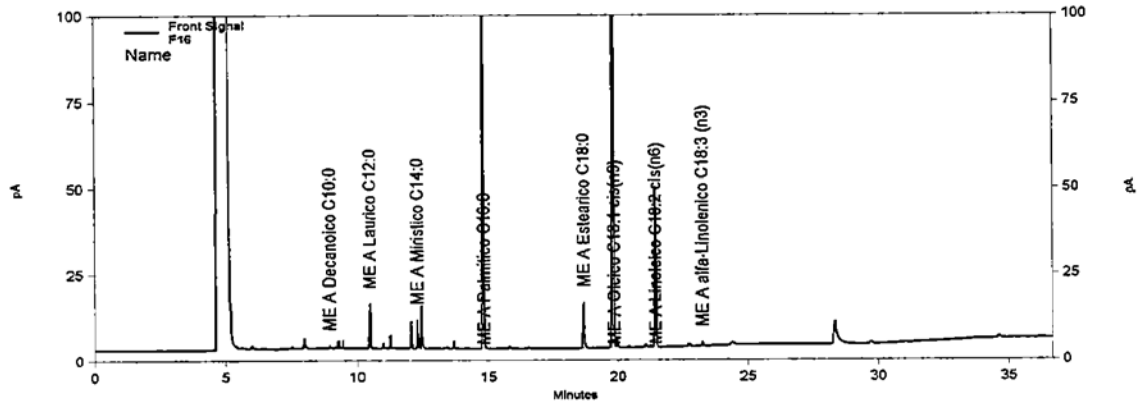
(2) El carbón residual debe ser determinado sobre el 100 % de la muestra.

(3) Se recomienda complementar con el método ASTM D4625, con niveles máximos de 1,5 mg/100 ml a 6 semanas.

NOTA El poder calorífico inferior de referencia reportado por el método ASTM D240 debe estar alrededor de 39 500 KJ/Kg.

ANEXO L

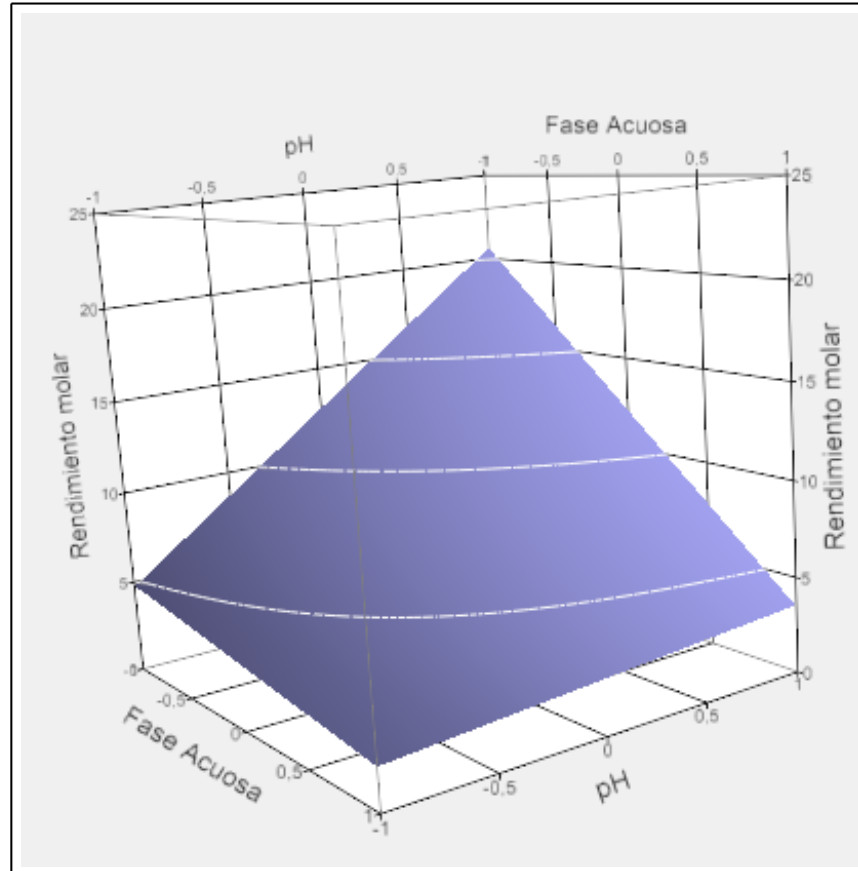
Cromatograma de GC obtenido para muestra de ensayo final



Front Signal Results Time	Name	Area	Area Percent	Resolution (USP)	S/N (ASTM)	Theoretical plates (USP)
9.0	ME A Octanoico C8:0	9424	0.1	15.9	0.0	524807
	ME A Decanoico C10:0				3.3	
	ME A Undecanoico C11:0				0.0	
10.5	ME A Laurico C12:0	239150	2.0	18.8	50.8	434422
	ME A Tridecanoico C13:0				0.0	
12.3	ME A Miristico C14:0	152374	1.3	3.6	57.0	595023
	ME A Miristoleico C14:1 (cis-9)				0.0	
	ME A Pentadecanoico C15:0				0.0	
	ME A Pentadecanoico C15:1 (cis-10)				0.0	
14.9	ME A Palmitico C16:0	4468566	37.9	13.5	1754.1	366206
	ME A Palmitoleico C16:1 (cis-10)				0.0	
	ME A Heptadecanoico C17:0				0.0	
	ME A Heptadecanoico C17:1 (cis-10)				0.0	
18.7	ME A Estearico C18:0	427170	3.6	36.5	49.1	442613
	ME A Elaidico C18:1 trans(n9)				0.0	
19.9	ME A Oleico C18:1 cis(n9)	4140838	35.1	9.9	738.2	424677
	ME A Linoleaidico C18:2 trans(n6)				0.0	
21.5	ME A Linoleico C18:2 cis(n6)	1302891	11.1	4.4	192.0	851566
	ME A gamma-Linolenico C18:3 (n6)				0.0	
	ME A Araquidico C20:0				0.0	
23.3	ME A alfa-Linolenico C18:3 (n3)	25907	0.2	20.0	2.2	1154778
	ME A Eicosenoico C20:1 (n9)				0.0	
	ME A Heneicosenoico C21:0				0.0	
	ME A Eicosadienoico C20:2 (n6)				0.0	
	ME A Behenico C22:0				0.0	
	ME A Eicosatrienoico C20:3 (n6)				0.0	
Totals		10766320	91.3			

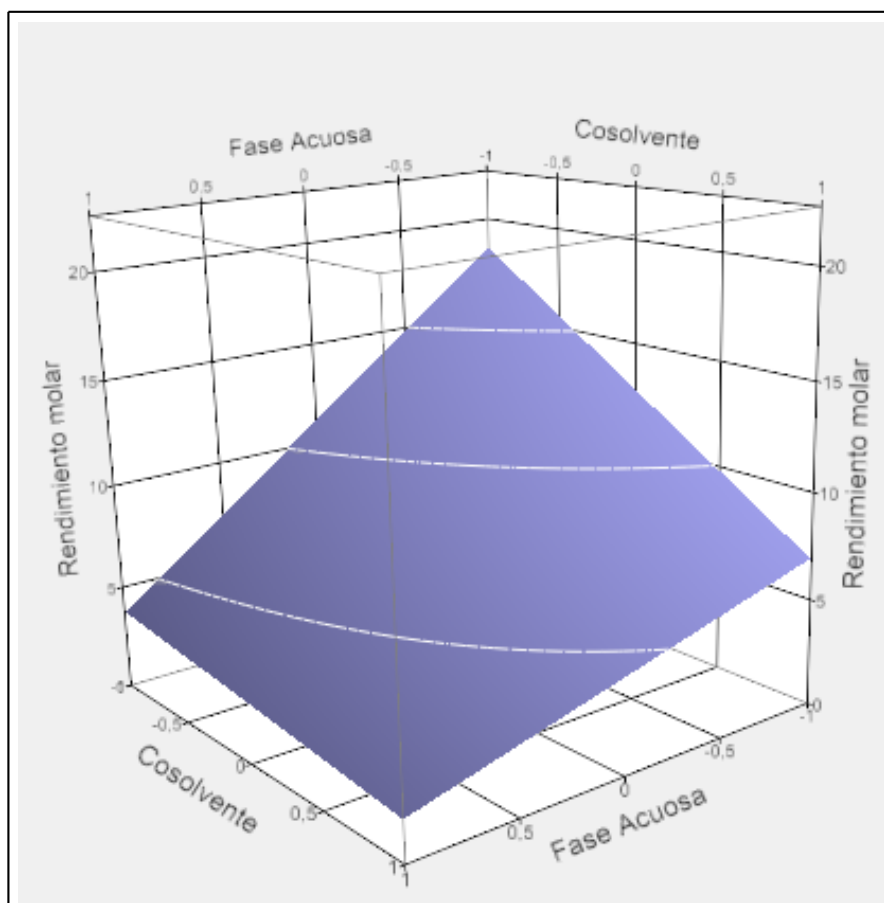
ANEXO M

Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de fase acuosa y pH



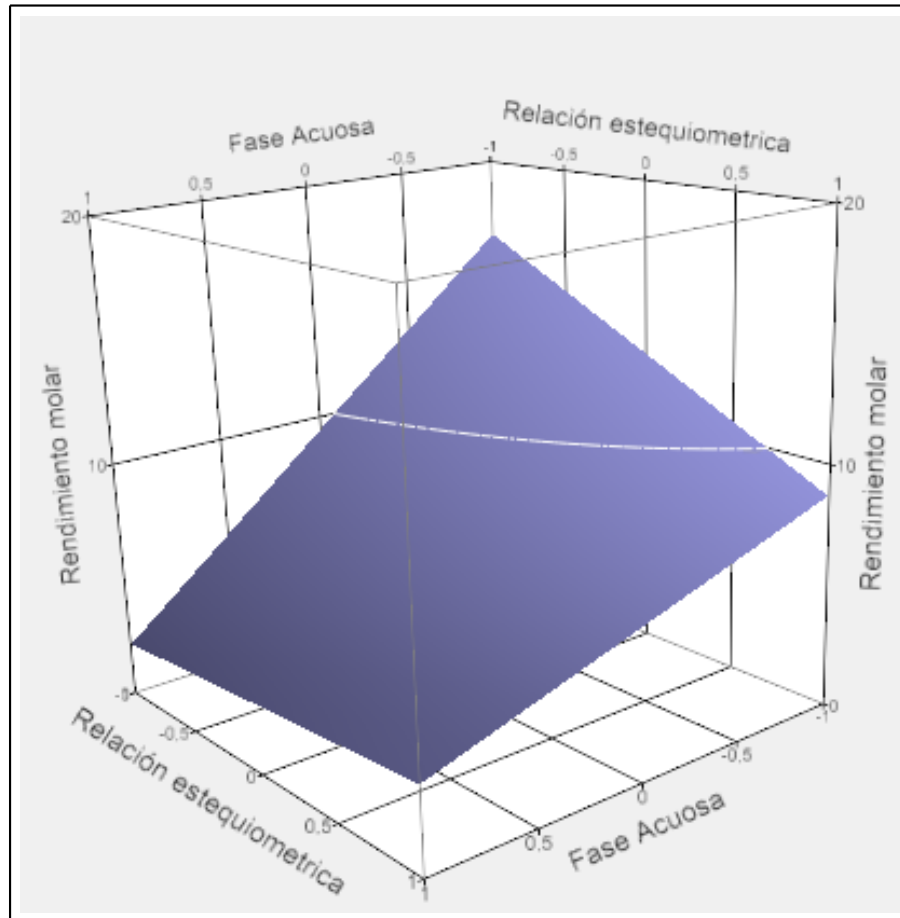
ANEXO N

Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de cosolvente y fase acuosa



ANEXO O

Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y fase acuosa



ANEXO P

Superficie de respuesta y líneas de contorno en función de relación estequiométrica y pH

