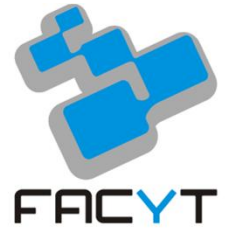




Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Trabajo Especial de Grado



EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS DE GRASA DE POLLO VÍA CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Autor:

Br. James Zambrano

Tutores académicos:

Dr. Oscar Valbuena

Dr. Luis Medina

INDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	7
CAPITULO I.....	11
Planteamiento del problema	11
Descripción del problema	11
Formulación del problema.....	12
Situación Actual.....	12
Justificación	13
Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
CAPITULO II.....	15
Marco teórico	15
Bases teóricas.....	15
Combustibles.	15
Tipos de combustibles	15
Combustibles fósiles.....	16
Diésel o gasóleo.....	16
Combustibles no fósiles.....	16
Reacciones de formación de ésteres alquílicos grasos	16
Biodiesel	17
Tipos de Biodiesel	18
Materia Prima	18
Aceites vegetales y grasas	18

Composición química de la grasa de pollo	19
Alcohol	19
Catalizadores.....	19
Enzimas.....	20
Lipasas	20
Análisis Volumétrico	21
Titulación Acido-Base	21
Espectroscopia infrarroja.....	21
Cromatografía de gases.....	22
Antecedentes.....	22
Elaboración de biodiesel por vía enzimática	22
Uso de grasa animal para la producción de biodiesel.....	23
CAPITULO III	25
Marco metodológico.....	25
Material Biológico	25
Cultivo bacteriano.....	25
Obtención de la grasa de origen animal.....	25
Caracterización química de la grasa extraída de tejido animal.....	25
Determinación del índice de acidez y porcentaje de ácidos grasos libres.	25
Determinación del número de saponificación e índice de éster.	26
Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano	26
Determinación de la actividad degradadora de grasa del consorcio bacteriano	26
Obtención y aislamiento de lipasas extracelulares	27
Cuantificación de proteínas totales en SLC.....	27
Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica	27
Elaboración de Biodiesel	28

Reacciones de transesterificación	28
Análisis instrumental del producto de transesterificación	28
Espectroscopia infrarroja	28
Cromatografía de gases.....	28
CAPITULO IV	29
Resultados	29
Caracterización de la grasa animal	29
Cinética del crecimiento bacteriano.....	29
Determinación de la grasa remanente en cultivos bacterianos	30
Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica	31
Caracterización de la muestra de grasa antes y después del proceso de transesterificación.	33
Espectroscopia infrarroja	33
Análisis por cromatografía de gases	34
CAPITULO V	36
Discusión	36
Caracterización química de la grasa	36
Cinética del crecimiento bacteriano.....	37
Cuantificación de la actividad lipolítica	37
Reacciones de transesterificación	38
Caracterización de la muestra de grasa antes y después de la transesterificación.....	38
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFIA.....	42
ANEXOS.....	46

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla I.</i> Contenido de ácidos grasos en la grasa de pollo.....	19
<i>Tabla II.</i> Características químicas de la grasa animal extraída de tejido adiposo de pollo.....	29
<i>Tabla III.</i> Cantidad de grasa y pH en las alícuotas de los sistemas Control y Digestión respecto al tiempo de incubación.....	31
<i>Tabla IV.</i> Proteínas totales según método de Bradford (1976), actividad enzimática y actividad enzimática específica del sobrenadante libre de células (SLC).	32

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2.1.</i> Reacciones generadas durante el proceso de metanólisis. Fuente: Morrison & Boyd. (1998)	17
<i>Figura 2.2.</i> Mecanismos de reacción de la transesterificación acida y básica. Fuente: Morrison & Boyd. (1998).....	17
<i>Figura 2.3.</i> Reacción de hidrólisis de los triglicéridos catalizada por lipasas.	20
<i>Figura 2.4.</i> Diagrama de un cromatógrafo de gases.	22
<i>Figura 4.1.</i> Cinética del crecimiento bacteriano en MMM suplementado con grasa como única fuente de carbono.	30
<i>Figura 4.2.</i> Cantidad de grasa remanente en los sistemas Control y Digestión tras 96 horas de incubación.	31
<i>Figura 4.3.</i> Actividad lipolítica del sobrenadante libre de células (SLC).....	32
<i>Figura 4.4.</i> Producto final del proceso de transesterificación, se evidencia una separación de fases.	33
<i>Figura 4.5.</i> Espectro infrarrojo de la muestra de grasa antes y después de la transesterificación.	34
<i>Figura 4.6.</i> Cromatograma de la muestra de grasa animal antes del proceso de transesterificación.	35
<i>Figura 4.7.</i> Cromatograma de la muestra de grasa animal luego del proceso de transesterificación.	35

RESUMEN

En el presente estudio se aislaron enzimas lipolíticas extracelulares de un consorcio bacteriano con la finalidad de producir ésteres metílicos de ácidos grasos, a partir de residuos de grasa animal. Se definieron las condiciones óptimas para producir lipasas utilizando un medio mínimo salino suplementado con grasa, como única fuente de carbono, se determinó la actividad enzimática específica mediante titulación de ácidos grasos estableciéndose las condiciones necesarias para producir reacciones de transesterificación vía catálisis enzimática. Finalmente, se caracterizó el producto obtenido mediante espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases. Se obtuvo que la grasa de pollo presentó un índice de acidez de 19,786 mg KOH/g equivalente a una proporción de 9,95% de ácidos grasos libres, un peso molecular promedio de 225,8 g/mol y un índice de éster de 206,013 mg KOH/g equivalente a 12,16% de glicerol. El consorcio bacteriano degradó un máximo de 95% de grasa en un período de 96 h y los sobrenadantes libres de células reportaron una actividad lipolítica específica promedio de 190 U/mg. Las reacciones de transesterificación se establecieron bajo las siguientes condiciones: relación molar 1:3 triglicérido:metanol, 2 mL del sobrenadante libre de células, e incubación por 24 h a 37°C en agitación constante a 300 rpm. Una vez obtenida la fase orgánica se caracterizó mediante espectrometría infrarroja obteniendo señales diferentes en las muestras antes y después de las reacciones de transesterificación. Seguido de esto se realizó un perfil de la muestra mediante cromatografía de gases antes y después del tratamiento enzimático, los cromatogramas arrojaron señales y tiempos de retención que podrían indicar la presencia de ésteres metílicos en la muestra transesterificada. Se demostró que la grasa animal es una materia prima viable para la producción de biodiesel vía catálisis enzimática.

ABSTRACT

In this study extracellular lipolytic enzymes were isolated from a bacterial consortium to be used as catalyzer to produce fatty acids methyl esters, using animal fat and methanol. In order to do this optimal conditions were established to produce lipase by using minimal saline medium supplemented with animal fat, as the sole carbon source, the lipolytic activity was estimated by titration of fatty acids and conditions for transesterification were established. Finally the product was characterized by infrared spectroscopy and gas chromatography. Chicken fat reported an acid value of 19,785 mg KOH/g equivalent to 9,95% of free fatty acids, molecular weight of 225,8 g/mol and an ester value of 206,013 mg KOH/g equivalent to 12,16% of glycerol. The bacterial consortium hydrolyzed 95% of fat after 96 h of incubation and the free cell supernatants reported an average specific lipolytic activity of 190 U/mg. Transesterification reactions were performed under the following conditions: molar ratio 1:3 triglyceride:methanol, 2mL of free cells supernatant, incubated for 24 h, 37°C and permanent shaking at 300 rpm. Once the organic phases were obtained, they were characterized by IR spectroscopy, which detected in different signals between the samples before and after the treatments, also the gas chromatography profiles were made before and after the transesterification reactions. Chromatograms showed signals and retentions times that might indicate the presence of fatty acids methyl esters. The study demonstrated that chicken fat it's a viable raw material for biodiesel production using lipolytic enzymes.

INTRODUCCIÓN

El deterioro ambiental y la creciente producción de desechos, como consecuencia de las actividades cotidianas del ser humano, se ha convertido en uno de los principales problemas de la sociedad moderna. A causa de esto se ha incrementado la búsqueda de alternativas que compense tal desequilibrio y que se enfoquen en lograr el desarrollo sostenible. Entre las actividades de mayor impacto ambiental se encuentra el crecimiento del parque automotor que deriva en el incremento de la emisión de gases de efecto invernadero, gracias a la combustión incompleta de combustibles fósiles como la gasolina y el diésel.

La industria alimentaria también tiene su impacto sobre el medio ambiente, especialmente en la generación de residuos que posteriormente son descargados al medio ambiente. Entre estos, los residuos grasos al descomponerse forman compuestos altamente tóxicos consecuencia de la peroxidación lipídica, los cuales generan olores nauseabundos que pueden atraer plagas e inclusive podrían afectar la salud de las comunidades que estén en contacto; representando un problema de salud pública (Cirne *et al.* 2007).

En la búsqueda de solucionar los problemas generados por las actividades humanas, el reciclaje de estos elementos considerados desechos altamente contaminantes, ha surgido la propuesta de producir combustible a partir de los mismos. De tal manera, la transesterificación de los triglicéridos contenidos en los residuos grasos en combinación con un alcohol, usualmente metanol, y un catalizador, es posible generar ésteres alquílicos de ácidos grasos, denominados comúnmente biodiesel, y glicerina como subproducto de la reacción (Rashid & Anwar, 2007).

El biodiesel, producto de la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales, constituye un combustible biodegradable, no tóxico, libre de azufre y compuestos que han sido reportados como carcinógenos; presenta además, un importante potencial para su uso como combustible alternativo en motores de encendido por compresión (Demirbas, 2007).

Para que la propuesta del biodiesel sea viable es necesario que su costo sea menor en comparación al diésel convencional, para ello la materia prima debe ser de bajo costo, según algunos estudios (Haas *et al.*, 2006) esta representa entre 75 a 88% del costo total, por ende el uso de desechos para su elaboración podría solventar este inconveniente mientras que a su vez elimina

o minimiza la problemática de la disposición de estos elementos contaminantes. De igual forma el uso de enzimas, provenientes de bacterias presentes en los mismos desechos, como catalizadores de la reacción, puede promover el efecto deseado, producir biocombustible de manera económica.

Tomando en cuenta lo expuesto, se propone producir biodiesel mediante reacciones de transesterificación utilizando desecho de grasa animal y enzimas con actividad lipasa, provenientes de un consorcio bacteriano, como catalizador de la reacción.

CAPITULO I

Planteamiento del problema

Descripción del problema

El calentamiento global es un problema en auge cuyas consecuencias recaen sobre los diversos ecosistemas, ciudades, entre otros, ocasionando alteraciones en el equilibrio de la vida en nuestro planeta. Consiste en el incremento de los gases de efecto invernadero ya existentes en la atmósfera gracias a la combustión incompleta de combustibles fósiles que generan compuestos no deseados como CO₂, CO, NO_x, SO_x, entre otros, los cuales evitan que la radiación proveniente del sol salga del planeta ocasionando un incremento paulatino de la temperatura global (Jawoeowski *et al.*, 1992).

Venezuela no está exenta de contribuir a este problema, principalmente por el incremento del parque automotor y el desarrollo industrial que se ha experimentado en las últimas décadas. Esto deriva en un mayor uso de combustibles fósiles, especialmente cuando su obtención y explotación no es una limitante al ser un país con grandes reservas de petróleo y gas natural. Tales características han generado preocupación y necesidad, por parte de científicos e investigadores en disminuir el uso de combustibles fósiles no renovables, a través de alternativas biodegradables que generen productos con propiedades físicas, químicas y biológicas amigables al medioambiente y los ecosistemas.

Desde el punto de vista químico, el biodiesel es una mezcla de ésteres alquílicos, provenientes de los triglicéridos de aceites vegetales o grasas animales, empleados como materia prima. Es un combustible líquido, biodegradable y no contaminante; se puede utilizar puro o mezclado con gasolinas, en el transporte urbano, maquinaria agrícola y el área de la minería. (Pahl, 2008).

El uso de dicho combustible ya ha sido implementado en otros países mayormente a partir de aceites de origen vegetal, de modo que ha adquirido popularidad a nivel mundial como fuente de energía alternativa. Algunas de las ventajas que exhibe el uso de biodiesel es la reducción de emisiones de CO₂, compuestos de sulfuro, humo y olores nocivos (Yang *et al.*, 2007). Se puede

utilizar puro en los motores diésel más modernos y en los más antiguos se puede mezclar con el diésel de origen fósil, inclusive así, con esta última alternativa, se obtiene el beneficio de la reducción de la contaminación ambiental. Su punto de inflamación se encuentra alrededor de los 130°C (Pahl, 2008), siendo superior al del diésel convencional, por lo tanto su manipulación y almacenamiento son más seguros. El costo del biodiesel es dependiente de la materia prima utilizada, tomando en cuenta que la obtención de aceites vegetales incluye todo el proceso agrícola, su costo podría inclusive superar al del diésel de origen fósil, al menos en lo que respecta a nuestro país, por lo tanto el uso de desechos de origen animal aparenta un panorama más amistoso desde el punto de vista económico.

Los desechos de origen animal producto de la industria alimentaria, específicamente la industria cárnica, representan un impacto negativo al ambiente, desde el punto de vista sanitario, una incorrecta disposición de los desechos puede generar condiciones ideales para la proliferación de enfermedades, de igual forma pueden contaminar fuentes de agua y contribuir con un malestar a las comunidades afectadas por el olor fétido que tales residuos generan (Chin *et al.*, 2010). Esto representa un problema para las empresas de procesamiento animal, las cuales tienen que lidiar con altos costos para su eliminación mediante traslado a vertederos, incineración o contención en hornos de cemento. Bajo estas condiciones, el uso de estos residuos de origen animal como materia prima para la obtención de una fuente de energía no contaminante parece una opción más que ideal, disminuyendo el costo de producción de biodiesel y a su vez facilitando la eliminación de los desechos contaminantes de la industria de procesamiento animal.

Formulación del problema

Teniendo en cuenta esta situación y en búsqueda de ofrecer solución a las problemáticas de índole ambiental expuestas, se planteó producir biodiesel o esteres metílicos de ácidos grasos a partir de residuos de grasa animal mediante el uso de lipasas de origen bacteriano.

Situación Actual

La obtención de biodiesel es un proceso comprobado en distintos países (Vieira *et al.*, 2006; Rashid & Anwar, 2007; Xuejun *et al.*, 2008) y se utiliza mezclado con diésel convencional, o puro en vehículos diésel más modernos. En Venezuela, se encuentra en investigación, a partir de aceites de origen vegetal (Guerreo & Seijas, 2008), pero no se evidencian estudios utilizando residuos de grasas de origen animal.

Justificación

Esta investigación presenta aportes relevantes de carácter social y ambiental, ya que constituye una herramienta tecnológica para lograr una disminución del impacto que tienen los residuos grasos industriales contaminantes, cuya eliminación representa un alto costo económico y energético; así como también la reducción del elevado consumo de combustibles no renovables, incidiría positivamente, al disminuir el volumen de las emanaciones de gases de efecto invernadero y sustancias nocivas para la salud que son producto de la combustión de combustibles fósiles.

Otro aspecto importante es que la opción del biodiesel es atractiva por la disminución de los costos de producción, al utilizar como materia prima elementos clasificados como desechos y de costosa eliminación. Adicionalmente el uso de enzimas para la producción de dicho combustible, evita problemas asociados a otras vías de elaboración, por ejemplo el uso de catalizadores básicos, que tienden a reaccionar durante la elaboración del biodiesel generando jabones, producto de una reacción de saponificación (Vieira *et al.*, 2006), que debe ser entonces eliminado mediante un proceso adicional que involucra mayor tiempo, costo y gasto energético.

Desde el punto de vista teórico este proyecto es de relevancia para el país, ya que contribuye en la profundización de conocimientos en cuanto a condiciones de operación y procesos de obtención de biodiesel utilizando enzimas de origen bacteriano y residuos de grasa animal; lo cual es un tópico con poco o nulo precedente en Venezuela, donde solo se ha vislumbrado la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales vírgenes y aceites vegetales de desecho (Guerreo & Seijas, 2008).

Objetivos

Objetivo general

Producir biodiesel a partir de grasa animal, vía catálisis enzimática, con la finalidad de implementar una alternativa biotecnológica a la problemática de contaminación ambiental producida por el uso de combustible diésel y por empresas procesadoras de productos cárnicos.

Objetivos específicos

- Aislar las enzimas extracelulares con actividad lipasa de consorcios bacterianos previamente caracterizados.
- Caracterizar químicamente el residuo graso de origen animal.
- Determinar condiciones experimentales para la elaboración de biodiesel, es decir hidrólisis del residuo graso y esterificación, en presencia de metanol, para producir ésteres metílicos de ácidos grasos.
- Caracterizar mediante cromatografía de gases y espectrometría infrarroja un perfil de ácidos grasos y ésteres metílicos de la muestra de grasa de pollo antes y después del tratamiento enzimático.

CAPITULO II

Marco teórico

Bases teóricas

Combustibles.

Un combustible es cualquier sustancia que, en contacto con el oxígeno del aire y a partir de una determinada temperatura, arde y produce energía (Johansson, 1993). Es por lo tanto, cualquier material capaz de producir energía cuando se transforma su estructura química, que al provenir de una reacción química, se conoce como energía química (Johansson, 1993).

Tipos de combustibles

Existen diferentes formas de clasificar los combustibles.

Según su estado de agregación:

- Combustibles sólidos: como el carbón, la madera, entre otros.
- Combustibles fluidos: acá se encuentran los que están en estado líquido como el diésel, gasolina, entre otros.
- Combustibles gaseosos: tales como el gas natural, el propano y el butano.

Según el estado de preparación:

- Naturales: se usan tal y como aparecen en su origen.
- Elaborados: aquellos que antes de ser consumidos son sometidos a determinados procesos de transformación.

Según su origen:

- Combustibles fósiles: como el petróleo y el gas natural.
- Combustibles no fósiles: o biocombustibles, como el biodiesel, biogás, bioetanol, entre otros. (Johansson, 1993)

Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles son mezclas de compuestos orgánicos que se extraen del subsuelo con la intención de producir energía por combustión. Entre algunos de los más utilizados se encuentran el gas butano, el gas natural, nafta y el diésel o gasóleo (Sarin, 2012).

Diésel o gasóleo

El combustible diésel es una mezcla compleja de hidrocarburos compuesta principalmente por parafinas y aromáticos, con un contenido de olefinas que alcanza solo un pequeño porcentaje por volumen (Bennet, 2009)

Se obtiene de la fracción destilada del petróleo denominada gasóleo (15 a 18 átomos de carbono). Tiene propiedades diferentes a la gasolina pues esta contiene hidrocarburos más livianos. Es mucho más pesado y aceitoso que la gasolina, se le suele denominar algunas veces como aceite diésel. Se evapora lentamente y su punto de ebullición es más alto. Es utilizado en motores diésel (Bennet, 2009).

Combustibles no fósiles

El biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de biomasa, bien sea organismos vivos o sus desechos metabólicos. Los más utilizados actualmente son el bioetanol y el biodiesel. Este último constituye un combustible obtenido a partir de grasas animales o aceites vegetales. Está compuesto de ésteres alquílicos de ácidos grasos, producidos a través de una reacción de transesterificación (Sarin, 2012).

Reacciones de formación de ésteres alquílicos grasos

Existen dos vías químicas de formación para producir ésteres alquílicos: por esterificación directa de los ácidos grasos, o a partir de la transesterificación catalítica de triglicéridos (Albis *et al.*, 2005).

Para transesterificar un ácido graso, se realiza un proceso denominado alcoholólisis, el cual se suele llevar a cabo con metanol, y consiste en tres reacciones reversibles y consecutivas, en las cuales se forman como intermediarios monoglicéridos y diglicéridos. El esquema de reacción implica que el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicéridos, monoglicéridos y glicerol, liberando un mol de éster alquílico en cada etapa de la reacción, como se aprecia en la Figura 2.1.

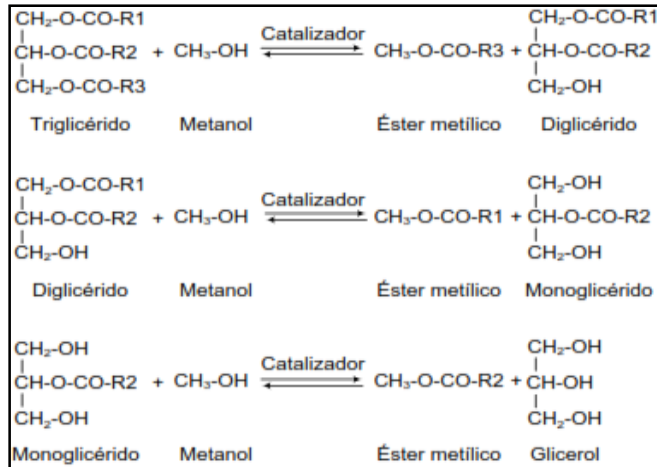


Figura 2.1. Reacciones generadas durante el proceso de metanolisis. Fuente: Morrison & Boyd. (1998).

Además el proceso de transesterificación puede ser catalizado mediante el uso de ácidos o bases, siendo los mecanismos de reacción los ilustrados en la Figura 2.2.

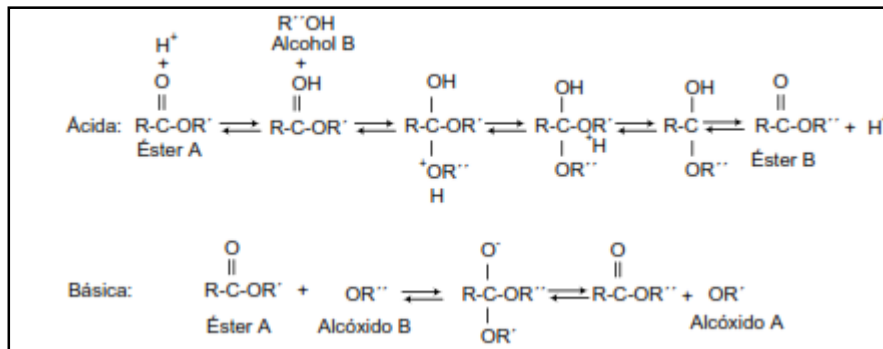


Figura 2.2. Mecanismos de reacción de la transesterificación ácida y básica. Fuente: Morrison & Boyd. (1998).

Biodiesel

Según Rivas (2004), el biodiesel se define como el éster monoalquílico de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos renovables, como por ejemplo aceites vegetales o grasas animales, para ser utilizado en motores diésel.

En el proceso de transesterificación los ésteres que forman parte de las grasas y aceites llamados triglicéridos, reaccionan con metanol (CH₃OH) o cualquier alcohol de bajo peso molecular, obteniéndose ésteres metílicos (biodiesel) y glicerol. Se emplea un catalizador, siendo el hidróxido de sodio (NaOH) el utilizado con mayor frecuencia (Demibras, 2007).

El biodiesel presenta algunas ventajas comparado a los combustibles fósiles, especialmente desde el punto de vista ambiental y de desarrollo sostenible; la materia prima de la que se obtiene (biomasa) es un recurso renovable y en la combustión no se emiten gases contaminantes y residuos sólidos, entre otros (Hilbert, 2004).

Entre otras ventajas del biodiesel frente al diésel convencional derivado de petróleo, están las relacionadas con las emisiones atmosféricas:

- Monóxido de carbono (CO): la emisión durante la combustión del biodiesel es aproximadamente 50% menor.
- Dióxido de azufre (SO₂): no se produce emisión de dióxido de azufre, y por lo tanto, el biodiesel no contiene azufre.
- Material particulado: esta emisión se reduce en un 65% en relación al diésel convencional.
- Productos orgánicos aromáticos: el biodiesel no contiene productos aromáticos, como el benceno y sus derivados, los cuales son conocidos por presentar alta toxicidad.
- Balance de dióxido de carbono (CO₂): el dióxido de carbono emitido durante la combustión del biodiesel es reabsorbido por los vegetales. Por lo tanto el biodiesel puede ser considerado un combustible renovable (Scragg, 2009).

Tipos de Biodiesel

Los distintos tipos de biodiesel, provienen de las distintas materias primas. Estas comprenden básicamente aceites vegetales nuevos o usados, grasas de origen animal, un alcohol de bajo peso molecular y un catalizador.

Materia Prima

Aceites vegetales y grasas

Son lípidos simples formados por ésteres de ácidos grasos con glicerol. Generalmente, se refieren a los lípidos de origen vegetal, independientemente del estado líquido o sólido que adquieran, según la temperatura ambiental o su punto de fusión (Yagüe, 2003).

Una grasa o aceite está conformado por triglicéridos, cada uno es una molécula de glicerol esterificada con tres ácidos grasos. Se conocen más de 40 ácidos grasos con fórmula general $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, donde n varía según el ácido graso y determina la longitud de la cadena de

átomos de carbono. Los principales ácidos grasos son: oléico, linoléico, palmítico, esteárico y palmitoléico (Yagüe, 2003).

Composición química de la grasa de pollo

La composición específica de la grasa en animales es variable y está sujeta a la dieta y otros factores. Sin embargo, es posible encontrar en la bibliografía (Gunstone, 1996) cuales ácidos grasos son los más abundantes según el origen de la grasa, en el caso del pollo esta expresado en la siguiente tabla:

Tabla I. Contenido de ácidos grasos en la grasa de pollo. Fuente: Gunstone (1996)

Saturados 29%	Insaturados 65%
22% Ácido palmítico 16:0	37% Ácido oléico 18:1 n-9
6% Ácido esteárico 18:0	20% Ácido linoléico 18:2 n-6
1% Ácido Mirístico 14:0	6% Ácido palmitoléico 16:1 n-7
6% Otros	1% Ácido gadoléico 20:1 n-9
	1% Ácido linolénico 18:3 n-3

Alcohol

Entre los alcoholes que se puede utilizar en la reacción de transesterificación están el metanol, etanol, butanol y el alcohol amílico. Sin embargo, los más utilizados gracias a su bajo costo son el etanol y el metanol (Scragg, 2009).

Catalizadores

En la reacción de transesterificación se utiliza un catalizador para mejorar la velocidad de reacción y el rendimiento final. Los catalizadores pueden ser ácidos (H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 , entre otros), básicos (KOH , $NaOH$) o enzimáticos (lipasas: *Candida*, *Penicillium*, *Pseudomonas*) (Scragg, 2009).

Enzimas

Las enzimas en general son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas por su extraordinaria especificidad y su poder catalítico, muy superior al de los catalizadores hechos por el hombre (Nelson & Cox, 2004). Dichas moléculas son generalmente proteínas globulares que pueden presentar tamaños variables hasta de 2500 aminoácidos. Su actividad viene determinada por su estructura tridimensional, la cual viene a su vez determinada por la secuencia de aminoácidos. Las enzimas son mucho más grandes que los sustratos donde actúan y solo una pequeña parte de la enzima participa directamente en la catálisis, dicha región se define como centro activo (Voet *et al.*, 2007). Al igual que las demás proteínas, las enzimas se componen cada una de una cadena lineal de aminoácidos que se pliegan durante el proceso de traducción para dar origen a una estructura terciaria tridimensional. Cada secuencia de aminoácidos es única y por lo tanto da lugar a una estructura única con propiedades específicas.

Lipasas

Las lipasas y las esterasas, conocidas colectivamente como “enzimas lipolíticas”, son caracterizadas por su capacidad de hidrolizar el enlace éster formado por ácidos carboxílicos de longitud de cadena variable e hidrofóbicas (Singh *et al.*, 2006).

Las lipasas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster en la interfase agua/aceite, mientras que las esterasas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de sustratos solubles en agua. La Figura 2.3 muestra la reacción química involucrada en la hidrólisis de triglicéridos por acción de las lipasas.

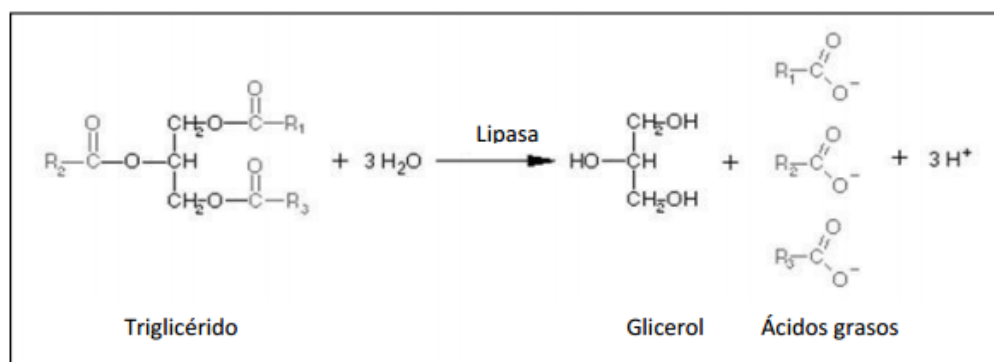


Figura 2.3. Reacción de hidrólisis de los triglicéridos catalizada por lipasas.

Las lipasas son ampliamente usadas en la industria para la producción de fármacos, cosméticos, cuero, detergentes, alimentos, perfumes, diagnósticos médicos, y otros materiales sintéticos orgánicos (Singh *et al.*, 2006)

Análisis Volumétrico

La titulación o valoración es un método común de laboratorio utilizado para determinar una concentración desconocida de un analito identificado. Un reactivo denominado titulador es preparado como solución estándar. Un volumen y concentración de titulador reacciona con una solución del analito para determinar su concentración. Se utiliza una bureta calibrada para adicionar el titulador y un indicador para determinar el fin de la titulación, el mismo dependerá del tipo de titulación a realizar (Valcárcel & Gómez, 1994).

Titulación Acido-Base

Es un método de análisis cuantitativo que permite conocer la concentración desconocida de una disolución de una sustancia que pueda actuar como ácido neutralizada por medio de una base de concentración conocida, o bien sea una concentración de base desconocida neutralizada con una solución de ácido conocido. Este tipo de titulación se basa en una reacción ácido-base o reacción de neutralización entre el analito y el titulador. Para realizar una titulación ácido-base se requiere de una bureta calibrada, un matraz cónico, una disolución estándar, la muestra a analizar y un indicador de pH. Este último tiene la característica de sufrir un cambio de coloración al alcanzar el punto de equivalencia de la valoración ácido-base. Los indicadores suelen de ser ácidos o bases orgánicas débiles y la zona de viraje de cada indicador se sitúa aproximadamente entre una unidad de pH por debajo y una unidad por encima del valor de su pK_a (Valcárcel & Gómez, 1994).

Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia IR es la rama de la espectroscopia que estudia la región infrarroja del espectro electromagnético, la cual es luz con una longitud de onda más larga y una menor frecuencia que la luz visible. Dada una muestra que puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso, la técnica de espectrometría infrarroja usa un instrumento denominado espectrómetro infrarrojo para producir un espectro infrarrojo. Un espectro infrarrojo básico es un gráfico con la absorbancia de la luz infrarroja en el eje vertical vs número de onda en el eje horizontal (Morrison & Boyd, 1998).

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Valcárcel & Gómez, 1994).

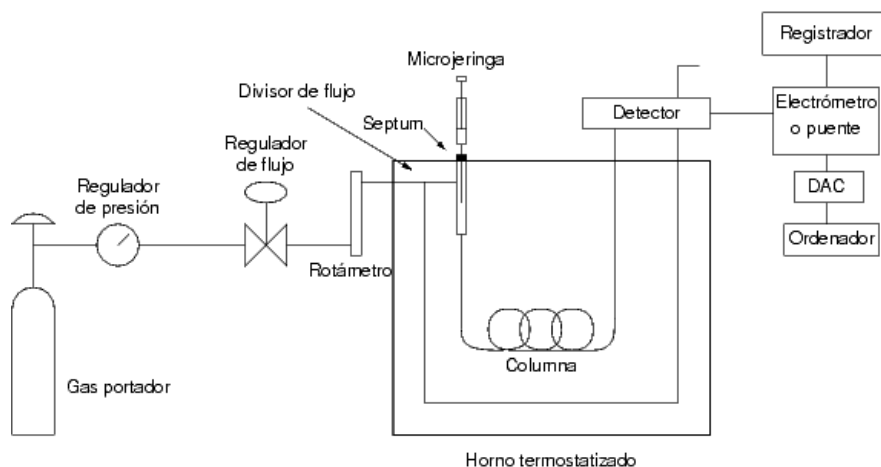


Figura 2.4. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte (McNair & Miller, 1998).

Antecedentes

Elaboración de biodiesel por vía enzimática

En el 2000, Abigor *et al.*, estudiaron la elaboración de biodiesel utilizando aceite de palma y aceite de coco por transesterificación, utilizando distintos alcoholes y lipasa PS30 como catalizador. Los

autores observaron que en la conversión de aceite de palma a ésteres alquílicos, el etanol presentó una conversión de 72%, terbutanol 62%, 1-butanol 42%, isopropanol 24% y un 15% utilizando metanol. En el caso del aceite de coco, 1-butanol e isobutanol lograron un 40% de conversión, 1-propanol 16% y etanol un 35%. Concluyeron que el metanol presentó una eficiencia pobre en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales, a diferencia del etanol cuya eficiencia de conversión fue del 72%. Concluyendo que el alcohol a utilizar influye en la tasa de conversión.

Vieria *et al.* (2006) estudiaron la influencia de las variables, relación molar ácido palmítico/alcohol, temperatura de reacción y concentración de la enzima, sobre la tasa inicial de reacción en la elaboración de biodiesel utilizando ácido palmítico. Durante la experimentación el mejor resultado obtenido fue bajo las siguientes condiciones: una relación molar de ácido palmítico/etanol de 0.50, temperatura de 67°C y una concentración enzimática de 4.40% (p/p). Utilizando análisis estadísticos concluyeron que la concentración de la enzima y la relación molar ácido palmítico/etanol, fueron las variables más significativas en afectar la tasa inicial de reacción.

En el año 2008, Dizge & Keskinler evaluaron la producción de biodiesel utilizando enzimas de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizadas en espuma de poliuretano durante la transesterificación de aceite de canola con metanol. En dicho estudio encontraron que las condiciones óptimas para procesar 20 gramos de aceite de canola refinado fueron: 430 µg de lipasa, una relación molar de 1:6 aceite/metanol, 0,1 gramos de agua y 40°C para la reacción con metanol. La proporción máxima de ésteres metílicos (biodiesel) obtenidos fue del 90%. Los autores concluyeron que la lipasa inmovilizada permaneció estable y perdió poca actividad al ser sujeta a un uso reiterado. En lo referente al presente estudio, aporta la base de que la transesterificación catalizada mediante lipasas tiene una alta eficiencia.

Uso de grasa animal para la producción de biodiesel

En el estudio de Lee *et al.*, en 2002, una muestra de manteca fraccionada presentando un bajo contenido de ácidos grasos saturados fue convertida a ésteres monoalquílicos por vía enzimática y por vía de alcoholisis básica para producir biodiesel. Además estudiaron el efecto del gel de sílice en la inmovilización de la enzima. La grasa desechada de un restaurante fue tratada mediante filtración y cromatografía para remover ácidos grasos libres, para luego ser esterificados en la producción de biodiesel. Los autores observaron que la actividad de la lipasa disminuyó por el exceso de metanol, de modo que empezaron a adicionar el metanol de forma secuencial tras 24

horas, de esa forma obtuvieron una conversión a ésteres metílicos del 74%. Las grasas tratadas lograron un 96% de conversión tras 24 horas de reacción. Concluyeron que los ésteres alquílicos producidos a partir de grasa de origen animal, pueden ser utilizados como combustible, potencialmente como biodiesel.

Rivera *et al.* (2009), estudiaron el efecto de la relación molar y el uso de terbutanol como solvente sobre la reacción de transesterificación sobre residuos grasos animales extraídos de residuos orgánicos de un matadero municipal. Para ello caracterizaron las materias primas y llevaron a cabo los estudios de los efectos estadísticamente significativos de algunos parámetros sobre la velocidad inicial de reacción y la conversión. Concluyeron que el exceso de etanol fue la mejor condición para la reacción, alcanzando conversiones de 80% en 48 horas.

En 2013 Cunha *et al.* obtuvieron resultados positivos en torno a la optimización de la conversión de una mezcla de grasa animal en biodiesel usando etanol. Utilizando un diseño factorial 3^3 evaluaron temperatura (30; 50; 70°C), relación molar etanol:grasa (6:1; 7:1; 8:1) y la concentración del catalizador alcalino (0,44; 0,88; 1,32%). Las condiciones óptimas fueron aplicadas en un reactor, produciendo biodiesel el cual fue posteriormente caracterizado. Encontraron que las altas temperaturas (50 y 70°C) no proporcionan una separación espontánea del glicerol y el biodiesel, a pesar que se obtuvo una conversión superior al 96%. Sin embargo a 30°C, utilizando una concentración de 0,96% de catalizador y una relación molar de 7:1 fue posible alcanzar una conversión del 83% junto a una separación espontánea de las fases de la reacción. El combustible obtenido cumplió con los requisitos de calidad establecidos en las regulaciones oficiales.

CAPITULO III

Marco metodológico

Material Biológico

Cultivo bacteriano

Se optó por utilizar varias cepas bacterianas para garantizar la heterogeneidad de las lipasas producidas y buscar hidrolizar la mayor cantidad de triglicéridos, para ello el Centro de Investigaciones de Microbiología Aplicada de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC) suministró para la investigación cinco cepas de bacterias mesófilas con actividad lipasa, previamente aisladas de residuos grasos industriales e identificadas mediante galerías API por Gonzales *et al.* (2010). Son descritas 2 cepas del género *Pseudomonas*, otras 2 pertenecientes al género *Bacillus* y una del género *Enterobacter*.

Obtención de la grasa de origen animal

Residuos grasos de pollo fueron adquiridos en una carnicería. En el laboratorio se licuaron por 10 minutos hasta obtener una pasta homogénea, la misma se trasvasó a un recipiente tapado y se incubó a 70°C en una estufa por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación la grasa extraída fue filtrada mediante gasa para eliminar la presencia de residuos sólidos y seguidamente se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Caracterización química de la grasa extraída de tejido animal

Determinación del índice de acidez y porcentaje de ácidos grasos libres.

En una fiola con 25 mL de etanol absoluto se adicionaron 5 g de grasa animal y 3 gotas de fenolftaleína. Seguidamente se incubó en un baño de agua a 65°C por 10 min, transcurrida la incubación se tituló utilizando una solución de KOH 0.1 N hasta la aparición del color rosa producto de la neutralización de los ácidos grasos en la muestra. A partir de los datos obtenidos procedió a calcular el índice de acidez y el porcentaje de ácidos grasos libres partiendo de las siguientes

formulas: $IA = \frac{mL\ KOH \times N \times 56}{g\ de\ muestra}$; $\%AGL = IA \times 0,503$. Cada titulación fue realizada por triplicado y calculando la desviación estándar.

Determinación del número de saponificación e índice de éster.

En una fiola se pesó 1.0gr de grasa animal, posteriormente se adicionaron 12,5mL de una solución de KOH alcohólico 0,5N. La muestra fue calentada en baño de agua hirviendo por 1 hora en un balón acoplado a un condensador de reflujo, transcurrido el tiempo de incubación, mientras la muestra permanecía caliente, se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló el exceso de KOH utilizando una solución de HCl 0.5N. Tales datos fueron usados para determinar el número de saponificación (peso molecular promedio de los ácidos grasos contenidos en la muestra), así como también el índice de éster partiendo de las siguientes formulas $\#S = \frac{56,1(B-S) \times N}{g\ de\ muestra}$; $IE = \#S - IA$; $\%Glicerol = IE \times 0,054664$. Cada ensayo fue realizado por triplicado y calculando la desviación estándar.

Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano

A partir de las cepas bacterianas suministradas se elaboró un consorcio, el cual fue incubado en 200 mL de medio mínimo mineral estéril (MMM) constituido por $CuSO_4$ 1% (0,1 mL), $CaCl_2 \cdot H_2O$ 1% (0,5 mL), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5% (2 mL), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1% (0,5 mL), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1% (0,5 mL), NaCl 1% (0,5 mL), $(NH_4)_2SO_4$ 1% (0,1 mL) por litro de tampón fosfato 0,1 M; pH 7 y suplementado con 2 g de grasa, a temperatura ambiente (20-24°C) y agitación constante a 120 rpm. La cinética del crecimiento bacteriano se estimó mediante turbidimetría, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, realizando mediciones cada 24 horas.

Determinación de la actividad degradadora de grasa del consorcio bacteriano

Para determinar la capacidad para degradar grasa del consorcio bacteriano se diseñaron 2 sistemas denominados “Control” y “Digestión” para cada sistema se procedió de la siguiente manera: en fiolas de 250 mL se adicionaron 50 mL de MMM complementado con 5 g de grasa. El sistema “Digestión” fue inoculado con 1 mL de consorcio bacteriano. Los sistemas se incubaron por 96 horas a 37°C y agitación constante a 120 rpm. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 10 mL de cada sistema a las cuales se les realizó una extracción de grasa utilizando 2 mL de *n*-hexano. La

cantidad de grasa remanente en los sistemas se determinó por gravimetría. Cada sistema fue realizado por triplicado, calculando la desviación estándar.

Obtención y aislamiento de lipasas extracelulares

Alícuotas de 1 mL del consorcio bacteriano se adicionaron a 50 mL de medio mínimo mineral (MMM) complementado con 0,5 g de grasa animal previamente extraída. El sistema fue incubado a temperatura ambiente (20-24°C) bajo agitación constante a 160 rpm. Transcurridas 48 horas el volumen total del cultivo fue centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se conservó el sobrenadante libre de células (SLC) conteniendo las lipasas extracelulares. El mismo se mantuvo a 4°C para evitar la posible degradación por parte de alguna actividad proteolítica.

Cuantificación de proteínas totales en SLC

La determinación de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (1976), utilizando suero albúmina bovina (100 µg/mL) como patrón.

Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica

La actividad lipasa fue medida por titulación de los ácidos grasos liberados utilizando una emulsión de aceite de oliva como sustrato. Siguiendo el protocolo utilizado por Sirisha *et al.*, (2010), el sustrato se elaboró con aceite de oliva (10% v/v), goma arábiga (5% p/v) en tampón fosfato 100 mM a pH 7. La mezcla se homogeneizó aplicando 5 ciclos de 1 minuto en licuadora seguido de enfriamiento en hielo, con la finalidad de mantener la temperatura de la mezcla por debajo de los 20°C. Se tomaron 100 µl de SLC y se adicionaron en 5 mL de emulsión, el sistema fue incubado a 37°C en agitación a 300 rpm por intervalos de 2 minutos hasta un total de 8 minutos. Transcurrido el periodo de incubación los ácidos grasos libres (AGL) fueron extraídos por adición de una solución de acetona:etanol (1:1). Seguido de esto se procedió a titular los ácidos grasos liberados con NaOH 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador, el viraje al color rosa de la mezcla evidenció el final de la titulación. Cada ensayo se realizó por triplicado. La unidad lipolítica (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido oleico por minuto (Jensen, 1983)

Elaboración de Biodiesel

Reacciones de transesterificación

Las reacciones de transesterificación se llevaron en un volumen de 5mL de grasa animal, utilizando el volumen necesario de metanol para alcanzar una relación molar 1:3 triglicérido:metanol y adicionando 2mL del sobrenadante libre de células conteniendo las lipasa extracelulares. La reacción se incubó por 24 horas en un baño de agua a 40°C y agitación a 300rpm. Transcurrido el periodo de incubación la mezcla se trasvasó a un embudo de decantación y se dejó reposar por 24 horas para permitir la separación del glicerol. Ocurrido esto, la fase orgánica de la mezcla, conteniendo los ésteres metílicos de ácidos grasos, se almacenó a -20°C.

Análisis instrumental del producto de transesterificación

Espectroscopia infrarroja

Como análisis previo a la corrida cromatográfica se realizó una espectroscopia infrarroja. Para ello se procedió de la siguiente manera: una alícuota del extracto de grasa de pollo se colocó de manera uniforme sobre una celda de KBr y se midió la absorbancia en un espectrómetro de infrarrojo marca Shimadzu modelo FTIR-8400S. El mismo ensayo fue repetido para la muestra de ésteres metílicos obtenidos del proceso de transesterificación.

Cromatografía de gases

Para el análisis cromatografico se realizó una dilución. Se tomaron 20µl de la fase orgánica resultante de la transesterificación adicionando 80 µl *n*-hexano y se analizó en un cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 680 N, utilizando una columna de 100% polietilenglicol bajo condiciones las siguientes condiciones establecidas para la detección e identificación de esterres metílicos de ácidos grasos: Temperatura inicial del horno: 165°C, gradiente de 5°C/min, hasta 270°C y se mantuvo por 2 min, flujo de helio: 1mL/min. Tiempo de corrida total 27 min. Como método de comparación, una muestra de grasa sin transesterificar fue sometida a las mismas condiciones.

CAPITULO IV

Resultados

Caracterización de la grasa animal

La grasa animal extraída del tejido adiposo de pollo presentó un color amarillo pálido, con una textura viscosa a temperatura ambiente y un fuerte olor. Con la finalidad de conocer el estado y la calidad de la grasa, esta se caracterizó mediante los parámetros establecidos en la Tabla II. Los ensayos reportaron un índice de acidez de 19,786 mg de KOH/g, un índice de saponificación (número de Koettstorfer) de 225,8 g/mol, un índice de éster alrededor de 206,013 mg de KOH/g, un contenido de glicerol aproximado de 12,16% y una proporción de ácidos grasos libres (AGL) cercana al 10%.

Tabla II. Características químicas de la grasa animal extraída de tejido adiposo de pollo.

Índice de Acidez	19,786 ± 1,71 mg KOH/g
Índice de Saponificación	225,8 ± 1,983 g/mol
Índice de éster	206,013 ± 1,620 mg KOH/g
Contenido de glicerol	12,16 ± 1,3%
Ácidos grasos libres	9,95% ± 1,6%

Cinética del crecimiento bacteriano

En la Figura 4.1 se puede observar el crecimiento bacteriano expresado en unidades de absorbancia a 540 nm en función del tiempo de incubación. Durante las primeras 24 horas se observó un claro crecimiento exponencial que alcanzó su punto máximo a las 48 de incubación, situándose a 0,8 UA y, seguido por un descenso paulatino de la pendiente de la curva a las 72 h llegando a valores de 0,3 UA a las 120 h. Esto es evidencia de que el cultivo llegó a la fase de muerte, producto del agotamiento de los nutrientes o consumo de la grasa emulsionada por las enzimas lipolíticas. El crecimiento de las bacterias ocasionó un cambio en la apariencia del cultivo, tornándose de una solución translúcida a un color blanco opaco y presentando una capa de espuma en la superficie del medio líquido. Este cambio de coloración influyó en la medición espectrofotométrica,

enmascarando el crecimiento bacteriano. Sin embargo el mismo fue corroborado al someter una alícuota de cultivo a centrifugación, evidenciando el crecimiento positivo de biomasa. Ninguna de las características descritas anteriormente se presentó en el sistema control, el cual permaneció translucido transcurridas las 120 horas del ensayo.

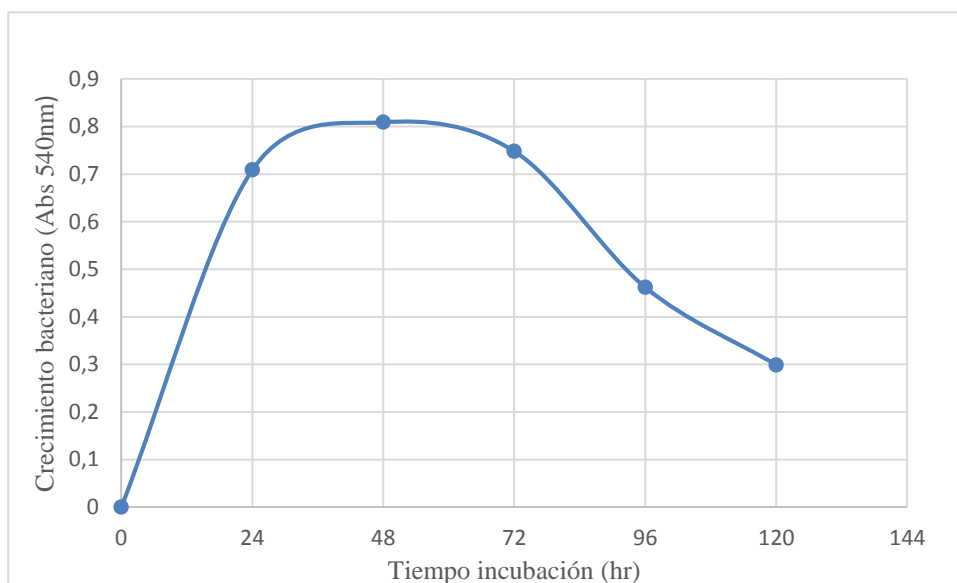


Figura 4.1. Cinética del crecimiento bacteriano en MMM suplementado con grasa como única fuente de carbono.

Determinación de la grasa remanente en cultivos bacterianos

La Figura 4.2 expresa la cantidad de grasa remanente en alícuotas tomadas de los sistemas Control y Digestión durante un periodo de incubación de 96 horas. En el sistema control no se apreció cambios significativos en la tendencia de la curva, permaneciendo la cantidad de grasa alrededor de 1 g, la variación en las medidas de los ensayos (promedio de la desviación estándar a diferentes tiempos, 0,039) se pueden adjudicar a errores experimentales durante la extracción de la grasa en las alícuotas. Sin embargo, en el sistema tratado con bacterias se observó una pendiente negativa en el transcurso de la incubación, a partir de las 24 horas, es posible evidenciar una diferencia frente al control del 13%, diferencia que continua acentuándose hasta alcanzar una degradación del 95% al finalizar el ensayo (Tabla III). Además, no se observaron cambios significativos en el pH de los cultivos durante la incubación, el cual se mantuvo alrededor de 7 (valor inicial establecido en el ensayo).

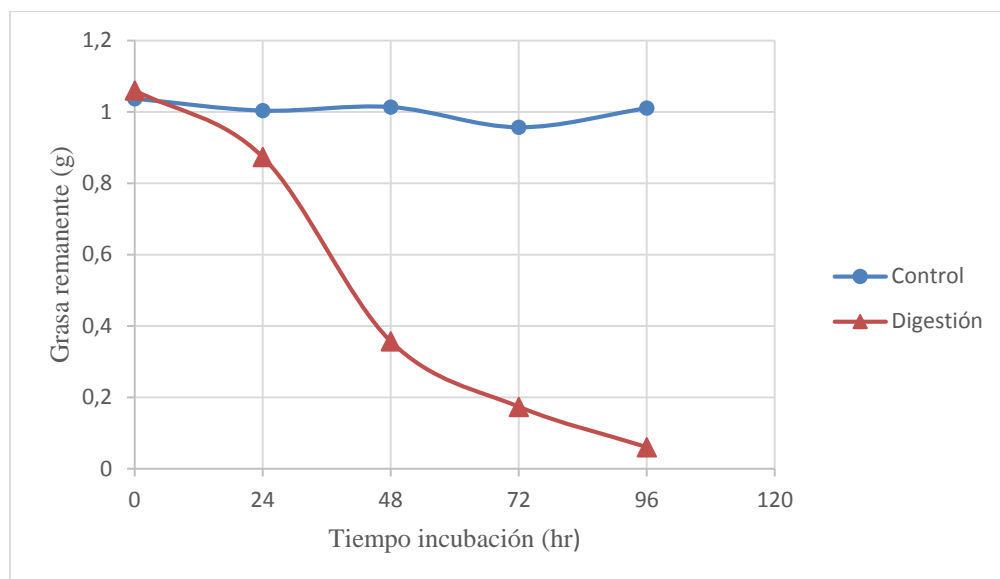


Figura 4.2. Cantidad de grasa remanente en los sistemas Control y Digestión tras 96 horas de incubación.

Tabla III. Cantidad de grasa y pH en las alícuotas de los sistemas Control y Digestión respecto al tiempo de incubación.

Grasa(g)

Tiempo(h)	Grasa Remanente*				Consumo (g)	% Consumo
	Control	pH	Digestión	pH		
0	1,036±0,036	7	1,06±0,036	7	0	0%
24	1,003±0,032	7,1	0,87±0,025	7	0,133	13,3%
48	1,013±0,045	7,1	0,356±0,08	7	0,657	65,7%
72	0,956±0,041	7	0,173±0,005	6,9	0,783	78,3%
96	1,01±0,055	7,1	0,06±0,02	6,9	0,950	95%

*Valores correspondientes a una alícuota de 10mL de un cultivo de 50mL

Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica

La actividad enzimática se determinó por titulación de los ácidos grasos liberados empleando NaOH como agente titulante y aceite de oliva en emulsión como sustrato, determinándose la actividad en sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos con 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3 y Tabla IV. La gráfica de la figura 4.3 muestra la actividad lipolítica total obtenida *in vitro* por el consorcio bacteriano. Dicha actividad

incrementó linealmente con el tiempo hasta alcanzar valores máximos de 0.07 mmoles de ácidos grasos liberados en un periodo de incubación de 8 minutos. La ecuación de la recta expresada en la Figura 4.3, establece una tasa de reacción de 0.0061 mmoles de ácidos liberados por minuto; lo cual equivale a 6.1 U de lipasa. Posteriormente al realizar una cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford (1976), se estimó una cantidad de 320 mg de proteína por mililitro de SLC, y a partir de esto se determinó la actividad específica, que resultó ser de 0,190 $\mu\text{moles} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tabla IV).

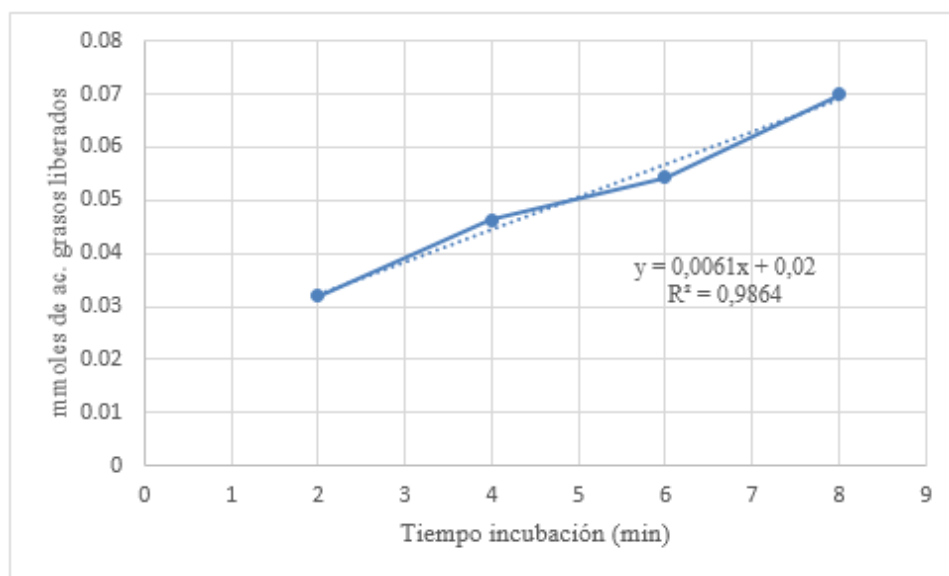


Figura 4.3. Actividad lipolítica del sobrenadante libre de células (SLC).

Tabla IV. Proteínas totales según método de Bradford (1976), actividad enzimática y actividad enzimática específica del sobrenadante libre de células (SLC).

Proteínas (μg)	Actividad enzimática ($\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$)	Unidades lipolíticas ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)	Actividad enzimática específica ($\mu\text{moles} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
320	0,0061	6,1	0,190

Caracterización de la muestra de grasa antes y después del proceso de transesterificación.

Como resultado de las reacciones de transesterificación se obtuvo una mezcla caracterizada por dos fases claramente definidas, una fase orgánica conteniendo los ésteres metílicos y los triglicéridos no transesterificados, y una fase acuosa con el exceso de metanol, el glicerol y agua, la cual fue descartada (Figura 4.4).

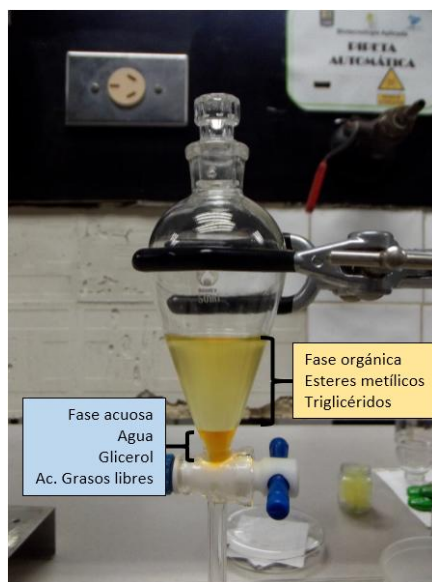


Figura 4.4. Producto final del proceso de transesterificación, se evidencia una separación de fases.

Espectroscopia infrarroja

En la Figura 4.5 se muestra el espectro infrarrojo de la muestra de grasa animal antes y después de ser sometida al proceso de transesterificación vía enzimática; la muestra transesterificada presenta a número de onda de 2350cm^{-1} la señal correspondiente al CO_2 ambiental durante la medición, y a número de onda de 3400cm^{-1} se evidencia la desaparición de una señal luego del tratamiento. También es posible observar un cambio en la absorbancia en las señales comprendidas entre número de onda de 600cm^{-1} a 1500cm^{-1} . A número de onda de 1750cm^{-1} se aprecia la señal correspondiente al enlace éster, el cual presentó una absorbancia máxima de 0,78 UA en la muestra sin tratamiento y disminuye a 0,15 UA tras la transesterificación.

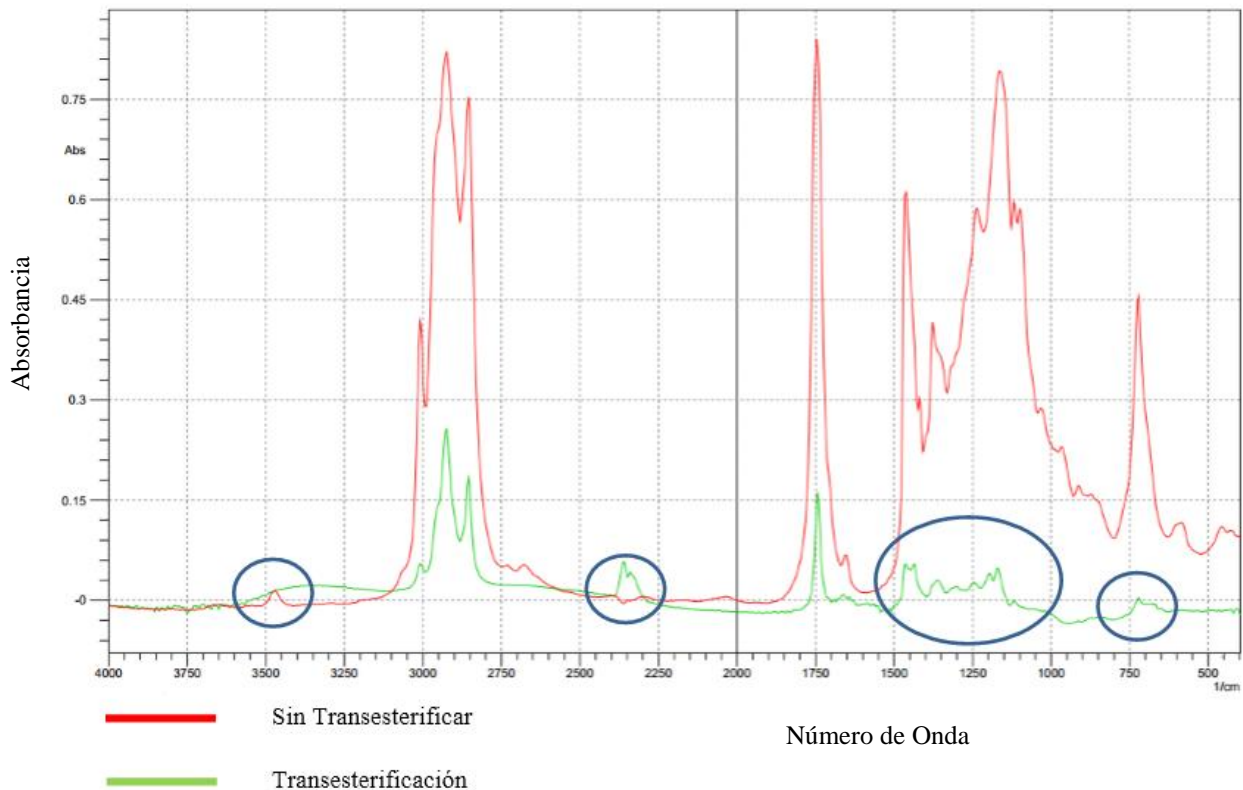


Figura 4.5. Espectro infrarrojo de la muestra de grasa antes y después de la transesterificación.

Análisis por cromatografía de gases

La figura 4.6 muestra la corrida cromatográfica de la muestra de grasa animal sin haber sido sometida al proceso de transesterificación. Se evidencia a los 2,644 minutos la señal del solvente, en este caso *n*-hexano, durante el resto de la corrida, el cromatógrafo no reporta alguna otra señal significativa. En el cromatograma correspondiente a la muestra transesterificada (Figura 4.7), el solvente es resuelto tras 2,648 minutos, y posteriormente a los 8,873 min se evidencia la primera señal. En total se observan ocho señales nuevas, siendo la última resuelta a los 26,553 minutos de corrida, ninguna de las señales se apreciaron en el cromatograma de la muestra sin tratamiento (Figura 4.6).

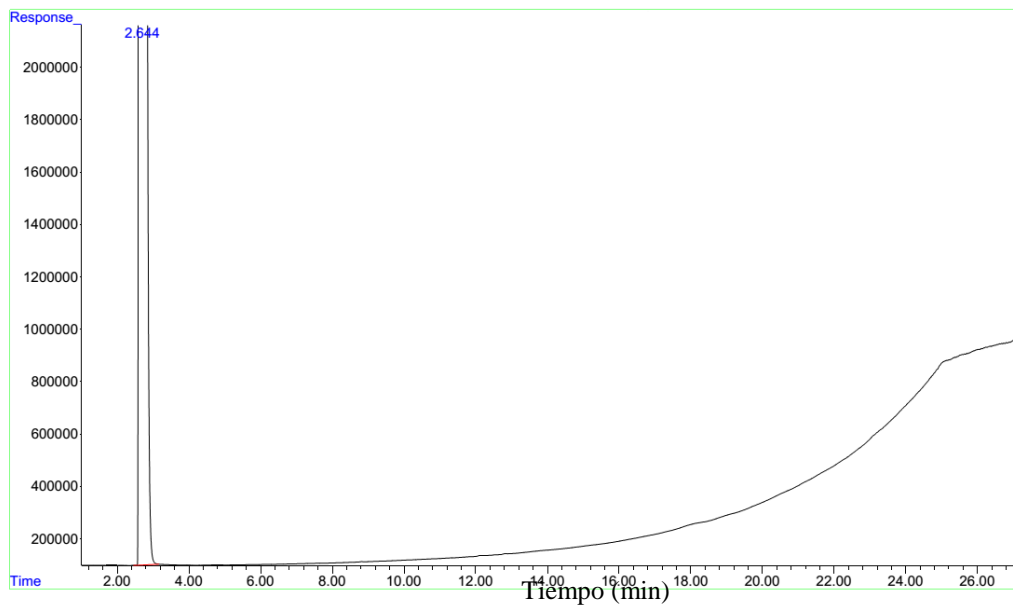


Figura 4.6. Cromatograma de la muestra de grasa animal antes del proceso de transesterificación.

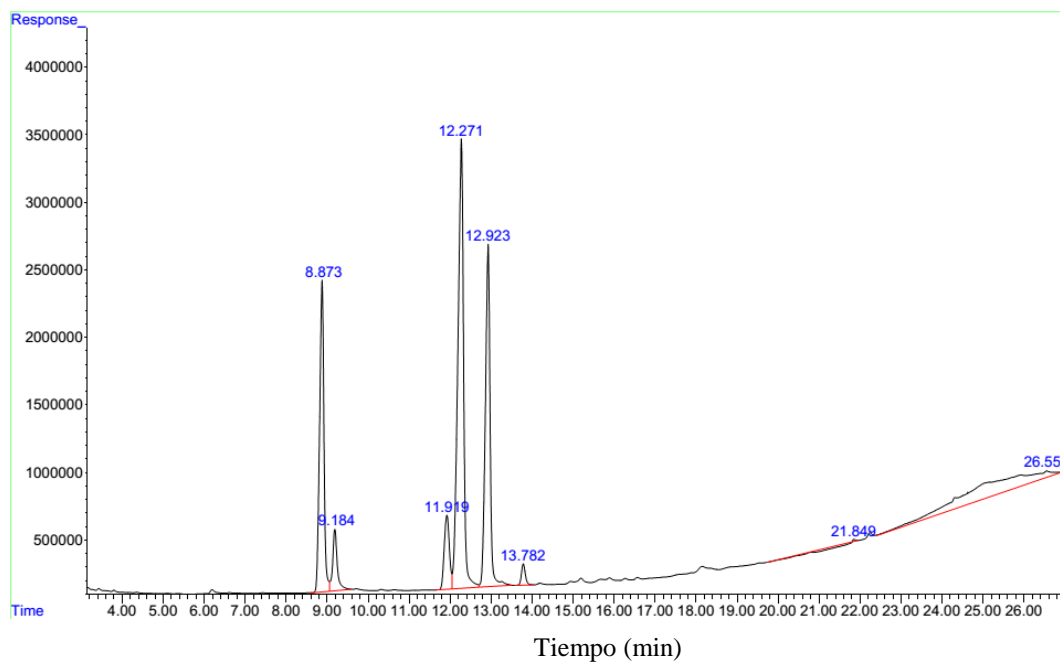


Figura 4.7. Cromatograma de la muestra de grasa animal luego del proceso de transesterificación.

muestra de grasa animal

CAPITULO V

Discusión

Caracterización química de la grasa

La caracterización química de la grasa animal reveló un índice de acidez de 19,786 mg KOH/g equivalente a 9,95% de ácidos grasos libres (Tabla II), valores no muy distintos a los reportados para grasa de pollo por Alptekin & Canakci (2011), quienes reportan un índice de 26,89 mg KOH/g, que a su vez representa un 13,45% de ácidos grasos libres. Los valores de acidez permiten determinar el estado del aceite o grasa, a mayor valor, mayor deterioro de la grasa, bien sea por efecto de bacterias u oxidación producto de factores ambientales (Alvarado & Blanco, 2008). En el interior del tejido adiposo los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos, la presencia de un 10% de AGL en la muestra podría deberse al método de extracción por calentamiento, puesto que la exposición a altas temperaturas degrada los triglicéridos (Alvarado & Blanco, 2008). El índice de saponificación se define como la cantidad de KOH necesario para neutralizar los AGL y saponificar 1 g de grasa, y se utiliza para estimar el peso molecular promedio de los AGL contenidos en una muestra. En la grasa de pollo caracterizada, tal valor fue de aproximadamente 225,8g/mol, peso molecular similar al del ácido mirístico, que ha sido reportado en concentraciones cercanas al 1% para la grasa de pollo (Gunstone, 1996; Schulte, 2007). Schulte estimó un peso molecular promedio de 275,95g/mol, siendo el ácido oleico el más abundante en las muestras (41,4%), esta diferencia en los pesos moleculares podría deberse a la pérdida de precisión en la técnica por la presencia de AGL, mono y diglicéridos en la muestra, un problema que el autor reporta al utilizar grasas con un contenido de AGL superior al 4%. El índice de éster representa la cantidad de KOH que reacciona con el glicerol presente en la muestra tras haber sido saponificados los AGL, en la muestra el valor es de 206,013mg KOH/g que representa un contenido de glicerol del 12,16% (Tabla II). El contenido de glicerol está relacionado con la acidez de la grasa, ya que dicho compuesto es la columna vertebral de los triglicéridos, y un subproducto de la hidrólisis de estos. Por lo tanto es lógico esperar glicerol en una muestra que ha estado en condiciones que causan hidrólisis (Nelson & Cox, 2004).

Cinética del crecimiento bacteriano

Los cultivos bacterianos en presencia de grasa mostraron un incremento en la absorbancia, lo cual podría indicar aumento de la biomasa (Figura 4.1). Sin embargo esa turbidez es producto del crecimiento bacteriano y de la emulsificación de la grasa por los productos generados de la hidrólisis de la misma, en la cual se producen sustancias surfactantes como son mono, diglicéridos y sales de los ácidos grasos, consecuentemente el crecimiento bacteriano está enmascarado por el proceso de emulsificación (Becker *et al.*, 1997). No obstante el desarrollo de turbidez es evidencia de actividad lipolítica por parte de la población bacteriana, la cual fue demostrada al determinarse la grasa remanente en los cultivos cuyos valores disminuyeron hasta un 95% equivalente a 950 mg de grasa degradada en 96 h de ensayo (Figura 4.2 y Tabla II).

Cuantificación de la actividad lipolítica

La cuantificación de la actividad lipolítica se realizó por titulación de los ácidos grasos, el cual es un método que ha sido reportado en estudios similares a este (Sirisha *et al.*, 2010; Gonzales *et al.*, 2010; Daniele *et al.*, 2011), para determinar actividad enzimática, de forma rápida, económica y precisa. La actividad lipasa en los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* ha sido evidenciada previamente en numerosos estudios, especialmente lipasas extracelulares, que destacan por su fácil obtención y uso bajo numerosas condiciones fisicoquímicas, y las convierte en un producto de interés en diversas áreas de la industria; que van desde el uso en producción de alimentos, fabricación y optimización de detergentes, saneamiento ambiental y hasta producción de biocombustibles (Zhang & Guan, 2010; Shah & Bhatt, 2011).

El consorcio bacteriano utilizado en este trabajo presentó actividad lipolítica extracelular, la cual se determinó a partir de la ecuación de la recta $y=0,0061+0,02x$; la actividad específica obtenida de $0,190 \mu\text{moles} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, es equivalente a 190 U/mg, valor que se encuentra en el rango superior de actividad reportada para lipasas de origen bacteriano producidas por casas comerciales como Sigma-Aldrich, cuyos valores oscilan entre 15 U/mg para *Pseudomonas sp* y 300U/mg para *Thermus flavus* (Sigma-Aldrich, 2014). Tomando en cuenta que las lipasas comerciales ya han sido purificadas, el resultado obtenido es de alta significancia, ya que las enzimas contenidas en los SLC no han pasado por dicho proceso. El reporte de esta actividad es coherente con los resultados obtenidos en el sistema “Digestión”, en el cual se observó una reducción continua de la cantidad de grasa remanente hasta un 95% al concluir el ensayo (Figura 4.2), contrario a lo observado en el

sistema “Control”, cuyos niveles de grasa no disminuyeron. El consumo de grasa puede ser explicado por la excreción de lipasas extracelulares por parte de las bacterias, estas enzimas hidrolizan los triglicéridos que conforman la grasa, y el producto final de la hidrólisis es agua, glicerol y ácidos grasos libres (Figura 2.3), estos últimos son incorporados al interior de las bacterias para ser utilizados como fuente de carbono (Jaeger *et al.*, 1994).

Reacciones de transesterificación

Como se encuentra reportado en la bibliografía, tras el proceso de transesterificación se obtuvo una solución con dos fases definidas (Figura 4.4), una fase superior orgánica y una fase inferior acuosa; la fase superior contiene compuestos insolubles en agua como ésteres metílicos de ácidos grasos y triglicéridos, mientras que la inferior contiene agua, mono y diglicéridos, glicerol y metanol en exceso (Albis *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2006; Rashid & Anwar, 2007).

Caracterización de la muestra de grasa antes y después de la transesterificación

La heterogeneidad de las muestras caracterizadas por espectrometría infrarroja dificulta la identificación precisa de los compuestos, sin embargo es posible evidenciar diferencias entre la muestra antes y después de la transesterificación; De Ruig & Dijkstra (2006) reportan que a número de onda de 1743cm^{-1} se evidencia la señal del enlace éster en triglicéridos, la disminución de la absorbancia reportada en la muestra luego del tratamiento (Figura 4.5) podría deberse a la hidrólisis de dicho enlace, como consecuencia de las enzimas lipolíticas. A pesar de esto la señal no desaparece por completo, lo cual implica, que la muestra posterior al tratamiento contiene compuestos que presentan un enlace éster, posiblemente en menor cantidad, y quizás por la presencia de algún éster metílico de ácido graso formado. La señal que se observa alrededor de 3000cm^{-1} representa el grupo $-\text{OH}$ perteneciente a ácidos carboxílicos, grupo funcional de los ácidos grasos (De Ruig & Dijkstra, 2006). Que dicha señal se exprese en ambas muestras indica que los ácidos grasos persisten en la muestra, lo cual es evidencia de un proceso de transesterificación incompleto. Este resultado indicaría que el tiempo de la etapa de transesterificación debería ser incrementado.

El ácido oléico es el ácido graso más abundante en la grasa de pollo y posee un punto de ebullición alrededor de los 360°C (Gunstone ,1996), y en su mayoría los ácidos grasos presentan temperaturas de ebullición que oscilan alrededor de este valor; es posible que a raíz de esta característica no se puedan evidenciar tales compuestos en la corrida cromatográfica de la grasa de

pollo, dado que las condiciones del horno solo alcanzan temperaturas máximas de 270°C, lo que hace inviable vaporizar y resolver este tipo de compuestos por cromatografía. Sin embargo, tras el proceso de transesterificación, y bajo las mismas condiciones, es posible observar señales en el cromatograma (Figura 4.7), el registro de tales señales podría deberse a la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos durante el proceso de transesterificación. Lamentablemente no fue posible disponer de los patrones metílicos de los ácidos grasos y por ende no se pudieron identificar los máximos de absorción detectados. A diferencia de los ácidos grasos, los ésteres metílicos son fluidos relativamente estables y de bajo punto de ebullición, con valores que se encuentran ubicados entre 84 y 125°C, dependiendo de la longitud de la cadena de carbonos (Rey *et al.*, 1993). Es esta característica lo que permite inferir, a partir de lo obtenido en las corridas cromatográficas, es una posible obtención de ésteres metílicos, lo cual indicaría que las enzimas aisladas del consorcio fueron capaces de hidrolizar el enlace éster entre los ácidos grasos y el glicerol, sustituyendo este último por el metanol adicionado a la reacción.

CONCLUSIONES

La grasa de pollo presentó un índice de acidez de 19,786 mg KOH/g, equivalente a un contenido de 9,95% de ácidos grasos libres, un peso molecular promedio de 225,8 g/mol y un índice de éster de 206,013 mg KOH/g que equivale a un 12,16% de contenido de glicerol.

El consorcio bacteriano generado a partir de cepas pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* fue capaz de crecer en medio mínimo salino utilizando grasa de pollo como única fuente de carbono, evidenciando actividad lipasa.

Las condiciones óptimas de lipólisis *in vitro* fueron: pH 7, 37°C y agitación constante a 160 rpm, bajo estas condiciones el consorcio bacteriano degradó hasta un 95% de la grasa en 96 h de incubación.

La actividad lipolítica *in vitro* reportada fue de 0,190 $\mu\text{moles} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, equivalente a 190 U/mg.

Mediante espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases fue posible evidenciar diferencias en las muestras tras el proceso de transesterificación, posiblemente por la conformación de esteres metílicos de ácidos grasos. Por ello los residuos grasos de origen animal pueden ser utilizados en reacciones de transesterificación por vía enzimática.

RECOMENDACIONES

- a) Purificar enzimas, con el objetivo de identificar la naturaleza de las lipasas y por ende caracterizarlas desde el punto de vista cinético, y establecer su mecanismo catalítico.
- b) Realizar comparaciones entre la transesterificación del residuo graso animal por vía enzimática con la metilación de ácidos grasos vía alcalina, con la finalidad de verificar la obtención de esteres metílicos de ácidos grasos.
- c) Optimizar las condiciones para la obtención de ésteres metílicos vía catálisis enzimática, tomando en cuenta variables como: tasa de reacción, porcentaje de conversión y relación molar óptima, dando pie a un estudio con soporte estadístico.
- d) Identificar los máximos de absorción detectados por la cromatografía de gases.

BIBLIOGRAFIA

- Abigor, R., P. Uadia, T. Foglia, M. Haas, K. Jones, E. Okpefa, J. Obibuzor & M. Bafor.** (2000). Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochememical Society Transactions*. 28:979-981.
- Albis, A., J. Parra & F. Castellanos.** (2005). Transesterificación del aceite de palma con metanol por catálisis heterogénea. *Revista Ingeniería e Investigación*. 25(2):7177.
- Alptekin E. & M. Canakci.** (2011). Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat. *Fuel*. 90:2630-2638.
- Alvarado, O. & T. Blanco.** (2008). *Alimentos. Bromatología*. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas UPC. Lima. Peru.
- Bennet, S.** (2009). *Modern Diesel Technology: Diesel Engines*. Cengage Learning. Stamford. USA.
- Becker, P., I. Abu-Reesh, S. Markossian, G. Antranikian & H. Märkl.** (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48(2):184-190.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Chin, S.P., N.S. Ismail, A.A. Al-Ashraf & A.R.M. Yahya.** (2010). Aerobic Degradation of Volatile Fatty Acids by Bacterial Strain Isolated from Rivers and Cow Farm in Malaysia. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. 1(3):1-6.
- Cirne, D.G., X. Paloumet, L. Björnsson, M. M. Alves & B. Mattiasson.** (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste: Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*. 32: 965-975
- Cunha Jr., A., V. Feddem, M. De Prá, M.M. Higarashi, P. G. de Abreu & A. Coldebella.** (2013). Synthesis and characterization of ethylic biodiesel from animal fat wastes. *Fuel*. 105:228-234.

- Daniele A., L. Amaíz, L. Medina, & O. Valbuena.** (2011). Actividad lipolítica de *Geonacillus stearothermophilus*, cepa LN, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela. *Ciencia*. 19(3): 173-180.
- De Ruig, W.G. & G. Dijkstra.** (2006). Characterization and identification of triglycerides by infrared spectroscopy. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*. 77: 211-216.
- Demirbas, A.** (2007). Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*. 49(1):125-130.
- Dizge, N. & B. Keskinler.** (2008). Ezymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and bioenergy*. 32:1274-1278.
- Gonzales, D. L. Amaiz, L. Medina, R. Vargas, N. Izzeddin & O. Valbuena.** (2010). Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 3(2): 105-118.
- Guerrero M. & N. Seijas.** (2008). *Evaluación del proceso de obtención de biodiesel vía catálisis homogénea y heterogénea a partir de un aceite de desecho como alternativo tecnológica para la protección ambiental*. Trabajo Especial de Grado no publicado. Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería. Venezuela.
- Gunstone, F.D.** (1996). *Fatty acid and lipid chemistry*. Blackie Academic and Professional. London.
- Haas M.J., A.J. McAloon, W.C. Yee, & T.A. Foglia.** (2006). A process model to estimate biodiesel production cost. *Bioresource Technology*. 97:671-678.
- Hilbert, J.** (2004). *Biodiesel, el combustible vegetal específico para el agro*. Instituto de ingeniería rural. INTA, Castelar, Buenos Aires.
- Jaeger K., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel & O. Misset.** (1994). Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. 15:29-63.
- Jawoewski, Z., T.V. Segalstad & V. Hisdal.** (1992). Atmospheric CO² and global warming: a critical review. *Norsk Polarinstitut*. Tromso. Norway.
- Johansson T.B.** (1993). *Renewable Energy: Sources for fuels and electricity*. Island Press. Washington D.C. USA.

- Jensen, R.G.** (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*. 18:650-657.
- Lee, Ki-Teak, T.A. Foglia & Changa K.** (2002). Production of Alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 79:191-195.
- McNair, H. M. & J.M. Miller.** (1998). *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc. Toronto. Canada.
- Morrison, R. & R. Boyd,** (1998). *Química Orgánica*. Quinta Edición. Editorial Addison Wesley Longman. México.
- Nelson, D. & M. M. Cox.** (2004). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman. New York. USA.
- Pahl, G.** (2008). *Biodiesel: Growing a new energy economy*. Chelsea Green Publishing. Vermont. USA.
- Rashid U. & F. Anwar.** (2007). Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapeseed oil. *Fuel*. 86:265-71.
- Rivas, A.** (2004). *Factibilidad técnica y económica del uso de ésteres metílicos del aceite de tártago como combustible en motores de encendido por compresión (diesel) y turbinas*. Trabajo especial de grado no publicado. Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Venezuela.
- Rey, F.J., O. Chamorro, F.J. Martín Gil & G. Martín Gil.** (1993). Characterization of fatty acid methyl esters by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis*. 40: 463-473.
- Rivera, I. G. Villanueva & G. Sandoval.** (2009). Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. *Grasas y Aceites*. 60(5):468-474.
- Sarin, A.** (2012). *Biodiesel: Production and properties*. Royal Society of Chemistry. London. UK.
- Scragg, A.H.** (2009). *Biofuels: Production, application and development*. CABI. Oxfordshire. UK.
- Shah, K.R. & S.A. Bhatt.** (2011). Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. *Journal of Biochemical Technology*. 3(3): 292-295.
- Schulte W.B.** (2007). *Biodiesel production from tall oil and chicken fat via supercritical methanol treatment*. Master of Science Thesis not published. University of Arkansas.

Sigma-Aldrich. (2014). *Aldrich Handbook – a Catalog of fine Chemicals and Laboratory Equipment*. Sigma-Aldrich. 587-590.

Singh, R., N. Gupta, V. Goswami & R. Gupta. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Microbial Biotechnology*. 70: 679–682.

Sirisha, E., N. Rajasekar & M. L. Narasu. (2010). Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*. 4(5): 249-252.

Valcárcel, M.C. & A. Gomez. (1994). *Técnicas analíticas de separación*. Editorial Reverté. Barcelona. España.

Vieira, A.P., M.A.P. da Silva & M.A.P. Langone. (2006). Biodiesel production via esterification reactions catalized by lipase. *Latin American Applied Research*. 36:283-288.

Voet, D., J. G. Voet & C.W. Pratt. (2007). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. Editorial Médica Panamericana. Caracas. Venezuela.

Wharton, A.J. (1991). *Diesel engines*. Butterworth-Heinemann. Oxford. UK.

Xuejun L.P., P Xianglan, W. Yujun ,Z. Shenlin & H. Huayang. (2008) Calcium methoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel with methanol. *Fuel* 87:1076-1082.

Yagüe, M. (2003). *Estudio de utilización de aceites para fritura en establecimientos alimentarios de comidas preparadas*. Escuela de prevención y seguridad integral. UAB. Bellaterra.

Yang, H., S. Chien., J. Chi-Wei Lan, W. Lu & Y. Ku. (2007): Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmospheric Environment*. 41(34): 7232-7240.

Zhang, Z. & C. Guan. (2010) A promising alternate lipase for biodiesel fuel production. *Frontiers of Agriculture*. 4(2):129.136.

Zumbado, H. (2002) *Análisis Químico de los Alimentos: Métodos Clásicos*. Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, Cuba.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para método de cuantificación de proteínas según Bradford (1976) utilizando suero albumina bovina (100 µg/mL).

