

Reacciones de hidrólisis y metanólisis de aceite de olivo por catálisis enzimática para la síntesis de Metil Ésteres

* Toscano Palomar L.¹ Dra., Estarrón Espinoza M.² Dra., Stilianova Stoytcheva M.³ Dra., Cervantes Díaz L.⁴

¹Instituto Tecnológico de Mexicali

²CIATEJ, Guadalajara, Jal.

³Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California

⁴Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California

*toscano.lydia@itmexicali.edu.mx, mestarron@ciatej.net.mx,
margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx, lourdescervantes@uabc.edu.mx

Resumen

El biodiesel es considerado un combustible biodegradable y no contaminante. La reacción de transesterificación enzimática para la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales con alcoholes es una alternativa atractiva. Sin embargo, el alto costo de las enzimas representa una barrera para su implementación industrial. El objetivo de este estudio fue hacer un acercamiento exploratorio de la potencial producción de ácidos grasos libres y metil ésteres del aceite de olivo utilizando como catalizador lipasa producida a partir de hongos filamentosos. El estudio se realizó utilizando lipasa cruda producida por las especies *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*. La hidrólisis del aceite de olivo se realizó a la temperatura de 35-40°C con una relación aceite-agua 1:1 v/v. Se utilizó lipasa de actividad 2.9 U/mg con una concentración de lipasa de 20 mg/g de aceite. Se obtuvo 1.4% de ácidos grasos libres en 3 horas de reacción a pH 8.0. La reacción de transesterificación se realizó con un mínimo contenido de agua utilizando como co-solvente isooctano. Las reacciones se realizaron a temperatura de 35-40°C a un pH de 8.0 y con agitación de 200 rpm. Se obtuvo un producto con un contenido de 8.0% de metil ésteres después de 96 horas de reacción.

Palabras clave: Biodiesel, Lipasa, Actividad Lipolítica, Rendimiento.

Abstract

Biodiesel is considered a biodegradable and non-polluting fuel. The enzymatic transesterification reaction for the production of biodiesel from vegetable oils with alcohols is an attractive alternative. However, the high cost of the enzymes is a barrier to its industrial implementation. The objective of this study was an exploratory approach to the potential production of free fatty acids and methyl esters of olive oil using lipase as a catalyst produced from filamentous fungi. The study was conducted using raw lipases produced by filamentous fungi such as *Aspergillus flavus*, *Penicillium* and *Trichoderma harzianum chrysogenum*. The olive oil hydrolysis was conducted at the temperature of 35-40° C with an oil-water ratio 1:1 v / v. Lipase activity was used 2.9 U / mg with a lipase concentration of 20 mg / g oil. The hydrolysis yield obtained was 1.4 % of free fatty acids in 3 hours of reaction at pH 8.0. The transesterification reaction was performed with a minimum of water content. Isooctane was used as co-solvent. The reactions were performed at 35-40 °C, at pH 8.0 and 200 rpm of agitation. A product with 8.0 % methyl ester content was obtained after 96 hours of reaction.

Key words: Biodiesel, Lipase, Lipolytic Activity, Yield.

Introducción

La transesterificación de los aceites vegetales ha recibido considerable atención hace solo unos cuantos años, debido a la obtención de ácidos grasos y alquil ésteres, los cuales son compuestos intermedios valiosos en la química de los aceites y los metil y etil ésteres como sustitutos del diesel de petróleo [1].

El proceso de metanólisis química catalizada por álcalis da altos grados de conversión de los triglicéridos a sus correspondientes metil ésteres en cortos tiempos de reacción, con varios inconvenientes: presenta una alta demanda de energía, la recuperación del glicerol es difícil, el catalizador alcalino tiene que removerse del producto y la presencia de ácidos grasos libres y agua interfieren con la reacción. La metanólisis enzimática no presenta los inconvenientes mencionados, en particular se debe de mencionar que el glicerol producido puede ser fácilmente recuperado y que los ácidos grasos libres contenidos en los aceites y grasas residuales pueden ser convertidos completamente a metil ésteres [2]. Reacciones de metanólisis efectivas han sido desarrolladas utilizando diferentes lipasas a partir de especies de *Candida*, *Pseudomonas* y *Rhizopus* por varios investigadores. Las enzimas realizan reacciones de transesterificación muy específicas (bio-transformaciones) [3], por lo cual son de gran interés en la industria, en donde procesos menos específicos producen subproductos no-deseables. La desventaja asociada con la transesterificación enzimática es el alto costo de la preparación de la enzima. La inmovilización generalmente incrementa el reuso de las enzimas [3] y por lo tanto disminuye el costo, también ayuda al biocatalizador a ser más eficiente en medios reactivos no acuosos [4]. El presente estudio reporta el uso de lipasa extracelular extraída de hongos filamentosos en reacciones de hidrólisis y transesterificación de aceite de olivo para la producción de ácidos grasos y metil ésteres.

Materiales y métodos

Materiales

El aceite de olivo extra virgen utilizado fue comprado comercialmente del mercado local y se almacenó a 4°C para evitar rancidez y fue utilizado durante la experimentación. Lipasa de cerdo, actividad 24 U/mg marca USB, Lipasa liofilizada extraída de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*), actividad 0.904 U/g bajo condiciones estándar de análisis. El resto de los reactivos utilizados fueron grado analítico.

Análisis de FAMES por cromatografía de gases

Los metil ésteres se analizaron en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Series 6890 equipado con un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna (0.25 mm de diámetro interno, 60 m de longitud y 0.25 µm de espesor de película) marca J. & W. Scientific DB-23 utilizando gas helio como gas de arrastre. La temperatura de la columna se estableció de 170-220°C, para un tiempo total de análisis de 14 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 y 275°C respectivamente. Todos los análisis fueron realizados por

duplicado. Los solventes y reactivos utilizados en la preparación de las muestras fueron grado HPLC.

Hidrólisis de aceite de olivo

La reacción hidrolítica se realiza en la interfase aceite-agua, por lo tanto, la mezcla reactiva consistió de aceite de olivo y buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 en relación volumétrica 1:1, isooctano como co-solvente y 1% Tritón X100 como emulsificante [5]. Se utilizaron 20 mg de lipasa por gramo de aceite. La mezcla se incubó a 40°C y se agitó a 200 rpm, dejando la reacción proceder por 48 h. Se centrifugó la mezcla y se analizó la fase aceitosa para determinación de ácidos grasos libres. Se compararon los resultados con la hidrólisis de aceite de olivo utilizando lipasa de cerdo. Los ácidos grasos liberados fueron titulados con NaOH 5 mM usando fenolftaleína como indicador [6].

Metanólisis de aceite de olivo

Las reacciones de metanólisis se condujeron en relación estequiométrica de aceite/metanol; el aceite y el metanol se agregaron a un matraz de reacción y se calentó a la temperatura de reacción (40°C) con agitación magnética constante (200 rpm). Se agregó la lipasa pretratada en buffer de Tris-HCl 0.1M pH 8.0 para llevar la concentración de agua a valores específicos. Se utilizó un volumen constante de isooctano como co-solvente por diferentes tiempos de reacción. El matraz de reacción se conectó a una columna de reflujo para condensar el alcohol que pudiera evaporar. El efecto de la carga enzimática, relación molar metanol:aceite, concentración de agua, concentración de buffer y tiempo de reacción en el proceso de transesterificación se estudió variando cada vez una variable en el rango escogido (Tabla 1) y el resto de las condiciones se mantuvieron fijas según el caso: relación molar metanol a aceite 5:1, carga enzimática 3% p/p con base a peso de aceite de olivo extra virgen, relación volumétrica isooctano a aceite 1:1, concentración de agua 5% v/v en base a aceite, concentración de buffer 4% p/p en base a aceite, temperatura 40°C, agitación 200 rpm y tiempo de reacción 48 h.

Tabla 1. Intervalo de estudio de las variables

Variable	Rango
Concentración de enzima (% p/p)	1-5
Relación molar Metanol:aceite	3:1-9:1
Concentración de agua (% v/v)	0-15
Concentración buffer (% p/p)	4-8
Tiempo de reacción (h)	24-96

Al término, la mezcla reactiva se centrifugó a 4,000 rpm por 40 min y se recuperó la fase aceitosa. Se llevó a una estufa a 60°C por 20 min para evaporar todo el solvente. Se analizaron los ésteres de metilo por cromatografía de gases.

Resultados y discusión

Hidrólisis de aceite de olivo

El grado de hidrólisis obtenido en el aceite de olivo por la reacción catalizada por la lipasa obtenida a partir de los hongos filamentosos se comparó con la hidrólisis catalizada con lipasa de páncreas de cerdo. Byun *et al.* [7] reportaron el alto grado de hidrólisis en emulsión por la acción de lipasa de páncreas de cerdo. Rathod *et al.* [5] reportaron 32% de grado de hidrólisis del aceite de ricino catalizada con lipasa de una cepa genéticamente modificada de *Aspergillus oryzae*. La Figura 1 muestra el grado de hidrólisis del aceite de olivo catalizada por lipasas de consorcio de hongos filamentosos, obteniendo como máximo el 3% de rendimiento. Si se compara con el grado de hidrólisis catalizada con lipasa de cerdo bajo las mismas condiciones, observamos hasta un 41% de hidrólisis.

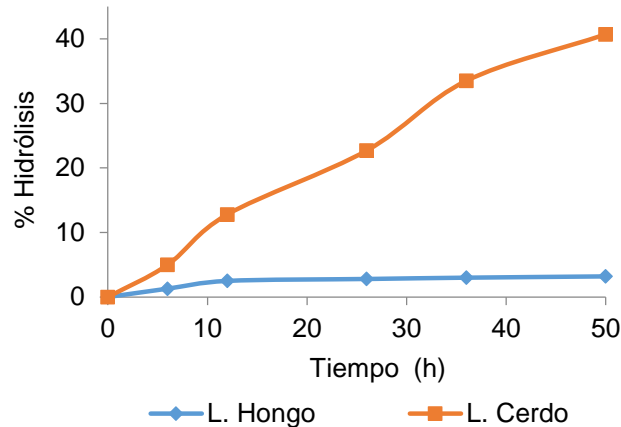


Figura 1. Avance de reacción de hidrólisis de aceite de olivo en medio acuoso a temperatura de 40°C y 200 rpm de agitación.

Metanólisis de aceite de olivo

Efecto de concentración de lipasa

La Figura 2 muestra el efecto de la concentración de la enzima en el porcentaje de metil ésteres obtenidos. Para la lipasa de consorcio de hongos que encontró que un incremento de la enzima mayor del 1% disminuye la formación de los metil ésteres. Es muy probable que a más altas concentraciones de lipasa, la solución interfase enzima-aceite formada bajo condiciones experimentales se sature de enzima y por el contrario se formen aglomerados de enzima que restringen el área de contacto entre sustrato-enzima [8].

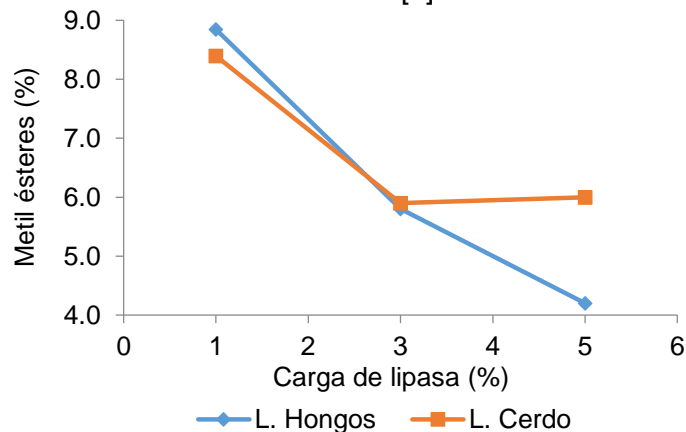


Figura 2. Efecto de la carga de lipasa en el rendimiento de formación de FAME. Carga: 1-3 % p/p en base a aceite de olivo utilizado. Se compara el rendimiento con lipasa de páncreas de cerdo.

Efecto de la relación aceite/metanol

Un factor importante que afecta el rendimiento de la formación de los metil ésteres es la relación molar de aceite-metanol. Debido al avance de la reacción de transesterificación hacia productos, es necesario, ya sea el uso de exceso de alcohol o la remoción de alguno de los productos de la mezcla reactiva. El efecto de la relación molar aceite-alcohol en la producción de FAME a partir de aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos filamentosos se analizó realizando experimentaciones con diferentes relaciones; 1:3, 1:5, 1:7 y 1:9 (aceite de olivo a metanol). En la Figura 3 se observa que con el incremento de la relación molar se incrementa el rendimiento de los metil ésteres hasta un 13% con la relación molar 1:9. Paralelamente, se realizó la metanólisis del aceite de olivo con lipasa de páncreas de cerdo a las mismas condiciones de reacción para comparar resultados.

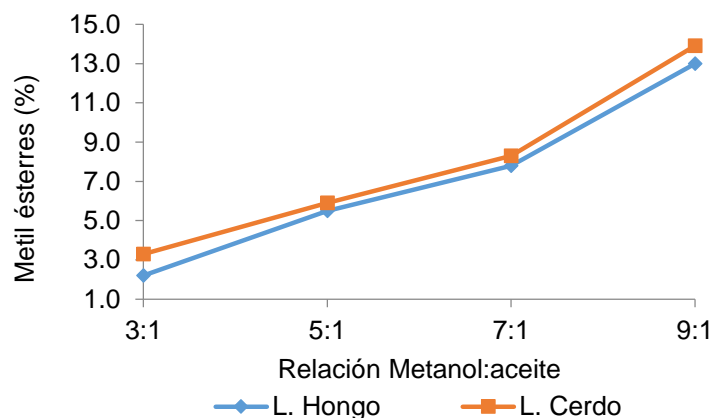


Figura 3. Efecto de la relación molar aceite/alcohol en el rendimiento de metil ésteres durante la metanólisis del aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos y lipasa de páncreas de cerdo.

Efecto del tiempo de reacción

El efecto de tiempo en la producción de metil ésteres por la reacción de metanólisis del aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos filamentosos se estudió conduciendo experimentos con diferentes períodos de reacción; 24, 48, 72 y 96 h. Los experimentos se realizaron a la temperatura óptima de 40°C y pH de 8.0, usando isooctano como co-solvente.

La Figura 4 muestra que con el incremento del tiempo de reacción se incrementa el porcentaje del rendimiento de FAME hasta un 8% en 96 h. Este resultado se comparó con la metanólisis del aceite de olivo catalizada con lipasa de cerdo.

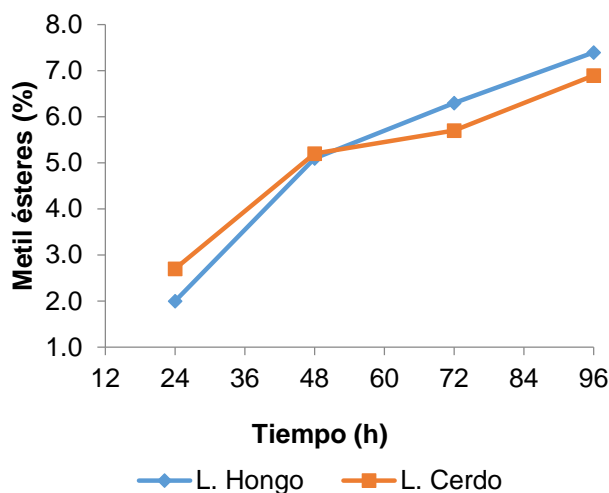


Figura 4. Efecto de tiempo de reacción en el rendimiento de metil ésteres durante la metanólisis del aceite de olivo catalizada por lipasa de consorcio de hongos y lipasa de páncreas.

Efecto del contenido de agua

El efecto del contenido de agua en el rendimiento de los metil ésteres en la reacción de metanólisis del aceite de olivo usando lipasa de consorcio de hongos fue estudiado mediante experimentación para diferentes porcentajes de agua en base a aceite (0, 5, 10 y 15 %). Aunque el agua no está relacionada como reactivo o producto en la reacción de transesterificación, su contenido es importante debido a que favorece a la expresión de la actividad enzimática. El agua actúa como lubricante de las cadenas polipéptidas en las proteínas, por lo tanto le confiere a la enzima la movilidad suficiente para desarrollar su acción catalítica [9]. Debido a que el sistema de reacción está compuesto de diferentes fases (triglicéridos, metanol y enzimas) el agua se reparte en diferente proporción entre los componentes. Para estudiar el efecto del contenido del agua en la actividad enzimática, específicas cantidades de agua se agregaron al sistema y se analizó la cantidad de metil ésteres producidos.

En la Figura 5, se muestra que la lipasa a partir de hongos es inactiva cuando el medio de reaccionante se mantiene anhidro, pero se incrementa cuando se agrega un 5% de agua y se sostiene activa hasta un 10% de agua en base al aceite. Un contenido de agua mayor del 10% mostró un descenso en el rendimiento de los metil ésteres producidos hasta un rendimiento nulo al 15% de contenido de agua. Por otro lado, la lipasa de páncreas de cerdo mostró siempre incremento del rendimiento de los metil ésteres a medida que se incrementó el contenido de agua.

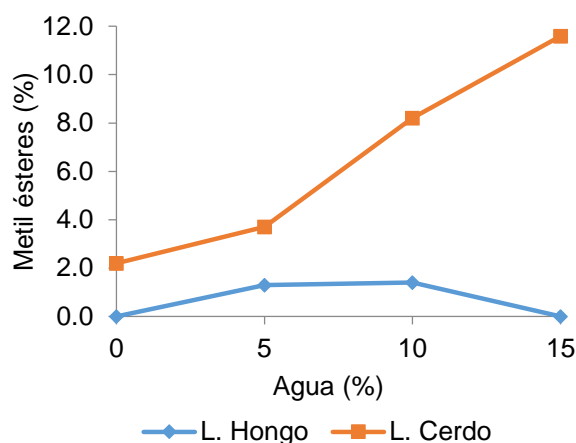


Figura 5. Efecto del contenido de agua en la reacción de transesterificación para la formación de metil ésteres a partir de aceite de olivo catalizada por lipasa cruda de hongos filamentosos y por lipasa de páncreas de cerdo.

Conclusiones

El máximo grado de hidrólisis del aceite de olivo catalizada con lipasa de hongos filamentosos obtenido fue de 3%. Este valor es muy bajo si se compara con el grado de hidrólisis obtenido a partir de la lipasa de páncreas de cerdo. Es necesario considerar como factor importante de la reacción de hidrólisis la adición de co-factores que incrementen la actividad lipolítica de la enzima en estudio.

La reacción de metanólisis se realizó utilizando aceite de olivo extra-virgen y un alcohol de cadena corta (metanol en isooctano). Se usó como biocatalizador lipasa cruda de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*). Los resultados se compararon con los obtenidos de la reacción catalizada por lipasa de páncreas de cerdo comercial. Se estudiaron los factores que se cree afectan el rendimiento de la producción de los metil ésteres, entre estos concentración de enzima utilizada, relación molar aceite-metanol, tiempo de reacción y contenido de agua. El máximo rendimiento obtenido de metil ésteres por catálisis con lipasa libre de consorcio de hongos fue 13%. Se obtuvieron los valores óptimos de reacción: 1% de carga enzimática, relación molar aceite-metanol de 1:9, tiempo de reacción de 96 h y un contenido de agua de 5-10 % en base a aceite de olivo cuando la temperatura de reacción fue 40°C a un pH de 8.0 y agitación de 200 rpm.

Agradecimientos

L. Toscano Palomar agradece a DGEST por el apoyo financiero y a CIATEJ por la realización de una estadía técnica en sus instalaciones para el análisis de los productos de las reacciones.

Referencias

- Du, W. and W. Li, Sun, T., Chen, X., Liu, D. , *Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008. **79**(3): p. 331-337.
- Fjerbaek, L. and K. Christensen, Norddahl, B., *A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification*. Biotechnol. Bioeng., 2009. **102**(5): p. 1298-1315.

Jaeger, K.-E. and T. Eggert, *Lipases for biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 390-397.

Shafei, M.S. and R.F. Allam, *Production and immobilization of partially purified lipase from Penicillium chrysogenum*. Malaysian Journal of Microbiology, 2010. **6**(2): p. 196-202.

Rathod, V.K., Pandit, A.B., *Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil*. Biochem. Eng. J., 2009. **47**(1): p. 93-99.

Puthli, M.S. and V.K. Rathod, Pandit, A.B., *Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies*. Biochemical Engineering J., 2006. **31**(1): p. 31-41.

Byun, H.G. and T.K. Eom, Jung, W.K., Kim, S.K. , *Lipase-catalized hydrolysis of fish oil in optimum emulsion system*. Biotechnol. Biproces. Eng., 2007. **12**(5): p. 484-490.

Salis, A. and M. Pinna, Monduzzi, M., Solinas, V., *Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2008. **54**(1): p. 19-26.

Halling, P.J., *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis*. Enzyme Microb. Technol., 1994. **16**(3): p. 178-206.

Método para la determinación de la factibilidad de instalación de plantas productoras de biodiesel en ciudades de tamaño medio

**Solano-Rentería María Isabel, Sandoval-Salas Fabiola,
Méndez- Carreto Carlos y Zetera Díaz Abigail**

Instituto Tecnológico Superior de Perote.

investiga.itspe@gmail.com

Resumen

Se determinó una metodología, que sirve para evaluar la factibilidad para instalar plantas productoras de biodiesel, en ciudades de tamaño medio. Haciendo uso de métodos y software de ingeniería industrial como el de "Calificación del factor cualitativo" (Monks, 1991), "Árbol de expansión mínima" (Taha, 1995), software WinQS. Los datos obtenidos mostraron que es posible emplear la metodología para definir las rutas de colecta de materia prima, optimizando tiempos y distancias, así como para determinar si la disponibilidad de materia prima es suficiente para la instalación de una planta de producción de biodiesel. En el caso particular de