



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOTECNOLOGÍA
APLICADA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LIPASAS A
PARTIR DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS
AISLADOS DE SUELOS Y SU APLICACIÓN EN LA
TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITES DE DESECHO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA**

PRESENTA:

I. Q. JABEL DINORÍN TÉLLEZ GIRÓN

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ**



TEPETITLA, TLAX. DICIEMBRE 2009

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CRUZ LÓPEZ

DRA. ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA

DR. RAÚL JACOBO DELGADO MACUIL

DR. MARLON ROJAS LÓPEZ

DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 12:00 horas del día 06 del mes de octubre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis de titulada:

Evaluación de la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho

Presentada por el alumno:

Dinorín	Téllez Girón	Jabel
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		B 0 7 1 1 3 6

aspirante de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Victor Eric López y López

Dra. María del Carmen Cruz López

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Dr. Marlon Rojas López

Centro de Investigación
en Biotecnología
Aplicada

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 20 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe Jabel Dinorín Téllez Girón alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B071136, adscrito a CIBA-IPN Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Víctor Eric López Y López y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vlopezyl@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jabel Dinorín Téllez Girón

Nombre y firma



El presente trabajo se llevó a efecto en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, en Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala y en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la Dirección del Dr. Víctor Eric López Y López con el financiamiento de proyectos de investigación de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP 20070177, SIP 20080380 Y SIP20091292) del IPN y apoyo de la Beca Institucional para estudios de posgrado y del Programa Institucional para la Formación de Investigadores del IPN.



AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Víctor Eric López Y López por su amistad, confianza, paciencia, consejos, guía y el enorme apoyo durante el desarrollo de todo este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial por sus observaciones y comentarios enriquecedores que hicieron de este un mejor trabajo: Dr. Víctor Eric López Y López, Dra. María del Carmen Cruz López, Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil, Dr. Marlon Rojas López y Dra. Alma Leticia Martínez Ayala.

A la Dra. Mónica Rosales Pérez y M. C. Joel Alba Flores por sus comentarios, observaciones y enseñanza sobre todo en la parte de microbiología de este trabajo.

Al Dr. Valentín López Gayou por sus comentarios y apoyo en la parte de espectroscopía de UV/Vis.

A los miembros de la Central Analítica en el CINVESTAV: M.C. Elvira Ríos Leal, Cirino Rojas, Vinicio Mena y Beni por sus enseñanzas, paciencia y hospitalidad.

Al Ing. Francisco Martínez Montes por su apoyo en el laboratorio del CIBA.

A los catedráticos que formaron parte de mi formación profesional y personal a lo largo de mis estudios de Maestría.

Al personal administrativo del CIBA-IPN por todo su apoyo.



DEDICATORIA.

A todos los compañeros estudiantes del CIBA, por sus críticas, aportaciones, consejos, los momentos de relax y de desvelo: Diana, Luisa, Rubén, Luis Mario, Elizabeth, Ale, Carla, Trini, Ivonne, Miriam, Leonor, Reyna, Pili, Jaque, Alicia, Tony, Aaron, Arturo, Anaisell, Andreita, Denisse, Lupitas, Pepe Beto, Ruby, Selma, Wendy, Xochitl, Yera, Ale y Fret, Iván, Bárbara y los chicos de matrícula B09.

A los estudiantes de Servicio social, estancias y prácticas profesionales por su apoyo: Gustavo, Hilda, Verónica, Miguel Angel, Yaneth y Victoria.

Al personal del CIBA-IPN: Doña Gude, Don Chava, Don Pepe, Don Angel y todos los demás por cuidarnos.

A todos mis buenos amigos con los que he crecido y que conociéndome siempre me tuvieron paciencia y me siguieron echando porras: Vero, Liz, Mario, Javier, Martha, Zully, Eufemia, Mine, Iliana; Chicos integración: Ivon, César, Faride, Valeria, Lozada; Sonia, Raquel, Toñito, Raúl, Ing. Mateos, Ing. Mariano, Eugenio, Lulú y Alex, Hugo y Lupita, Paty, Gabriel, George, Lupita Navarro, Fredy, Adel y Anita, José Torres, Pepe, Oscar.

Pero sobre todo a mi familia por su apoyo, ejemplo, paciencia, ánimo, consejos y regaños para dar lo mejor. A mis padres, porque por ellos soy lo que soy junto con mis hermanos Pilar y Rubén; a mis sobrinos Charles y Abigail, a mis abuelitas y abuelitos, a mis tíos y tías, pero sobre todo a mi Tío Homero, Tía Rocío y sus familias, a tood@s mis prim@s y tías abuelas por su carácter y consejos.

Finalmente a todos y a Dios, por los diferentes gustos que le han dado un buen sabor a mi vida.



CONTENIDO.

1. RESUMEN.	14
2. SUMMARY.	15
3. INTRODUCCIÓN.	16
4. ANTECEDENTES.	18
4.1. Biodiesel.	18
4.2. Métodos de producción del biodiesel.	19
4.3. Reacción de transesterificación.	20
4.4. Materias primas utilizadas en la producción de biodiesel a nivel industrial.	21
4.4.1. Aceite vegetal virgen.	22
4.4.2. Grasa animal y aceite vegetal de desecho.	24
4.4.3. Alcoholes utilizados en la producción de biodiesel.	24
4.5. Catalizadores utilizados para la reacción de transesterificación.	25
4.5.1. Catalizadores heterogéneos.	25
4.5.2. Catalizadores homogéneos.	25
4.5.2.1. Catalizador alcalino.	26
4.5.2.2. Catalizador ácido.	27
4.5.2.3. Catalizador enzimático.	27
4.6. Métodos para evaluar la actividad enzimática de lipasas.	34
4.6.1. Ensayo en placa con Rodamina B.	34
4.6.2. Ensayo de para-Nitrofenil Palmitato.	35
4.7. Métodos de análisis para la caracterización del biodiesel.	38
5. JUSTIFICACIÓN.	39
6. OBJETIVOS.	39
6.1. OBJETIVO GENERAL.	39
6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	39
7. MATERIALES Y METODOS.	40
7.1. Medios y condiciones de cultivo.	40
7.1.1. Medios de cultivo.	40
7.1.2. Inóculos y acondicionamiento.	40
7.2. Aislamiento y selección de microorganismos productores de lipasas en medio sólido.	41
7.3. Conservación de microorganismos.	42



7.4. Obtención de extractos enzimáticos. _____	42
7.5. Determinación de actividad enzimática por medio del ensayo de para-Nitrofenil Palmitato. _____	42
7.6. Reacción de transesterificación. _____	43
7.6.1. Caracterización de sustratos y productos de la reacción de transesterificación. _	43
7.6.2. Cinéticas de reacciones de transesterificación con metanol. _____	44
7.7. Métodos analíticos. _____	45
7.7.1. Cromatografía de gases. _____	45
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____	46
8.1. Selección y aislamiento de microorganismos productores de lipasas. _____	46
8.2. Identificación de microorganismos seleccionados. _____	50
8.3. Obtención de extractos enzimáticos. _____	52
8.4. Estandarización del ensayo de para-Nitrofenil Palmitato para cuantificar actividad lipolítica. _____	54
8.5. Cuantificación de actividad lipolítica con el ensayo de pNPP de microorganismos seleccionados. _____	61
8.5.1. Actividad de lipasas para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CN5, MM5 y MMS7. _____	61
8.5.2. Actividad de lipasas para bacterias Gram (+), CN7 y MM7. _____	66
8.5.3. Actividad de lipasas para la cepa <i>P. mirabilis</i> en MMS9. _____	68
8.6. Reacciones de transesterificación. _____	74
8.6.1. Caracterización de sustratos y productos de la reacción de transesterificación. _	74
8.6.2. Cinéticas de reacciones de transesterificación con metanol. _____	79
8.6.2.1. Evaluación de extractos enzimáticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CN5, MM5 y MMS7. _____	79
8.6.2.2. Evaluación de extractos enzimáticos de Bacterias Gram (+), CN7 y MM7. _____	88
8.6.2.3. Evaluación de extractos enzimáticos de <i>Proteus mirabilis</i> , MMS9. _____	92
9. CONCLUSIONES. _____	101
10. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS. _____	102
11. BIBLIOGRAFIA. _____	103



INDICE DE FIGURAS.

<i>Figura 1. Reacción de Transesterificación.</i>	20
<i>Figura 2. Proceso químico de producción de biodiesel.</i>	31
<i>Figura 3. Proceso enzimático de producción de biodiesel.</i>	31
<i>Figura 4. Proceso de producción de enzimas.</i>	32
<i>Figura 5. Estructura de la Rodamina B.</i>	35
<i>Figura 6. Cinética de evaluación enzimática con ensayo en placa con Rodamina B.</i>	46
<i>Figura 7. Primer sembrado en placa por vertido, a partir de diluciones de medios de cultivo líquidos acondicionados.</i>	47
<i>Figura 8. Historial de las series de ensayos en placa con Rodamina B de los microorganismos seleccionados.</i>	47
<i>Figura 9. Cepas seleccionadas por su evaluación cualitativa a 30 h.</i>	52
<i>Figura 10. Diseño experimental para obtener extractos enzimáticos de cepas seleccionadas.</i>	53
<i>Figura 11. Cinética de pH en las fermentaciones de los microorganismos seleccionados.</i>	53
<i>Figura 12. Reacción de ensayo de para-Nitrofenil Palmitato.</i>	54
<i>Figura 13. Curva de ajuste de datos de absorbancia a 400 nm contra concentración de para-Nitrofenol.</i>	55
<i>Figura 14. Espectros de absorción UV/Vis con errores obtenidos a partir de muestras de reacción.</i>	56
<i>Figura 15. Ensayo de reacción con CS de MM7 de cultivo de 12 h con etanol, con su repetición de medición de muestras a las 3-4 h.</i>	57
<i>Figura 16. Ensayo de reacción con enzima y concentración de NaOH de 0.1 M, 4 muestras de reacción de 0.5, 5, 10 y 30 min y diferentes tiempos de medición después de tomada la muestra.</i>	57
<i>Figura 17. Ensayo de reacción variando la concentración de NaOH y tiempos de medición después de tomada la muestra. (a) medición inmediata; (b) 1 h después; (c) 23 h después.</i>	59
<i>Figura 18. Ensayo de mezcla de reacción (blanco) y reacción con CS de MM7 de cultivo de 12 h y metanol, con diferentes concentraciones de NaOH. Dos muestras de reacción de 10 y 30 min. Dos tiempos de medición después de tomada la muestra. (a) 1 h después; (b) 72 h después.</i>	59
<i>Figura 19. Ensayo de reacción con enzima, diferentes concentraciones de NaOH y dos distintos tiempos de medición después de muestreo: (a) 40 min; (b) 205 min.</i>	60
<i>Figura 20. Espectros de muestras de reacción en diferentes concentraciones de NaOH y tiempos de medición después de tomada la muestra.</i>	60
<i>Figura 21. Cuantificación de actividad <i>Ps. aeruginosa</i> en CN5.</i>	62
<i>Figura 22. Cuantificación de actividad <i>Ps. aeruginosa</i> en MM5.</i>	63



<i>Figura 23. Cuantificación de actividad de Ps. aeruginosa en MMS7.</i>	64
<i>Figura 24. Cuantificación de actividad Ps. aeruginosa obtenidas en distintos medios de cultivo y condiciones de pH.</i>	65
<i>Figura 25. Cuantificación de actividad de bacteria Gram (+) en CN7.</i>	66
<i>Figura 26. Cuantificación de actividad de bacteria Gram (+) en MM7.</i>	67
<i>Figura 27. Cuantificación de actividad de P. mirabilis en MMS9.</i>	68
<i>Figura 28. Comparación de actividad máxima de lipasas a partir de CS.</i>	70
<i>Figura 29. Comparación de actividad máxima de lipasas a partir de SL.</i>	71
<i>Figura 30. Cromatogramas de soluciones A, B, C y D de estándares de metil ésteres, la escala se presenta en min (ver Tabla 22).</i>	76
<i>Figura 31. Cromatogramas de Aceite de soya virgen (a) directo y (b) metilado, la escala se presenta en min.</i>	77
<i>Figura 32. Cromatogramas de Aceite de desecho (a) directo y (b) metilado, la escala se presenta en min.</i>	78
<i>Figura 33. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en CN5, 12 h.</i>	80
<i>Figura 34. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en CN5, 12 h.</i>	81
<i>Figura 35. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en CN5, 48 h.</i>	81
<i>Figura 36. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en CN5, 48 h.</i>	82
<i>Figura 37. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en MM5, 12 h.</i>	83
<i>Figura 38. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en MM5, 12 h.</i>	83
<i>Figura 39. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en MM5, 24 h.</i>	84
<i>Figura 40. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en MM5, 24 h.</i>	84
<i>Figura 41. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en MMS7, 24 h.</i>	85
<i>Figura 42. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en MMS 24 7, h.</i>	86
<i>Figura 43. Cinética de reacción de transesterificación, Pseudomonas aeruginosa en MMS7, 36 h.</i>	86
<i>Figura 44. Cinética de producción de ésteres, Pseudomonas aeruginosa en MMS7, 36 h.</i>	87
<i>Figura 45. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de Pseudomonas aeruginosa.</i>	88
<i>Figura 46. Cinética de reacción de transesterificación, bacteria Gram (+) en CN7, 48 h.</i>	89
<i>Figura 47. Cinética de producción de ésteres, bacteria Gram (+) en CN7, 48 h.</i>	89



<i>Figura 48. Cinética de reacción de transesterificación, bacteria Gram (+) en MM7, 24 h.</i>	90
<i>Figura 49. Cinética de producción de ésteres, bacteria Gram (+) en MM7, 24 h.</i>	91
<i>Figura 50. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de bacterias Gram (+).</i>	92
<i>Figura 51. Cinética de reacción de transesterificación, Proteus mirabilis en MMS9, 12 h.</i>	93
<i>Figura 52. Cinética de producción de ésteres, Proteus mirabilis en MMS9, 12 h.</i>	93
<i>Figura 53. Cinética de reacción de transesterificación, Proteus mirabilis en MMS9, 48 h.</i>	94
<i>Figura 54. Cinética de producción de ésteres, Proteus mirabilis en MMS9, 48 h.</i>	94
<i>Figura 55. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de Proteus mirabilis.</i>	95
<i>Figura 56. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos seleccionados.</i>	96



INDICE DE TABLAS.

<i>Tabla 1. Propiedades del biodiesel según ASTM D6751-09.</i>	19
<i>Tabla 2. Algunos de los ésteres de metilo presentes en el biodiesel.</i>	21
<i>Tabla 3. Plantas productoras de biodiesel a partir de aceite vegetal.</i>	21
<i>Tabla 4. Porcentaje de aceite usado para investigación y producción de biodiesel.</i>	22
<i>Tabla 5. Porcentaje promedio de glicéridos y ácidos grasos libres en aceites vegetales vírgenes.</i>	23
<i>Tabla 6. Porcentajes de principales ácidos grasos presentes en distintos aceites vegetales y grasa animal.</i>	23
<i>Tabla 7. Comparación de propiedades de catalizadores en la transesterificación.</i>	26
<i>Tabla 8. Microorganismos productores de lipasas.</i>	29
<i>Tabla 9. Lipasas y los microorganismos que las producen citados en investigaciones enfocadas a la producción de biodiesel.</i>	30
<i>Tabla 10. Comparación de diferentes métodos de evaluación de actividad lipolítica.</i>	36
<i>Tabla 11. Medios sólidos y condiciones de pH.</i>	40
<i>Tabla 12. Medios de cultivo líquidos inoculados con muestras de suelos, para acondicionamiento de microorganismos productores de lipasas.</i>	41
<i>Tabla 13. Ésteres metílicos comerciales.</i>	44
<i>Tabla 14. Selección y aislamiento de cepas en los diferentes ensayos en placa.</i>	49
<i>Tabla 15. Identificación de microorganismos seleccionados, medio de cultivo y muestra de suelo a partir del cual fueron aislados.</i>	50
<i>Tabla 16. Microorganismos seleccionados.</i>	51
<i>Tabla 17. Identificación de microorganismos seleccionados, su medio de cultivo y muestra de suelo de la cual proviene.</i>	52
<i>Tabla 18. Actividades máximas de CS de microorganismos seleccionados.</i>	72
<i>Tabla 19. Actividades máximas de SL de microorganismos seleccionados.</i>	72
<i>Tabla 20. Extractos enzimáticos seleccionados.</i>	73
<i>Tabla 21. Datos de cuantificación de actividad obtenidos por Teng y Xu en 2007.</i>	74
<i>Tabla 22. Soluciones de estándares de metil ésteres.</i>	75
<i>Tabla 23. Propiedades y porcentaje de composición de ácidos grasos en el aceite de Soya virgen y de desecho.</i>	79
<i>Tabla 24. Biodiesel producido con Pseudomonas aeruginosa en CN5.</i>	82
<i>Tabla 25. Biodiesel producido con Pseudomonas aeruginosa en MM5.</i>	85
<i>Tabla 26. Biodiesel producido con Pseudomonas aeruginosa en MMS7.</i>	87



<i>Tabla 27. Biodiesel producido con Bacteria Gram (+) en CN7.</i>	<u>90</u>
<i>Tabla 28 Biodiesel producido con Bacteria Gram (+) en MM7.</i>	<u>91</u>
<i>Tabla 29. Biodiesel producido con Proteus mirabilis en MMS9.</i>	<u>95</u>
<i>Tabla 30. Biodiesel producido con los extractos enzimáticos seleccionados.</i>	<u>97</u>
<i>Tabla 31. Condiciones y porcentaje de producción de metil ésteres de reacciones de transesterificación enzimática de otras investigaciones.</i>	<u>99</u>



1. RESUMEN.

El biodiesel es usualmente definido como ésteres de alquilo con ácidos grasos producidos por la transesterificación alcalina de aceites y grasas refinadas con alcoholes de cadena corta. Sin embargo, con este proceso la producción del biodiesel a partir de materias primas sin refinar, tal y como son los aceites y grasas de desecho presentan algunas dificultades como resultado de las propiedades de dichas materias primas y el contenido de ácidos grasos libres. La transesterificación enzimática que se lleva a cabo bajo condiciones menos demandantes pueden superar los problemas del proceso químico. Por tanto, la demanda industrial por nuevas fuentes de lipasas con diferentes características estimula estudios de aislamiento y selección de microorganismos productores de lipasas. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la actividad de lipasas de microorganismos aislados y seleccionados de diferentes muestras de suelos y a diferentes condiciones. Treinta y dos cepas productoras de lipasas fueron aisladas utilizando técnicas de acondicionamiento de cultivos con tres diferentes medios (líquidos y sólidos) y condiciones de pH. El medio líquido tiene una composición mineral (MM), el segundo fue el MM con sacarosa (MMS) y caldo nutritivo (CN) con 8 g/l de NaCl. A todos los medios se les agregó 5% (v/v) de aceite de desecho y fueron ajustados a pH de 5, 7 y 9, dando un total de 9 medios de cultivo. Muestras de suelo fueron añadidas a cada medio y se incubaron a 30°C y 100 rpm de agitación durante 3 semanas. La selección y aislamiento fue llevado a cabo con muestras de los medios líquidos sembrados en medio sólido con la misma composición y condiciones que los medios líquidos, con 2.5 % de aceite (v/v) y Rodamina B. Los microorganismos aislados fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa* (16), *Proteus mirabilis* (10), cuatro bacterias Gram(+) y dos de *Escherichia coli*. La evaluación cuantitativa de las lipasas se realizó con el ensayo del *para*-Nitrophenyl Palmitate (pNPP) con metanol, etanol y sin alcohol y usando dos extractos enzimáticos: células secas (CS) y sobrenadantes liofilizados (SL) a diferentes tiempos y condiciones. Las mayores actividades determinadas reportadas como porcentajes de conversión fueron con CS, especialmente con *Ps. aeruginosa* obteniéndose 57% y 40 % de los cultivos a las 24 y 36 h respectivamente en MMS a pH 7. Por otro lado, los mayores porcentajes de conversión obtenidos en la transesterificación enzimática de aceites de desecho y metanol fueron 57%, 55% y 38% con *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y la bacteria Gram(+) respectivamente. Estos valores son similares a los reportados en la literatura con lipasas puras y recombinantes, así como con microorganismos modificados genéticamente y utilizados como catalizadores en forma de células completas en estudios para la producción de biodiesel.



2. SUMMARY.

Biodiesel is often defined as fatty acids alkyl esters produced by the alkali-catalyzed transesterification of refined vegetable oils and fats with short chain alcohol. The production of biodiesel from unrefined feedstocks, e. g. waste cooking oils using this technology, however has encountered some difficulties as a result of the properties of the feedstocks and their free fatty acids content. Enzymatic transesterification under mild conditions can overcome the problems of chemical processes. Hence, the industrial demand for new sources of lipases with different enzymatic characteristics stimulates studies on the isolation and selection of new strains of lipolytic microorganism. The goal of this work was to evaluate the lipase activity of isolated and selected microorganism from different soil samples and different conditions. Thirty two lipase producing strains were isolated by employing conditioning culture techniques with three different media (liquid and solid) and pH conditions. The liquid media has a mineral composition (MM), the second one was the MM with sucrose (MMS) and nutrient broth (CN) with 8 g/l of NaCl. For all media, waste cooking oil was added with 5% (v/v) and adjusted pH values of 5, 7 and 9, given a total of 9 independent cultures. Samples of soil was added to each media and incubated at 30°C and agitation of 100 rpm for three weeks. The screening and isolation was carried out with samples of the liquid media inoculated in agar plates with same media composition and conditions with fluorescent dye Rhodamine B. The microorganisms isolated were identified as *Pseudomonas aeruginosa* (16), *Proteus mirabilis* (10), four Gram(+) bacteria and *Escherichia coli* (2). The quantitative assessment of lipase activities were conducted with *para*-Nitrophenyl Palmitate (pNPP) assay with methanol, ethanol and without alcohol using two enzymatic extracts: dry cells (CS) and lyophilized supernatants (SL) at different times and conditions. The major lipase activities reported as percentage of conversion were obtained with CS, especially with *Ps. aeruginosa* were 57% and 40% at 24 and 36 h respectively cultivated in MMS at pH 7. The highest conversion obtained in the enzymatic transesterification of waste oil with methanol were 57%, 55% y 38% with *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and Gram(+) bacteria respectively. These values are similar to that reported in the literature with recombinant and purified lipases, as well as with genetically modified microorganism and their use as whole-cells biocatalyst for biodiesel production studies.



3. INTRODUCCIÓN.

El uso indiscriminado de los combustibles de origen fósil, como el carbón mineral, gas natural, petróleo y sus derivados; han generado emisiones de gases a la atmosfera que causan: lluvia ácida y el efecto invernadero, esos gases son: dióxido de carbono (CO_2), ozono (O_3), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), compuestos halocarbonados, como los, clorofluorcarbonados (CFCs), hidroclorofluorcarbonados (HCFCs) e hidrofliuorcarbonados (HFCs) (Pinto et al. 2005). México es el primer productor de emisiones de gases de efecto invernadero en América Latina con aproximadamente 360 millones de toneladas de dióxido de carbono al año, por lo cual requiere de un marco legal para dar cumplimiento a sus compromisos en el protocolo de Kyoto, respecto de estas emisiones. Lo anterior se puede realizar con ayuda de las energías alternas, que son una fuente de energía amigable para el medio ambiente por su mínimo o nulo efecto negativo, provienen de una fuente renovable, las principales son: la energía eólica, solar, geotérmica, hidráulica o maremotriz y la energía generada a partir de la biomasa, que se obtiene directa o indirectamente de recursos biológicos dentro de las cuales se encuentran: el biogás, bioetanol y biodiesel.

Los combustibles derivados del petróleo son los combustibles más utilizados, sin embargo la sobreexplotación de estos energéticos han provocado escasez a nivel mundial de este recurso no renovable. También el mal uso y manejo de combustibles fósiles han provocado el agotamiento de recursos no renovables, así como, graves problemas de contaminación ambiental con daños irreversibles a ecosistemas en: suelos, mantos freáticos, mares, lagos y ríos. El diesel es el combustible con mayor demanda en la industria (Kulkarni y Dalai 2006) y por estas razones se ha girado nuestra atención a la producción del biodiesel como energía alterna, este biocombustible es de origen vegetal y reemplaza al diesel derivado del petróleo es: biodegradable, no inflamable, no tóxico y tiene un perfil de combustión-emisión favorable, produce mucho menos dióxido de carbono a comparación del diesel derivado del petróleo (Zheng et al. 2006). Se produce a partir de aceites vegetales y alcohol de cadena corta por medio de la reacción de transesterificación y es catalizada por una base, ácido o enzima.

La producción de biodiesel se lleva a cabo por medio de un proceso enzimático, y brinda beneficios ambientales e implica un menor número de etapas y costos de operación en comparación con los procesos alcalinos utilizados actualmente (Khan 2002), que requieren de altas temperaturas de operación y múltiples etapas de separación para obtener productos (Khan 2002) que cumplan con los parámetros de calidad establecidas en diferentes países (Pinto et al. 2005, Canakci 2007, Khan 2002). En el proceso alcalino se tiene el riesgo de la reacción de saponificación y de la generación de residuos inorgánicos indeseables en la reacción de transesterificación (Khan 2002). Por estas razones, para la producción del biodiesel por medio de un proceso enzimático es muy importante una adecuada selección de enzimas, tomando en consideración el proceso involucrado para la obtención de los extractos enzimáticos y la evaluación de la capacidad lipolítica que estos posean; todo esto, para que el proceso de transesterificación sea eficiente y económicamente competitivo y atractivo para la industria (Fjerbaek et al. 2009).



Actualmente se buscan propuestas de nuevas fuentes de energía que se tomen a partir de recursos renovables y que no afecten al medio ambiente (Khan 2002). Por lo que, el 1 de Febrero de 2008, se aprobó en México, la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, ordenamiento con el cual se impulsará la agroindustria para la producción de etanol y biodiesel, como elementos clave para contribuir a lograr la autosuficiencia energética del país mediante el uso de energías renovables. La Ley de Bioenergéticos promueve que México se integre a la tendencia mundial de usar fuentes de energía alterna que sean eficientes, modernas y limpias, implicando mejores condiciones de vida para el campo, en donde estamos demasiado atrasados técnicamente.

En México se tienen contempladas plantas productoras de biodiesel a partir de aceite de *Jatropha curcas* y palma, esta materia prima resulta costosa debido a que son aceites vegetales vírgenes e implican un mayor costo en su proceso de obtención (Canakci 2007). Una alternativa sería utilizar una materia prima barata como: grasas y aceites de desecho. El aceite de desecho se genera en grandes cantidades, del cual solo un pequeño porcentaje, es aprovechado para producir comida de animales de granja (Canakci 2007) y el resto es confinado o simplemente vertido al drenaje provocando contaminación de suelos y agua principalmente. Tan solo en Estados Unidos se generan anualmente más de un millón de toneladas de aceite de desecho (Canakci 2007, Kulkarni y Dalai 2006).

Por estas razones, surge la necesidad de obtener biodiesel a partir de materia prima barata (aceites de desecho), por medio de un proceso más benéfico con el ambiente (enzimático) que además, no requiere de costos de operación elevados y de obtención de este biocombustible y subproductos de interés.



4. ANTECEDENTES.

La búsqueda de nuevas fuentes de energía gira principalmente en torno a las energías alternas derivadas de recursos renovables, con las cuales la demanda energética mundial podría ser cubierta. Una de ellas es la energía generada a partir de la biomasa, definida como el combustible energético que se obtiene directa o indirectamente de recursos biológicos; siendo de tres tipos: sólidos, que se usan directamente para cocinar o calentar como: leña o el estiércol seco; líquidos como: los alcoholes o aceites, el biodiesel; gases como: en el caso del metano producido por fermentación de materia orgánica (Sarukhán 2009).

4.1. Biodiesel.

El uso del biodiesel se remonta desde que Rudolph Diesel en 1911 utilizó el aceite vegetal como combustible, pero su uso directo en los motores provocó los siguientes problemas (Pinto et al. 2005, Canakci 2007, Khan 2002, Fukuda et al. 2001):

- Formación de coque (hulla) en inyectores.
- Deposito de carbón.
- Espesamiento o gelificación de aceite y lubricantes por contaminación de aceites vegetales.
- Problemas de lubricación.
- Alta viscosidad (11 a 17 veces más alta que el diesel).
- Formación de gomas.
- Baja volatilidad provocando depósitos en máquinas por las características incorrectas de vaporización e incompleta combustión.

Tomando en cuenta estos factores y problemas se llegó al biodiesel, que es un biocombustible derivado de aceites vegetales, grasas animales o aceites vegetales de desecho que puede ser utilizado como sustituto o aditivo del diesel convencional, representando una alternativa al uso de los combustibles fósiles (Canakci 2007). El biodiesel es una fuente de energía limpia, renovable, de calidad y económicamente viable que además contribuye a la conservación del medio ambiente (Zheng et al. 2006).

La ASTM (American Society for Testing and Material Standard), define al biodiesel como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables tales como aceites vegetales o grasas de animales y que se emplean en motores de ignición de compresión.

El biodiesel tiene una muy buena biodegradabilidad (25 mg/l-día), en comparación con el diesel fósil (12 mg/l-día). El biodiesel, tanto en agua como en suelos se degrada a los 30 días aproximadamente (Zhang et al. 1997). En la Tabla 1, se muestran las especificaciones del biodiesel según las normas de la ASTM.



Tabla 1. Propiedades del biodiesel según ASTM D6751-09.

Propiedad	Métodos ASTM	Límites	Unidades
Punto de inflamación en copa cerrada	D 93	93 mínimo	°C
Agua y sedimento	D 2709	0.05 máximo	% vol.
Viscosidad cinemática, 40°C	D 445	1.9 – 6.0	mm ² /seg
Cenizas sulfatadas	D 874	0.02 máximo	% masa
Sulfuros			
Grado S 15	D 5453	0.0015 max. (15)	% masa (ppm)
Grado S 500	D 5453	0.05 max. (500)	% masa (ppm)
Corrosión de lámina de cobre	D 130	No. 3 máximo	
Número de cetano	D 613	47 mínimo	
Residuos de carbón	D 4530	0.05 máximo	% masa
Número ácido	D 664	0.50 máximo	Mg KOH/g
Glicerina libre	D 6584	0.020 máximo	% masa
Glicerina total	D 6584	0.240 máximo	% masa

4.2. Métodos de producción del biodiesel.

En diversos estudios se ha reportado que el biodiesel se puede producir por diferentes métodos como son: (Pinto et al. 2005, Fukuda et al. 2001, Ranganathan et al. 2008):

- **Pirólisis.** Es el cambio químico causado por la aplicación de energía térmica en la presencia de aire o nitrógeno. El resultado de la pirólisis de triglicéridos es un producto con cantidades inaceptables de cenizas, depósitos de carbón, alto punto de fluidez, otros componentes como: alcanos, alquenos, alcadienos, aromáticos y ácidos carboxílicos.
- **Microemulsificación.** Se realiza mezclando aceites vegetales, ésteres y co-solventes (agente de dispersión); con alcohol (metanol, etanol y 1-butanol) o surfactantes mezclados o no con diesel, con el objetivo de disminuir la viscosidad de los aceites, aunque ésta queda por arriba de la máxima especificada por la ASTM.



- **Transesterificación.** Llamada también alcoholólisis, ésta reacción consiste en hacer reaccionar triacilgliceroles con alcoholes de cadena corta en presencia de catalizadores. Los catalizadores pueden ser ácidos, bases y enzimas. Actualmente el catalizador utilizado a nivel industrial es el alcalino. Con esta reacción se reduce el peso molecular, la viscosidad y se mejora la volatilidad ya que el aceite conformado principalmente de triglicéridos se fracciona en una mezcla de ésteres alquílicos.

Éste proceso es el que ofrece una producción de biodiesel sustentable, más factible y amigable con el medio ambiente y el mismo proceso de producción, razón por la que se describe con más detalle. Desde la reacción de transesterificación, la recuperación del glicerol (co-producto) y la simple purificación de los metil ésteres producidos (Fukuda et al. 2001).

4.3. Reacción de transesterificación.

El biodiesel se obtiene por medio de la reacción de transesterificación de aceites vegetales, aceites de desecho o grasas animales que reaccionan con un alcohol de cadena corta y que con ayuda de un catalizador, nos produce ésteres de alquilo y glicerol (Canakci 2007). Estos productos se obtienen por el intercambio del grupo alcoxi (RO) de un éster por otro alcohol. En la Figura 1, se observa la reacción de transesterificación con metanol, en donde R₁, R₂ y R₃ representan las cadenas alifáticas que conforman el triglicérido y en los productos los distintos metil ésteres formados a partir de los ácidos grasos que conforman al triglicérido.

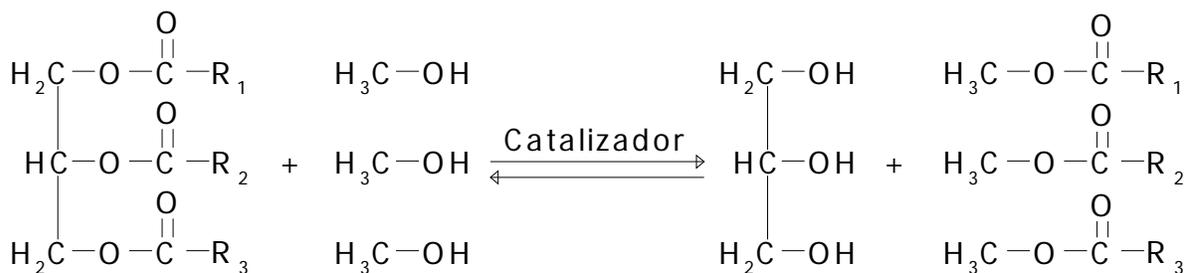


Figura 1. Reacción de Transesterificación.

Durante la reacción de transesterificación, los enlaces éster se van rompiendo y se van sustituyendo por el grupo hidroxilo del alcohol de cadena corta, de esta manera se van obteniendo intermediarios como: diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y los ésteres de alquilo (biodiesel) según sea el alcohol usado (Khan 2002). Algunos ejemplos de ésteres formados por medio de la transesterificación a partir de aceites vegetales, aceites de desecho o grasas y con metanol se presentan en la Tabla 2. En donde la abreviatura, se refiere al número de carbonos de la cadena alifática, y después de los dos puntos al número de enlaces dobles presentes en esta cadena (FAO 1997).

Tabla 2. Algunos de los ésteres de metilo presentes en el biodiesel.

Nombre sistemático	Nombre común	Abreviatura	Familia de ácido graso	
Éster metílico del ácido Hexadecanóico	Metil hexadecanoato	Metil Palmitato	C16:0	-
Éster metílico del ácido Octadecanóico	Metil octadecanoato	Metil estearato	C18:0	-
Éster metílico de 9-Acido Octadecenoico	Metil 9-octadecenoato	Metil Oleato	C18:1	n-9
Éster metílico de 9,12-Acido Octadecadienoico	Metil 9,12-Octadecadienoato	Metil linoleato	C18:2	n-6
Ester metílico de 9, 12, 15. Ácido octadecatrienoico	Metil 9, 12, 15 octadecadienoato	Metil linolenato	C18:3	n-3

A nivel industrial, el proceso de transesterificación depende de diferentes factores, los más importantes son: el tipo y concentración del catalizador, tipo de alcohol, razón molar de alcohol con el aceite, temperatura de reacción, presencia de ácidos grasos libres, contenido de agua e intensidad de agitación (Fukuda et al. 2001). Actualmente existen países que ya tienen plantas productoras de biodiesel a partir de aceites vegetales y de desecho (Tabla 3) (Pinto et al. 2005).

Tabla 3. Plantas productoras de biodiesel a partir de aceite vegetal.

País	Aceite vegetal
España y Argentina	Aceite de Girasol
EUA, Argentina y Brasil	Aceite de Soya
Europa	Aceite de colza
Malasia	Aceite de palma
México e Inglaterra	Aceite de desecho

4.4. Materias primas utilizadas en la producción de biodiesel a nivel industrial.

Actualmente, a nivel industrial y de investigación se produce el biodiesel utilizando aceite vegetal virgen, sobresaliendo los aceites vegetales que se citan en la



Tabla 4. Las propiedades físicas y químicas de estos aceites son importantes para definir las condiciones del proceso de producción. Por otro lado, los alcoholes utilizados para este proceso son de cadena corta principalmente metanol y etanol, pues de igual manera se busca que se tenga disponibilidad y bajo costo de esta materia prima. La selección de los catalizadores utilizados para llevar a cabo de manera eficiente la reacción de transesterificación, influyen para definir también las condiciones del proceso, lo cual afecta los costos de producción de este energético.

Tabla 4. Porcentaje de aceite usado para investigación y producción de biodiesel.

Aceites y fuentes de triglicéridos	Porcentaje de uso para Biodiesel (%)
Soya	49
Colza	25
Girasol	22
Grano de palma	9
Canola	9
Oliva	8
Semilla de algodón	8
Maíz	6
Ricino	5
Lino	4
Cártamo	4
Aceite reciclado	26
Grasas animales	8
Ácidos grasos	6

(Pinto et al. 2005).

4.4.1. Aceite vegetal virgen.

El uso de éstos aceites preocupa sobre todo a la población mundial, ya que la mayoría son comestibles y se puede provocar una escasez o aumento de sus precios. Por esta razón se busca también que el aceite a utilizar no sea comestible y su aplicación actual no se vea tampoco comprometida al ser usado como materia prima para la producción de este energético. Otro punto a considerar es el costo de producción que implica el extraer el aceite vegetal virgen y la cantidad de aceite que se obtiene, con lo cual el costo global de producción de biodiesel se eleva y no sería competitivo con el del diesel derivado del petróleo. Los aceites vegetales están compuestos principalmente de triglicéridos, aunque también se encuentran mono, di



acilgliceroles e incluso ácidos grasos en proporción variable que depende de del origen del aceite (Canakci 2007).

En la Tabla 5 se muestra el promedio del porcentaje de acilgliceroles y ácidos grasos libres presentes en la mayoría de los aceites y grasas (Khan 2002).

Tabla 5. Porcentaje promedio de glicéridos y ácidos grasos libres en aceites vegetales vírgenes.

Glicéridos	Porcentaje presente
Triglicéridos	82
Diglicéridos	12
Monoglicéridos	-
Ácidos grasos libres	6

En la Tabla 6, se observa la diferencia del contenido de ácidos grasos en algunas fuentes de glicéridos, citándose también el aceite vegetal de desecho; el ácido graso con mayor contenido se muestra con letras negritas para cada una de las fuentes; con esto podemos ver que la diferencia de la composición de ácidos grasos depende del aceite vegetal en estudio,

Tabla 6. Porcentajes de principales ácidos grasos presentes en distintos aceites vegetales y grasa animal.

	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolénico
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Palma^{2,3}	39.0-53.5	3.7-5.1	31.0-44.1	6.7-20.0	0.0-0.6
<i>Jatropha Curcas</i>⁴	12.8-15.3	3.7-9.8	34.3-45.8	29.0-44.2	0.0-0.3
Soya¹	10.58	4.76	22.52	52.34	8.19
Grasa animal¹	23.04	12.75	43.34	9.53	0.75
Aceite de desecho¹	10.0-12.3	2.0-5.8	19.0-26.5	49.4-64.0	5.9-10.2

¹(Canakci 2007)

²(Pinto et al. 2005)

³(Khan 2002)

⁴(Shah et al. 2004)



4.4.2. Grasa animal y aceite vegetal de desecho.

Debido a la generación anual que se tiene de este tipo aceites vegetales de desecho, ya se está considerando como alternativa de materia prima potencial para la obtención de biodiesel, pues se adquiere a un costo más económico en comparación con aceites vegetales vírgenes (Canakci 2007). Estos aceites se consideran de desecho porque ya fueron utilizados en cocinas o restaurantes y por el uso que se les ha dado, que actualmente es como ingrediente para comida de animales de granja (Canakci 2007) o solo se confina para su desecho. Tan solo en EUA se generan más de un millón de toneladas por año (Canakci 2007). En México no existen datos sobre la cantidad de este tipo de desechos que se producen y su fin, ya sea confinamiento, alimento de animales de granja u otro.

Su composición de ácidos grasos depende del aceite vegetal de origen (ver Tabla 6). Cuando el aceite es usado, se le somete a temperaturas de 160 °C a 200 °C, lo que provoca cambios en algunas de sus propiedades (Canakci 2007, Kulkarni y Dalai 2006) como son: el aumento en su viscosidad, en el calor específico, en la tendencia de grasa para espuma, la tensión superficial y color. Este tipo de aceites está compuesto de una mayor proporción de ácidos grasos libres (<15%) ((Canakci 2007, Kulkarni y Dalai 2006) en comparación con los aceites vegetales refinados (Hsu et al. 2003, Canakci 2007, Hsu et al. 2002), ya que por el calor y condiciones a las cuales son sometidos durante el freído, sufren tres diferentes reacciones (Kulkarni y Dalai 2006), las cuales se explican a continuación:

- Termolítica
En ausencia de oxígeno e incremento de temperatura se generan:
 - Compuestos saturados: alcanos, alquenos, ácidos grasos de cadena corta, cetonas simétricas, oxopropil ésteres, CO, CO₂.
 - Compuestos insaturados: Componentes diméricos (dehidrodímeros, dímeros saturados), componentes policíclicos.
- Oxidativa
Los ácidos grasos insaturados reaccionan con oxígeno molecular formando: hidroperóxidos, hidroperóxidos isoméricos, derivados ceto o hidroxilo, aldehídos, semialdehídos hidrocarburos y ácidos.
- Hidrolítica
Estas reacciones se presentan por el vapor al cocinar produciendo hidrólisis de triglicéridos, formándose ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol.

4.4.3. Alcoholes utilizados en la producción de biodiesel.

Para definir que alcohol utilizar para la producción de biodiesel, es importante evaluar la fuente de donde se obtiene el alcohol, el precio, la disponibilidad y los efectos que este puede tener sobre la reacción de transesterificación ya sean favorables o no; preferentemente se utilizan alcoholes de cadena corta debido a que se



requieren menores temperaturas para obtener una alta conversión. Siendo más usado para la transesterificación el metanol, debido a su bajo costo para llevar a cabo ésta reacción (Lu et al. 2007). Otros alcoholes usados en la producción e investigación para obtener biodiesel son: etanol, isopropanol y butanol, (Canakci 2007, Khan 2002, Kulkarni y Dalai 2006, Hsu et al. 2002; Du et al. 2003, Fjerbaek et al, 2009).

4.5. Catalizadores utilizados para la reacción de transesterificación.

Un catalizador es una sustancia capaz de acelerar una reacción química; no alteran el balance energético final de reacción, si no que solo permiten que se alcance el equilibrio con mayor o menor velocidad. Los catalizadores utilizados industrialmente y para investigación para la producción de biodiesel, se pueden clasificar en función al tipo de fase en donde ocurre la reacción dividen en heterogéneos y homogéneos y a su vez en ácidos, alcalinos y enzimáticos. (Pinto et al. 2005, Kulkarni y Dalai 2006, Ranganathan et al. 2008)

4.5.1. Catalizadores heterogéneos.

Los catalizadores heterogéneos se encuentran en distinta fase que los reactivos, son materiales capaces de absorber moléculas del reactivo en sus superficies, consiguiendo mayor concentración y superficie de contacto entre reactivos o debilitando sus enlaces disminuyendo la energía de activación. Los productos abandonan el catalizador cuando se forman y este queda libre para seguir actuando. Los catalizadores heterogéneos más usados son metales y óxidos de metales finamente divididos Algunos ejemplos de estos catalizadores aplicados a la reacción de transesterificación son (Khan 2002): zeolitas, resinas sulfónicas, SO_4/ZrO_2 , KNO_3/ZrO_2 , $Na/NaOH/Al_2O_3$, MgO , CaO , $CaCO_3$. (Pinto et al. 2005, Jitputti et al. 2006)

4.5.2. Catalizadores homogéneos.

Los catalizadores homogéneos están en la misma fase que los reactivos y pueden ser alcalinos, ácidos o enzimáticos. En la Tabla 7 se citan los más importantes con las ventajas y desventajas al ser aplicados en la reacción de transesterificación.



Tabla 7. Comparación de propiedades de catalizadores en la transesterificación.

	Catalizadores		
	Ácido ²	Alcalino ¹	Enzimático ^{1,3}
Conversión (%)	98-99.4	90-97	3-100
Tiempo (h)	4-96	1-8	1-90
Ácidos grasos libres en materia prima	Metil ésteres	Productos saponificables	Metil ésteres
Agua en materia prima	Interferencia con la reacción	Interferencia con la reacción	Sin efecto
Producción de metil ésteres	Normal	Normal	Alta
Recuperación de Glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Purificación de metil ésteres	Lavados continuos	Lavados continuos	Ninguno
Costo de producción del catalizador	Barato	Barato	Relativamente alto
Temperatura (°C)	25-80	30-70	30-50

¹ (Fukuda et al. 2001)

² (Zheng et al. 2006)

³ (Hsu et al. 2004, Pinto et al. 2005, Kulkarni y Dalai 2006, Modi et al. 2006)

4.5.2.1. Catalizador alcalino.

Los catalizadores alcalinos generalmente son bases, el que más se utiliza es el NaOH aunque también se utilizan: carbonatos, alcóxidos (metóxido, etóxido, propóxido y butóxido de potasio y sodio). Utilizando este tipo de catalizadores químicos la reacción se realiza 4000 veces más rápido que utilizando la misma cantidad de catalizador ácido (Fukuda et al. 2001). Para utilizar estos catalizadores, los glicéridos y alcohol deben cumplir ciertas características como: bajo contenido de agua y de ácidos grasos libres, ya que la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos libres junto con el catalizador alcalino produce sales de estos ácidos grasos (jabón) (Canakci 2007), consumiéndose al mismo tiempo el catalizador y reduciendo así la eficiencia catalítica (Fukuda et al. 2001). Por otro lado, estos ácidos grasos libres presentes no son esterificados en su totalidad a diferencia de los que se encuentran ligados como triglicéridos, provocando con esto una baja eficiencia en la conversión de aceite a



biodiesel, además de las altas temperaturas que se necesitan (Pinto et al. 2005, Khan 2002, Ranganathan et al. 2008).

A nivel industrial con el uso de este catalizador es como se obtiene actualmente el biodiesel, pero se presentan problemas de operación y separación de los productos requiriendo un mayor número de etapas en el proceso (Figura 2 y Tabla 7).

4.5.2.2. Catalizador ácido.

Los catalizadores ácidos pueden ser H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 y ácidos orgánicos sulfónicos (Canakci 2007, Zheng et al. 2006). Cuando existe una alta cantidad de (Canakci 2007), por lo tanto no hay problema de saponificación, pero la reacción es más lenta comparándola con la alcalina, muy corrosiva y requiere de temperaturas y presiones más altas y extremas (Fukuda et al. 2001).

A nivel industrial, al igual que el proceso alcalino requiere de un número mayor de etapas para obtener los productos deseados y provoca corrosión en los equipos del proceso (Figura 2 y Tabla 7) (Pinto et al. 2005, Ranganathan et al. 2008).

4.5.2.3. Catalizador enzimático.

En la naturaleza existen catalizadores biológicos de origen protéico llamados biocatalizadores, comúnmente conocidos como enzimas; también existen ácidos ribonucleicos con capacidad catalítica llamados ribosimas Actualmente el uso de biocatalizadores ha ido en aumento debido a la rapidez, altas eficiencias y condiciones suaves para llevar a cabo reacciones químicas.

En el proceso de transesterificación, las enzimas utilizadas como catalizador, son las lipasas (Triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3). Estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de lípidos (Gupta et al. 2004, Gupta et al. 2003, Sharma et al. 2001) y actúan sobre compuestos grasos haciéndolos más solubles ya que hidrolizan los triglicéridos que conforman los aceites (Pinto et al. 2005, Jaeger et al. 1994, Sharma et al. 2001), además son producidas por la mayoría de los organismos y para aplicación industrial se obtienen a partir de microorganismos fácilmente manipulables, principalmente hongos y bacterias (Tabla 8). Estos microorganismos pueden producir enzimas tanto intracelulares como extracelulares, siendo en su mayoría extracelulares (Gupta et al. 2004, Sharma et al. 2001, Ranganathan et al. 2008).

Una característica muy importante de las lipasas, es la capacidad que tienen de llevar a cabo reacciones en la interfase de o en un medio orgánico y acuoso (Gupta et al. 2004, Sharma et al. 2001, Jaeger et al. 1994, Gupta et al. 2004). Algunas de las reacciones que catalizan las lipasas son:



Hidrólisis,
Interesterificación,
Acidólisis,
Aminólisis,
Politransesterificación,

Glicerólisis,
Alcohólisis,
Acilación,
Esterificación,
Transesterificación.

Por lo cual, las lipasas son algunas de las enzimas más utilizadas para diferentes aplicaciones (Jaeger et al. 1994, Gupta et al. 2004, Sharma et al. 2001), por ejemplo:

- La industria alimenticia:
 - Mejoramiento de sabores,
 - Tratamiento de carnes,
 - Quesos fermentados y otros alimentos,
 - La industria de grasas.
- En la industria farmacéutica:
 - Síntesis orgánica.
- Tratamiento terapéutico:
 - Reducción de peso.
- Aplicaciones cosméticas,
- Industria de detergentes y biosurfactantes,
- Tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de grasas,
- El tratamiento de pieles.

En la Tabla 9 se presentan algunas lipasas y los microorganismos productores de las mismas, que son citadas en trabajos enfocados a la producción de biodiesel (Figura 3), así como también los aceites, alcoholes y las temperaturas a las que se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación.



Tabla 8. Microorganismos productores de lipasas.

Microorganismo productor de lipasas	Referencias
<i>Burkholderia cepacia</i> (IM-BS-30)	(Sharma et al. 2001)
<i>Candida antártica</i>	(Hsu 2002, Pinto et al. 2005, Kulkarni y Dalai 2006, Modi et al. 2006, Sharma et al. 2001, Xu et al. 2003)
<i>Candida rugosa</i>	(Noureddini et al. 2005, Kaieda et al. 2001, Sharma et al. 2001, Shah et al. 2004)
<i>Candida lipolítica</i>	(Kaieda et al. 2001)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	(Pinto et al. 2005, Sharma et al. 2001, Shah et al. 2004)
<i>Geotrichum candidum</i>	(Kulkarni y Dalai 2006)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(Kaieda et al. 2001)
<i>Penicillium roquefortii</i>	(Kaieda et al. 2001)
<i>Penicillium camemberittii</i>	(Noureddini et al. 2005, Kaieda et al. 2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Kaieda et al. 2001)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	(Hsu et al. 2002, 2003 y 2004, Kulkarni y Dalai 2006, Kaieda et al. 2001)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	(Sharma et al. 2001)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	(Sharma et al. 2001)
<i>Rhizopus oryzae</i>	(Pinto et al. 2005, Matsumoto et al. 2001)
<i>Rhizopus niveus</i>	(Sharma et al. 2001)
<i>Rhizomucor miehei</i>	(Pinto et al. 2005, Sharma et al. 2001, Xu et al. 2003)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	(Hsu et al. 2002 y 2004, Sharma et al. 2001, Du et al. 2003, Xu et al. 2003)

Tabla 9. Lipasas y los microorganismos que las producen citados en investigaciones enfocadas a la producción de biodiesel.

Microorganismo productor y Lipasa	Aceites							Alcohol							Temperatura, °C				
	Soya	Canola	Olivo	Vegetal	Girasol	Palma	Jatropha AD ¹	Metanol	Etanol	1-Propanol	Isopropanol	1-Butanol	Isobutanol	n-octanol	30	35	40	45	50
<i>Candida antártica</i> , Novozym 435	X	X	X	X			X	X	X	X		X	X	X		X	X		
<i>Rhizopus delemar</i>				X				X											
<i>Rhizomucor miehei</i>				X	X	X		X							X	X	X		
<i>Candida rugosa</i>	X						X X	X	X	X		X	X	X		X			
<i>Candida lipolítica</i>	X							X											
<i>Klebsiella oxytoca</i> , Lipasa recombinante	X							X											
<i>Penicillium camemberittii</i>	X							X											
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X						X	X	X							X			
<i>Pseudomonas cepacia</i>	X						X	X	X							X	X		
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	X				X			X		X	X	X			X		X		X
<i>Chromobacterium viscosum</i>							X		X								X		

¹ AD, Aceite vegetal de desecho.

En la Figura 3 se puede ver el diagrama de flujo del proceso enzimático en donde a diferencia del proceso químico (Figura 2), los productos se separan fácilmente



por diferencia de densidades, apreciándose un menor número de etapas para obtener los productos deseados, lo que resulta de gran importancia a nivel industrial.

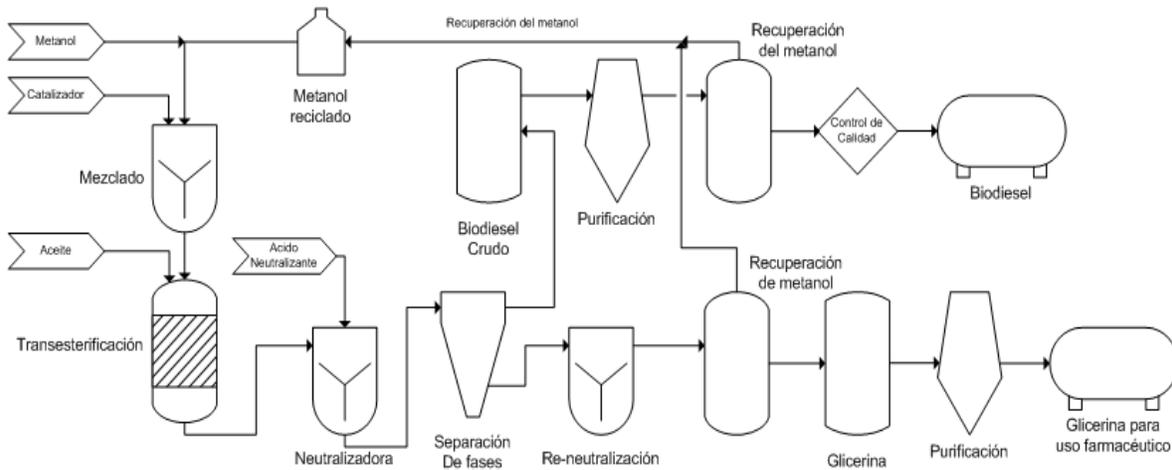


Figura 2. Proceso químico de producción de biodiesel.

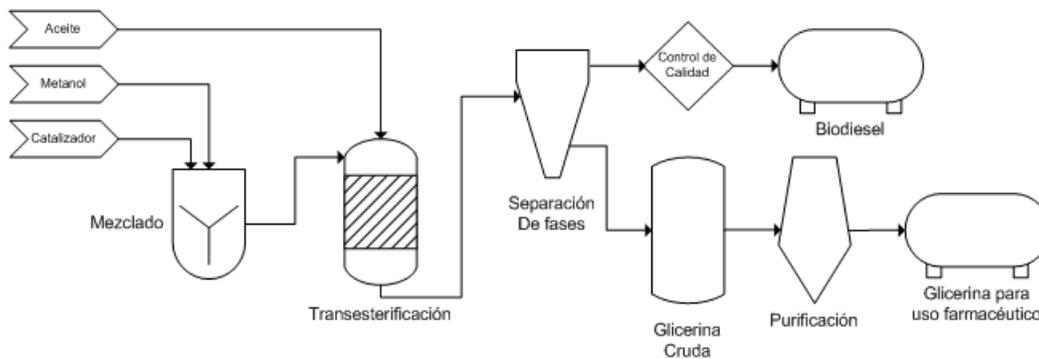


Figura 3. Proceso enzimático de producción de biodiesel.

Actualmente para la producción de lipasas comerciales se requiere de un número de etapas de purificación elevado (Figura 4), el cual depende de la pureza a la cual se quiera obtener las lipasas, que por lo regular es alto. Esto hace que este punto sea una desventaja y a su vez una área de estudio en la producción de enzimas para una factible producción de biodiesel. En esta figura se puede observar desde el desarrollo del medio de cultivo comprendiendo: el origen, cantidad de la fuente de carbono (la concentración de aceite para una producción óptima de biomasa es de 3% pero la producción óptima de lipasas ocurre con 2%), la fuente de Nitrógeno (generalmente con nitrógeno orgánico y amonio) (Sharma et al. 2001) y el pH preferentemente de 5.0 a 8.5 (Gupta et al. 2004, Chi et al. 2009); hasta llegar a un producto terminado en donde se involucran distintas etapas de purificación, con lo cual se justifica el precio que estas enzimas tienen en el mercado. Lo ideal sería llegar a un punto en el cual no sean necesarias tantas etapas de purificación y en el cual se pueda obtener un extracto enzimático aplicable en la reacción de transesterificación.

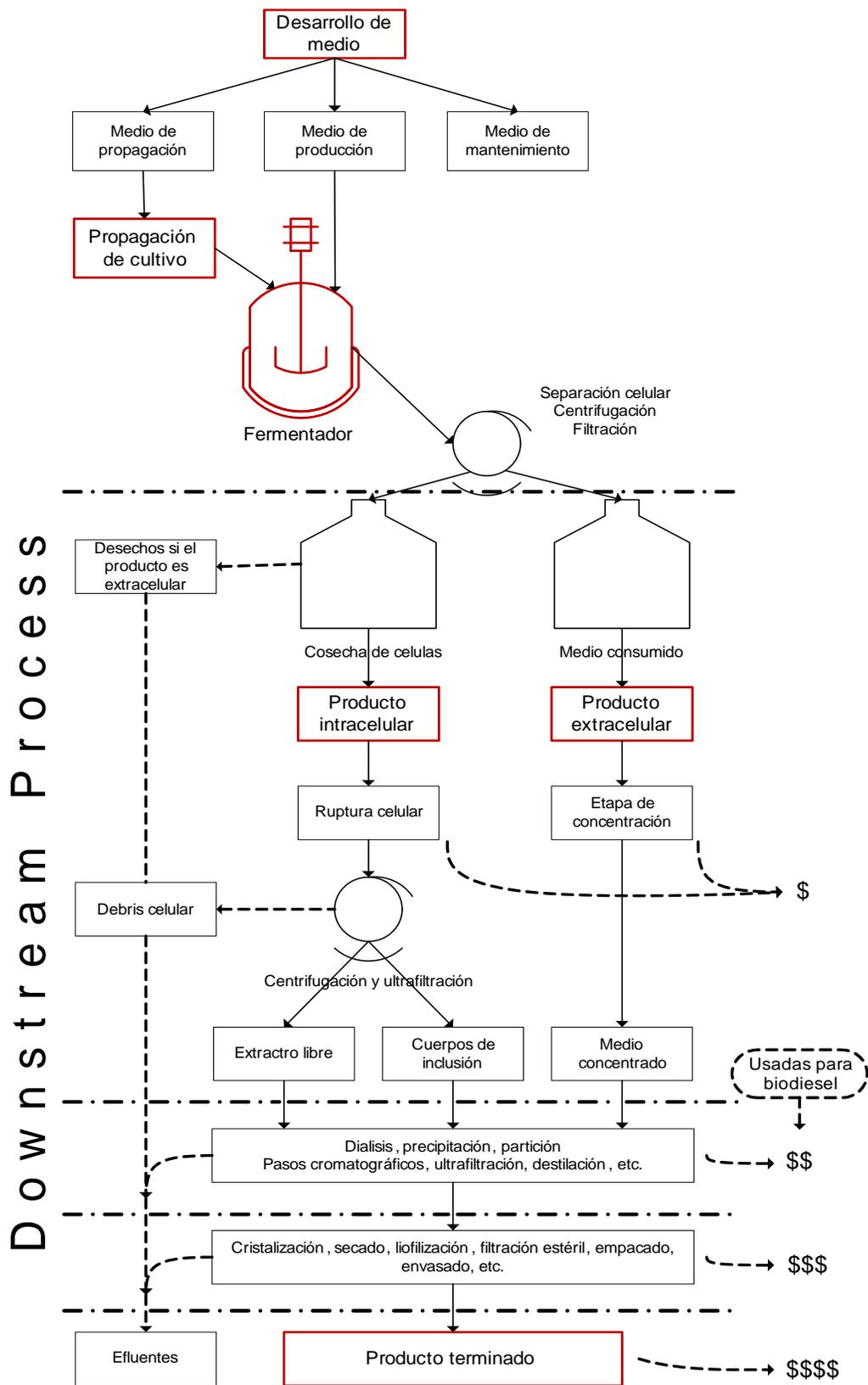


Figura 4. Proceso de producción de enzimas.



Algunas consideraciones importantes para hacer económicamente viables el uso de estas enzimas en su producción y para el proceso de transesterificación (Fjerbaek et al. 2009, Gupta et al. 2004) son:

Por parte de la producción de lipasas, propiedades que se pueden predecir con evaluaciones enzimáticas:

- Microorganismos a partir de los cuales se obtuvieron, ya que cada uno de ellos requiere de un manejo y uso específico,
- Enzimas libres o inmovilizadas,
- Con o sin pretratamiento,
- Con o sin regeneración,
- El reuso que se les va a dar,
- La facilidad y bajo costo para producirlas,
- Tiempo de vida de la enzima,
- Transferencia de masa interna y externa,
- Velocidad de difusión,
- Estabilidad y
- Desactivación de las enzimas.

Por parte del proceso de transesterificación:

- El alcohol a utilizar y la manera en que éste será agregado al reactor,
- Proceso por lotes o de manera continua,
- Razones molares de alcohol:aceite,
- Actividad de agua en la transesterificación en sistemas libres o no de solvente, y la polaridad de éste,
- Tiempo de reacción,
- Temperatura del proceso.

De manera general, en la Tabla 7 mostrada anteriormente, se observa la comparación del uso de los distintos catalizadores mencionados y descritos anteriormente. Finalmente se puntualizan las ventajas de utilizar catalizador enzimático sobre ácidos y alcalinos:

- A diferencia del método alcalino donde puede llevarse a cabo la saponificación por la presencia del NaOH, agua y ácidos grasos libres (Canakci 2007, Kulkarni y Dalai 2006), en el proceso enzimático no se presenta este problema porque se lleva a cabo la transesterificación de estos ácidos grasos libres presentes en mayor proporción en aceites de desecho comparados con los aceites vírgenes (Hsu et al. 2003, Kulkarni y Dalai 2006, Fjerbaek et al. 2009).
- Al realizar la transesterificación con catalizador enzimático en comparación con el químico, se elimina la presencia de material inorgánico disminuyendo el número de etapas de separación (Pinto et al. 2005, Khan 2002) y la cantidad de agua de desecho del proceso es menor (Fjerbaek et al. 2009).
- Las enzimas utilizadas como catalizador se pueden reutilizar para llevar a cabo posteriores reacciones de transesterificación.



- La temperatura requerida para llevar a cabo la reacción de transesterificación es menor en comparación de los métodos químicos (Zheng et al. 2006).

Y las desventajas al utilizar el método enzimático, son:

- El costo de la lipasa es aún elevado por lo que aumenta el costo de producción del biodiesel (Fjerbaek et al. 2009).
- La enzima puede ser inhibida principalmente por el uso de metanol y la presencia de glicerol, provocando una baja eficiencia en la producción (Fjerbaek et al. 2009).
- El tiempo de reacción de transesterificación por medio de algunas enzimas es más largo para poder obtener altos rendimientos de transesterificación en comparación con el proceso alcalino (Fjerbaek et al. 2009).

4.6. Métodos para evaluar la actividad enzimática de lipasas.

Los métodos para seleccionar microorganismos productores de lipasas han ido evolucionando, ya que debido a las amplias condiciones en las cuales las lipasas son activas y en las cuales pueden llevar a cabo diversas reacciones, estos ensayos varían en términos de sus principios básicos: selección de sustrato, sensibilidad y aplicación (Kouker y Jaeger 1987, Jaeger et al. 1994, Gupta et al. 2003). Tanto para cualificar o cuantificar la actividad enzimática de lipasas existen diferentes métodos, destacando los métodos por: titulación, fluorescencia, cromatografía, espectroscopía y espectrofotometría (Gupta et al. 2003) En la Tabla 10 se resumen algunos métodos cualitativos y cuantitativos mediante estrategias de análisis que permiten el procesamiento de muchas muestras. Sin embargo sobresalen el método cualitativo del ensayo en placa con Rodamina B y el método cuantitativo para el ensayo de *para*-Nitrofenil Palmitato ya que son de bajo costo.

4.6.1. Ensayo en placa con Rodamina B.

Para seleccionar los microorganismos productores de lipasas, el ensayo en placa con Rodamina B tiene la ventaja de ser insensible a los cambios de pH del medio (Kouker y Jaeger 1987). La Rodamina B (Figura 5), es un colorante del grupo xanteno que es usado como estándar en la fluorescencia y al ser visto bajo luz ultravioleta (UV) fluoresce. El principio de este ensayo se basa en la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite, de esta manera los ácidos grasos forman un complejo con la Rodamina B que al ser visto bajo luz UV, se puede apreciar la pérdida de la fluorescencia del colorante y de esta manera se pueden observar y determinar las colonias de microorganismos que producen estas enzimas (Sandoval y Marty 2007, Kouker y Jaeger 1987, Gupta et al. 2003). Como se puede ver en la Tabla 10, el ensayo en placa con Rodamina B indica la presencia de actividad lipolítica y ayuda a hacer una selección rápida de microorganismos productores de lipasas.



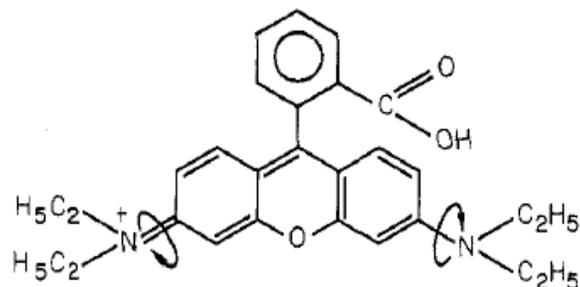


Figura 5. Estructura de la Rodamina B.

4.6.2. Ensayo de *para*-Nitrofenil Palmitato.

El ensayo de *para*-Nitrofenil palmitato (*p*NPP) es un método práctico sobre todo cuando se tiene un número grande de muestras, este método determina la actividad hidrolítica en un medio orgánico u acuoso por medio de la reacción de transesterificación entre el *p*NPP (sustrato para la actividad de hidrólisis) y etanol para producir *para*-Nitrofenol (*p*NP), que puede ser detectado por un método espectrofotométrico simple (Tabla 10). La mayoría de los métodos están basados en ensayos hidrolíticos y el propuesto por Pencreac'h y Baratti en 1996 con la modificación propuesta por Teng y Xu en 2007, se lleva a cabo en un medio orgánico (*n*-heptano). Es importante tomar en cuenta que la actividad en medio orgánico de las enzimas no corresponde a la determinada en medio acuoso (Pencreac'h y Baratti 1996, Teng y Xu 2007). Por lo tanto, este método nos indica la habilidad catalítica de la lipasa para llevar a cabo la reacción de esterificación y transesterificación en un medio orgánico (Gupta et al. 2003) y de hidrólisis en un medio acuoso.

Tabla 10. Comparación de diferentes métodos de evaluación de actividad lipolítica.

Ensayo y sustrato	Producto de análisis	Principio	Observaciones
<u>Ensayo en placa</u> •Tributirin, acilgliceroles y esterres de ácidos grasos de cadena larga.	•Ácidos grasos de cadena corta.	•Halo o cambio de color por la presencia de fenol, Azul de Nilo sulfato, Azul Victoria, Rojo Fenol, Rodamina B.	•Selección rápida.
<u>Titulación</u> •Grasas y aceites, triacilgliceroles, metil esterres.	•Ácidos grasos.	•Reacción de neutralización con medidor o indicador de pH.	•Confiable y comúnmente usado.
<u>Espectrofotometría</u> •Ácidos grasos conjugados de B-naftol. • <i>p</i> -Nitrofenil esterres. •Tweens.	•B-Naftol. • <i>p</i> -Nitrofenol. •Ácidos grasos.	•Estimación de complejo con Naftol con Fast Blue BB. •Producto coloreado y medido a 410 nm. •Precipitación de ácidos grasos con calcio o cobre y medición de la turbiedad.	•El éster no es estable a pH extremos Método conveniente, preferido durante procedimientos de purificación; desventaja de experimentar hidrólisis espontanea. •Simple, reproducible y sensible.
<u>Ensayos de fluorescencia</u> •Triacilgliceroles con grupos alquilos sustituidos con un grupo fluorescente. •No fluorescencia de 4-metilumbeliferil oleato.	•Fluorescencia de grupos libres prenil. •Fluorescencia de 4-metilumbeliferona.	•Cambio en la longitud de onda de la fluorescencia después de la hidrólisis de triacilgliceroles. •Producto analizado por su fluorescencia.	•Ensayo rápido pero caro.



<p><u>Procedimientos cromatográficos (TLC, GC, HPLC)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> •Triacilgliceroles, grasas y aceites. 	<ul style="list-style-type: none"> •Ácidos grasos. 	<ul style="list-style-type: none"> •Análisis y cuantificación del producto o sustrato residual por medio de columnas específicas. 	<ul style="list-style-type: none"> •Uso de acuerdo a la disponibilidad del instrumento, ensayo largo.
<p><u>Presión interfacial:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> •Método de monocapa Lípido. •Método de gota de aceite Lípido. •Microscopia de fuerza atómica, bicapa de lípidos. 	<ul style="list-style-type: none"> •Acido graso. •Acido graso. •Acido graso. 	<ul style="list-style-type: none"> •Cambio de presión superficial debido al rompimiento del triacilglicerol. •La forma de la gota de aceite es monitoreada. •Regiones hidrolizadas de la bicapa lipídica. 	<ul style="list-style-type: none"> •Alta sensibilidad, método elaborado y largo, requiere de estimación de precisión. •Método largo. •Disponibilidad de instrumento.
<p><u>Espectroscopia IR</u></p> <ul style="list-style-type: none"> •Aceites vegetales, trioctanoilglicerol. 	<ul style="list-style-type: none"> •Esteres de ácidos grasos y ácidos grasos libres. 	<ul style="list-style-type: none"> •Lipólisis monitoreada en el espectro de la mezcla de reacción. 	<ul style="list-style-type: none"> •Disponibilidad de instrumento.

(Gupta et al. 2003)



4.7. Métodos de análisis para la caracterización del biodiesel.

El biodiesel generalmente es una mezcla de ésteres, ácidos grasos libres, glicerol, acilglicerol remanentes e incluso hidrocarburos. La composición depende en gran medida del tipo de grasa aceite que se haya utilizado como materia prima y es importante conocerla ya que afecta directamente a la estabilidad del producto final y propiedades. En la literatura científica han sido descritos diferentes métodos para identificar y cuantificar los componentes del biodiesel (Pinto et al. 2005), siendo los más frecuentemente usados los siguientes:

- Cromatografía de gases, CG,
- Cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC,
- Cromatografía de alta presión por exclusión de tamaño, HPSEC,
- Cromatografía de capa fina, CCF,
- Cromatografía de fluidos críticos, SFC,
- Espectrometría de masas, EM,
- Resonancia magnética nuclear, RMN,
- Análisis diferencial térmico, DTA,
- Cromatografía de gel permeable, GPC,
- Espectroscopia infrarrojo, FTIR.

Sin embargo, el método más aceptado es la cromatografía de gases (CG) con detector de ionización de flama (FID), pues ofrece las ventajas de ser eficiente y rápido (Pinto et al. 2005).

Por lo anteriormente expuesto, surge el interés de desarrollar y optimizar procesos alternativos de generación de biodiesel a partir de materias primas de bajo costo como: aceites y grasas de desecho; que a su vez sean amigables ambientalmente y permitan disminuir los costos de operación al minimizar el número de etapas.

5. JUSTIFICACIÓN.

El uso indiscriminado del petróleo, ha provocado diversos problemas ambientales, aunado a esto, el agotamiento de las reservas del energético a nivel mundial ha ido en aumento. Es una necesidad urgente el desarrollar tecnologías de generación de energía alterna que sean baratas y limpias, en particular de la producción de combustibles. El biodiesel, es un combustible que se obtiene a partir de una fuente renovable y es producido por medio de un proceso químico con catálisis alcalina. Sin embargo, a pesar de un mayor porcentaje de conversión en comparación con el proceso enzimático, este proceso de producción requiere: un mayor número de etapas para la separación y refinación del combustible, una temperatura de proceso relativamente alta la cual genera agua alcalina de desecho. Una alternativa es el proceso enzimático el cual: puede realizar la transesterificación en condiciones ambientales, es insensible al contenido de ácidos grasos libres y no es necesario hacer una corrección de acidez y contenido de agua. Por ello al identificar y aislar microorganismos productores de lipasas, se puede tener una producción y selección adecuada de extractos enzimáticos eficientes y estables, que repercutirá en desarrollar el proceso enzimático de producción del biodiesel de manera sustentable y factible.

6. OBJETIVOS.

6.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho.

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Aislar microorganismos productores de lipasas a partir de muestras de suelos en diferentes condiciones de cultivo.
- Evaluar y comparar la actividad lipolítica de los microorganismos aislados sobre aceites de desecho en cultivo en placa.
- Evaluar y cuantificar la actividad lipolítica de extractos enzimáticos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo de los microorganismos seleccionados.
- Evaluar la actividad de transesterificación de aceites de desecho con enzimas seleccionadas.



7. MATERIALES Y METODOS.

7.1. Medios y condiciones de cultivo.

Con el objetivo de acondicionar, seleccionar y aislar microorganismos productores de lipasas a partir de muestras de suelos, se prepararon tres medios de cultivo tanto líquidos como sólidos a tres diferentes pH. A todos se les adicionó aceite vegetal de soya de desecho. El cual donó una cadena de restaurantes de comida rápida, Operadora Cever S.A. de C.V.

7.1.1. Medios de cultivo.

Se utilizaron tres composiciones de medios de cultivo: Medio Mineral (MM), Medio Mineral con Sacarosa (MMS) y el Caldo Nutritivo (CN). El medio MM tiene la siguiente composición: 7.50 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 g/l, KH_2PO_4 ; 3 g/l, MgSO_4 ; 0.5 g/l, de ZnSO_4 ; 150 mg/l, EDTA; 3 mg/l, MnCl_2 ; 5 mg/l, CuSO_4 ; 5 mg/l, CoCl_2 ; 5 mg/l, Na_2MoO_4 ; 30 mg/l, CaCl_2 ; 30 mg/l, FeSO_4 ; 3 g/l extracto levadura y para el caso de MMS, adicionalmente 12 g/l de sacarosa. El medio CN contiene: 8 g/l tanto de caldo nutritivo como de NaCl. Todos los medios líquidos contienen 5% en peso de aceite vegetal de desecho y se ajustaron a tres diferentes pH: 5, 7, y 9. Se esterilizaron por 15 min a 1.05 Kg/cm².

Para los medios sólidos preparados se utilizaron las composiciones descritas con 1.5% de agar y solo 2.5% de aceite de desecho estéril (en algunos casos, también se utilizó aceite de oliva) y el 0.001% de Rodamina B como indicador de la actividad enzimática (Kouker y Jaeger 1987). La Rodamina B se agregó en solución con agua destilada estéril con una concentración de 1 mg/ml. (Kouker y Jaeger 1987), esta solución resultante se paso por un filtro para jeringa de 0.2 μm . Tanto el aceite vegetal de desecho como la solución de Rodamina B, se agregan antes de vertir el medio de cultivo en la placa. En total fueron nueve medios sólidos, como se muestra en la Tabla 11. Otro medio de cultivo sólido que se utilizó fue el agar Nutritivo.

Tabla 11. Medios sólidos y condiciones de pH.

	pH	5	7	9
Medio				
MM		MM5	MM7	MM9
MMS		MMS5	MMS7	MMS9
CN		CN5	CN7	CN9

Los números (5, 7 y 9), indican las condiciones de pH de los medios.

7.1.2. Inóculos y acondicionamiento.

El acondicionamiento de microorganismos productores de lipasas, se realizó a partir de tres muestras de suelos tomados en la ciudad de Puebla (1, 2 y 3), las



cuales se tomaron como inóculos para dos medios líquidos: CN y MMS. Los inóculos se conformaron de dos maneras: para los medios CN a los diferentes pH, cada inóculo se formó con 0.5 g de la combinación de las 3 muestras de suelo (123) y para los medios MMS a los diferentes pH, cada inóculo fue utilizando 1.0 g de cada una de las muestras de suelo (1), (2) ó (3). Ya inoculados los medios líquidos, se incubaron a 30°C y con una agitación de 100 rpm en un agitador orbital, quedando identificados como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Medios de cultivo líquidos inoculados con muestras de suelos, para acondicionamiento de microorganismos productores de lipasas.

Inóculo \ pH	Medio de cultivo CN			Medio de cultivo MMS		
	5	7	9	5	7	9
123	5.123	7.123	9.123	-	-	-
1	-	-	-	5.1	7.1	9.1
2	-	-	-	5.2	7.2	9.2
3	-	-	-	5.3	7.3	9.3

- 1, muestra de suelo de baño público.
 2, muestra de suelo de drenaje.
 3, muestra de suelo de taller mecánico.
 123, combinación de las tres muestras de suelo.

Se tomaron muestras desde el inicio del experimento y durante varios días, para posteriormente continuar con el aislamiento y selección de microorganismos productores de lipasas en medio sólido.

7.2. Aislamiento y selección de microorganismos productores de lipasas en medio sólido.

Se prepararon placas con los distintos medios sólidos, en donde el primer cultivo se realizó inoculando con 100 µl de diluciones en serie de hasta 10⁻⁸ preparadas en agua estéril y con los medios líquidos acondicionados. Las placas se incubaron por 30 h a 30°C y durante este tiempo se monitorearon los cambios presentados en los medios durante el crecimiento de los microorganismos. Se cualificó la actividad enzimática con ayuda de la fluorescencia del medio sólido con Rodamina B, al ser observada bajo luz UV en un transiluminador (Bio-Rad Modelo Gel Doc 2000). La primera selección fue en base a su actividad lipolítica y las colonias detectadas con esta actividad, se tomaron con un asa bacteriológica y con ayuda de un estereoscopio se tomaron las colonias de interés. Posteriormente se hicieron resiembras de los microorganismos para su purificación y evaluación simultanea en base a su actividad.



7.3. Conservación de microorganismos.

Las células que presentaron actividad notable fueron conservadas de la siguiente manera: los microorganismos se inocularon e incubaron en sus mismos medios líquidos adicionados con 5% de aceite vegetal de desecho durante 30 h a 30°C, después se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se lavaron tres veces con solución salina al 0.85%. El paquete celular se conservó en criotubos con glicerol estéril al 20%, a los cuales se les fue reduciendo paulatinamente la temperatura hasta conservarlos a -70°C.

7.4. Obtención de extractos enzimáticos.

Para cuantificar la actividad enzimática, se utilizaron células secas (CS) y sobrenadantes liofilizados (SL) de cada uno de los microorganismos seleccionados. Estos se obtuvieron a partir de los medios líquidos correspondientes, comenzando con el sembrado en placa con incubación de 30 h a 30°C, a partir de la placa, se inocularon 100 ml de medio líquido, el cual después de 12 y 16 h para los medios CN y MM respectivamente, sirvieron como inóculos (5%) para 250 ml del correspondiente medio, se cultivaron bajo las mismas condiciones de incubación y a diferentes tiempos: 12, 24, 36 y 48 h. De estos cultivos se obtuvieron el sobrenadante y células centrifugando el medio líquido después de la fermentación a 10,000 rpm, 4°C por 10 min, el sobrenadante se liofilizó y el paquete celular se lavó con solución salina al 0.85% por 3 veces. El paquete celular obtenido se secó a 40°C y condiciones de vacío por 24 h (Matsumoto 2001).

7.5. Determinación de actividad enzimática por medio del ensayo de *para*-Nitrofenil Palmitato.

Para llevar a cabo la cuantificación de actividad, el ensayo se realizó en tubos eppendorf de 2 ml utilizando como extracto enzimático: 10 mg de CS y por otro lado 20 mg de SL, a los cuales se les adicionó 0.5 ml. de una solución stock (10 mM de *para*-Nitrofenil palmitato en *n*-heptano). La reacción comienza con la adición de 30 µl de solución de metanol o etanol (1 M) y en otra serie de experimentos se utilizaron también los extractos enzimáticos pero sin la adición de alcohol. Para los blancos, se preparó la misma mezcla de reacción pero sin utilizar enzimas. Las mezclas de reacción se incubaron a 40°C y 300 rpm por 10 min (Teng y Xu 2007). Se tomaron dos muestras de 25 µl del sobrenadante de la reacción a dos diferentes tiempos y se les adicionó 1 ml de NaOH 0.5 M. La fase acuosa es analizada por espectroscopia de UV-Visible, donde el *p*NPP se detecta a 400 nm. Es importante mencionar que la hidrólisis del *p*NPP no ocurre en la fase acuosa alcalina, con la cual además de obtener una máxima absorción también inhibe la actividad de la lipasa (Pencreac'h y Baratti 1996). La muestra del blanco sirvió como línea base de los análisis. Las unidades en las que se representó la actividad lipolítica son: producción de *p*NP (micromoles) y % de conversión de *p*NPP a *p*NP que se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Conversión} = \frac{pNP_{\text{Obtenido}}}{pNP_{\text{Total}}} \times 100$$



7.6. Reacción de transesterificación.

7.6.1. Caracterización de sustratos y productos de la reacción de transesterificación.

Con el objetivo de evaluar la cinética de la reacción de transesterificación, primero se caracterizaron el aceite de desecho y el aceite de soya virgen del cual proviene, a éstos se les realizó una metilación básica de la siguiente manera: a una muestra de 50 mg del aceite se le adicionaron 0.5 g de NaOH, 10 ml de agua y 40 ml de metanol. Se mantuvo en agitación y temperatura de 80°C hasta consumirse. Se realizó una primera extracción con 40 ml de hexano, para eliminar el material insaponificable y evitar que causen interferencia la presencia de otros compuestos que el aceite de desecho pueda contener. Después, se realizó una segunda metilación ácida con 40 ml de metanol y 3 ml de ácido clorhídrico a una temperatura de 80°C hasta que se evaporara. Entonces se realizó una segunda extracción con 40 ml de hexano que se lavó dos veces con agua. Se evaporó hasta aforar 10 ml. Entonces, se inyectaron 1-2 μ l de la muestra metilada, para analizar por cromatografía de gases.

Con el objetivo de identificar los tiempos de retención de los metil ésteres producidos en la reacción de transesterificación, se prepararon soluciones estándar de ésteres metílicos comerciales en hexano, los cuales se utilizaron como sustancias de referencias en el análisis. En la Tabla 13 se muestran las sustancias patrón.



Tabla 13. Ésteres metílicos comerciales.

	Nombre	Abreviatura
Insaturados	Palmitoleato de metilo	16:1
	Petroselinato de metilo	18:1
	Elaidato de metilo	18:1
	<i>Cis</i> -Vacenato de metilo	18:1, cis
	Linoleato de metilo	18:2
	Linolenato de metilo	18:2
	Erucato de metilo	22:1 n-9
Saturados	Hexanoato de metilo	6:0
	Octanoato de metilo	8:0
	Decanoato de metilo	10:0
	Laurato de metilo	12:0
	Miristato de metilo	14:0
	Octadecanoato de metilo	18:0
	Eicosenoato de metilo	20:0
	Araquidato de metilo	20:0
Nervoato de metilo	24:1	

7.6.2. Cinéticas de reacciones de transesterificación con metanol.

La reacción de transesterificación se realizó en viales de 1.5 ml con tapa, utilizando 2 mmol de aceite de desecho, cuyo peso molecular aproximado de acuerdo a la composición de ácidos grasos del aceite de soya del cual proviene, es de 280.55 g/mol, con lo que se determinó la cantidad necesaria para la reacción de los extractos enzimáticos (CS) y metanol, quedando de la siguiente manera:

- 561.1 mg de aceite vegetal de desecho, con una densidad de 1.104 g/ml nos da 619.4 μ l.
- 56.11 mg de extracto enzimático (10% p/p de enzima con respecto al aceite de desecho) (Hsu et al. 2002, 2003 y 2004).
- 0.2563 g de metanol, con una densidad de 0.7918 g/ml, nos da 323.7 μ l (razón molar de 4:1 de alcohol con respecto al aceite de desecho) (Hsu et al. 2002 y 2003, Modi et al. 2006, Shah et al. 2004, Du et al. 2003).



La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 40°C (Hsu et al. 2002, Nouredini et al. 2005, Du et al. 2003, Lu et al. 2007, Hsu et al. 2003, Shah et al. 2004) y 300 rpm, con un tiempo de reacción de 336 h. Se tomaron muestras de 20 µl (Lu et al. 2007, Hsu et al. 2004, Shah et al. 2004) a distintos tiempos en el transcurso de la reacción a las cuales se les adicionaron 200 µl de hexano para su análisis por cromatografía de gases inyectando una muestra de 3 µl.

7.7. Métodos analíticos.

7.7.1. Cromatografía de gases.

A partir de las muestras preparadas de sustratos y productos esperados de las reacciones de transesterificación y de las muestras obtenidas de las reacciones de transesterificación que se realizaron, los análisis de cromatografía de gases se llevaron a cabo en la Central Analítica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco, con el apoyo de la M.C. Elvira Ríos Leal y el Ing. Cirino Rojas en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer y utilizando una columna capilar HP Innowax PEG ligada para análisis de alcoholes, ácidos, aromáticos, aceites esenciales y disolventes, con 0.25 mm de D.I., 30 m de longitud, 0.25 mm de espesor de película soporte 8" y rango de temperatura de 40 a 260 °C. Las condiciones del análisis fueron: temperatura de columna 200 °C durante 4 min, con una rampa de 2°C/min hasta 215°C durante 4 min, después una rampa de 5°C/min hasta 255°C durante 27 min. La temperatura del inyector fue de 250°C y del detector de ionización de flama (FID) de 280°C.



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Siguiendo la metodología planteada, se obtuvieron los siguientes resultados, tanto para el aislamiento de microorganismos productores de lipasas, para obtener a partir de ellos extractos enzimáticos aplicables tras su evaluación lipolítica, y para la producción enzimática de biodiesel.

8.1. Selección y aislamiento de microorganismos productores de lipasas.

Con el objetivo de identificar, seleccionar y aislar microorganismos productores de lipasas, los medios de cultivo líquidos fueron inoculados con muestras provenientes de: baño público (1), drenaje (2) y suelo de taller mecánico (3). Una vez acondicionados los microorganismos por aproximadamente tres semanas, se comenzaron a aislar y seleccionar en los medios de cultivos sólidos. Estos medios adicionados con Rodamina B y aceite vegetal de desecho presentaron cierta insolubilidad del aceite de acuerdo al pH en que fue ajustado, en el medio con pH 9 se pudo apreciar uniformidad a diferencia de los medios a pH 5 y 7, en los cuales el aceite no estaba homogéneo en el medio y se acumuló sobre él. La Rodamina B tiene la característica de ser insensible a los cambios de pH (Kouker y Jaeger 1987), lo cual se aprovechó para este trabajo y por lo que los resultados obtenidos son confiables. En general, este método cualitativo, nos permitió evaluar la actividad lipolítica en función del tiempo durante el crecimiento del microorganismo sembrado en el medio de cultivo sólido y de esta manera, poder identificar, seleccionar y aislar a los microorganismos productores de lipasas. Por ejemplo, en la Figura 6 podemos observar en la placa del tiempo de 0 h, que la fluorescencia se aprecia completamente a diferencia de las zonas oscuras observadas por pérdida de fluorescencia en las placas de 24 y 30 h de incubación de la cepa cultivada en MMS a pH 7.

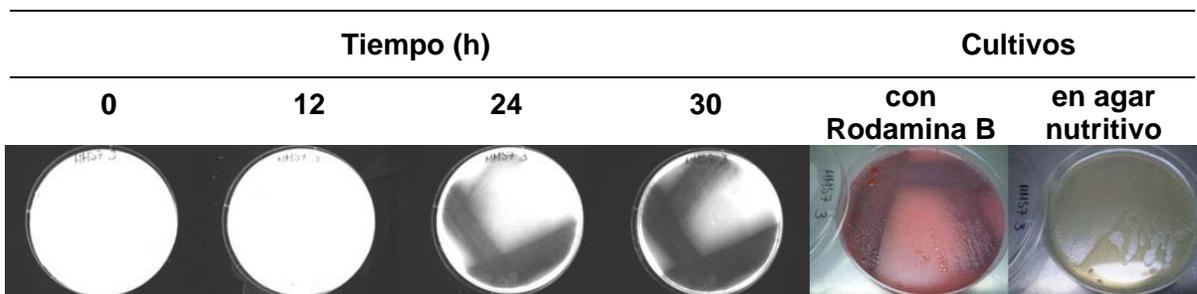


Figura 6. Cinética de evaluación enzimática con ensayo en placa con Rodamina B.

Para la selección se observaron las placas con ayuda de un estereoscopio, sobre todo en el primer ensayo en placa que se sembró de manera directa con los medios líquidos acondicionados y así, poder tomar las distintas colonias presentes en la misma placa y que mostraron actividad (Figura 7), los microorganismos que

crecieron se seleccionaron de acuerdo a las zonas que perdieron fluorescencia, relacionándolas con las diferentes colonias observadas y así comenzar su purificación al sembrarlas en otras placas. Cabe mencionar que las Figuras 7 y 8 se refieren a las seleccionadas por su evaluación cualitativa de actividad lipolítica.

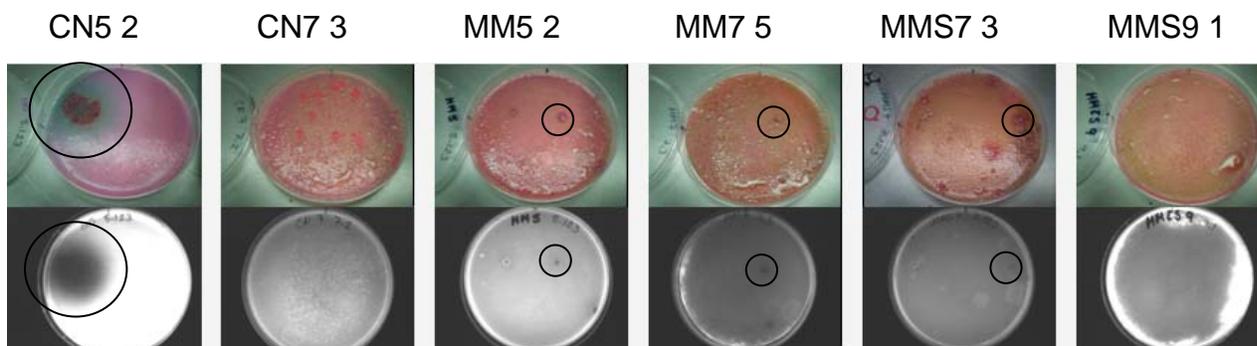


Figura 7. Primer sembrado en placa por vertido, a partir de diluciones de medios de cultivo líquidos acondicionados.

Los ensayos se fueron realizando alternadamente en medios con aceite de olivo (Kouker y Jaeger 1987) y con aceite vegetal de desecho, en donde para el caso de los realizados con aceite de olivo, algunas cepas presentaron mayor actividad que en los realizados con aceite vegetal de desecho y con otras cepas fue de modo contrario. En la Figura 8, se puede observar la secuencia de cuatro series de ensayos en placa con Rodamina B (primer sembrado a partir de diluciones y ensayos: 6, 10 y 11) mostrándose las fotos tomadas bajo luz UV y en donde se ve en las zonas de crecimiento de las seis cepas seleccionadas (columnas) la pérdida de fluorescencia de la Rodamina B debido a la actividad lipolítica.

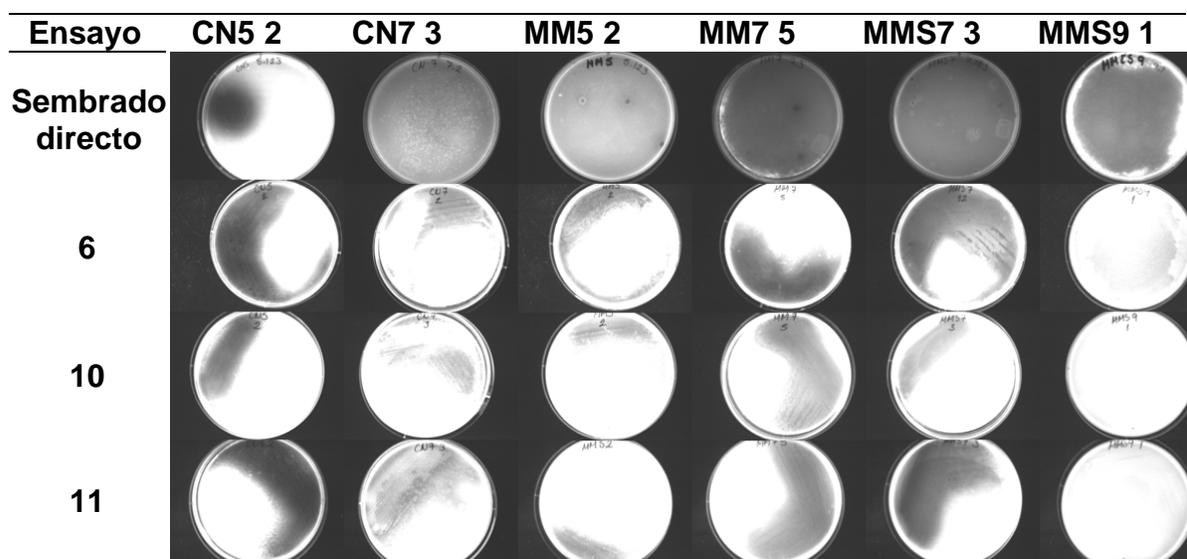


Figura 8. Historial de las series de ensayos en placa con Rodamina B de los microorganismos seleccionados.

En la Tabla 14, se puede observar que en el sembrado directo (Figura 7) con las diluciones de 10^{-8} de los medios líquidos acondicionados, se generaron las primeras 36 placas y a partir de este primer ensayo en placa se seleccionaron 83 cepas por su actividad, en el primer y segundo ensayo se utilizó aceite de olivo. Del segundo ensayo se seleccionaron 66 cepas, el número de microorganismos se redujo ya que al realizar el segundo ensayo algunas cepas no crecieron y/o no eran las que tenían la actividad lipolítica de interés, bajo estos criterios fue que el número de microorganismos se fue reduciendo en los siguientes ensayos. En el tercer ensayo con aceite vegetal de desecho nos quedaron 57 cepas, este número de microorganismos se conservó en el cuarto ensayo realizado con aceite de olivo. En el quinto ensayo el número de cepas se redujo a 43, en donde simultáneamente se prepararon medios de cultivo con aceite vegetal de desecho y aceite de olivo, se practicó una primera tinción de Gram a los microorganismos seleccionados con el objetivo de verificar su correcto aislamiento y caracterizar de acuerdo a Gram a las bacterias. En los siguientes cuatro ensayos el número de cepas se mantuvo. En el sexto ensayo el medio de cultivo fue preparado con aceite vegetal de desecho, mientras que el séptimo, octavo y noveno ensayos se sembraron todas las cepas en agar nutritivo sin aceite con el objetivo de hacer una selección en base a las morfologías de las colonias de microorganismos seleccionados, se practicó una segunda tinción de Gram, donde se verificó el correcto aislamiento de las 43 cepas hasta ahora seleccionadas. En el décimo ensayo con aceite de olivo se verificó la actividad enzimática de estas cepas y también se sembraron en agar nutritivo para que de acuerdo a la morfología de colonia de estas cepas volver a hacer una selección, de donde resultaron 32 microorganismos que se conservaron en el ensayo 11 y 12 con aceite de desecho. En la Tabla 14 se pueden observar como a través de los diferentes ensayos (columnas), el número de cepas seleccionadas fue cambiando de acuerdo a: la evaluación cualitativa con el ensayo en placa con Rodamina B, la morfología de la colonia de las cepas y dos tinciones de Gram que se practicaron. Se puede observar en la Tabla 14 en el ensayo 12 (última columna), que de las 32 cepas seleccionadas: 8 se aislaron con CN (3 fueron a pH 5 y 5 a pH 7), 13 cepas se aislaron con MM (4 fueron a pH 5, y 9).

Los medios de cultivo fueron adicionados con aceite vegetal de desecho y aceite de olivo en los diferentes ensayos, con el propósito de inducir la producción de lipasas de acuerdo a (Makhsumkhanov et al. 2003) ya que entre los mejores inductores se tienen: grasas, ácidos grasos, aceites vegetales, triglicéridos, detergentes basados en ésteres, entre otros.



Tabla 14. Selección y aislamiento de cepas en los diferentes ensayos en placa.

			Ensayos de aislamiento y selección cepas por actividad lipolítica													
Medio	Muestras de suelo	pH	Sembrado directo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CN	1	5	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		7	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		9	1	3	3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	5	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	5	5	5	5	3	3	3	3	3	3	3	3	
		9	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
		9	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	123	5	1	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	3	3
		7	1	2	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MM	1	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		9	1	5	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	123	5	1	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	4	4
		7	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MMS	1	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		9	1	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	
	2	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	8	4	4	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	123	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	1	13	17	11	11	8	8	8	8	8	8	4	4	4
		9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TOTAL			36	83	66	57	57	43	43	43	43	43	32	32	32	



8.2. Identificación de microorganismos seleccionados.

Las 32 cepas seleccionadas en los ensayos en placa con Rodamina B fueron identificadas con apoyo de un laboratorio de la BUAP y la Dra. Mónica Rosales Pérez, con el equipo VITEK de biomérieux. Este equipo sólo identifica enterobacterias. En la Tabla 15 podemos ver las 32 cepas identificadas.

Tabla 15. Identificación de microorganismos seleccionados, medio de cultivo y muestra de suelo a partir del cual fueron aislados.

Cepa	Microorganismo	Medio acondicionado	Muestra de suelo
CN5 1	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
CN5 2	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
CN5 3	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
CN7 1	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	1
CN7 2	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	2
CN7 3	Gram (+)	MMS7	2
CN7 4	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	2
CN7 5	Gram (+)	CN7	123
MM5 1	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
MM5 2	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
MM5 3	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN5	123
MM5 4	<i>Proteus mirabilis</i>	CN5	123
MM7 1	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	3
MM7 2	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	3
MM7 3	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	2
MM7 4	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS7	-
MM7 5	Gram (+)	MMS7	3
MM7 6	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MM7 7	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MM7 8	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MM7 9	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MMS7 1	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MMS7 2	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	3
MMS7 3	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN7	123
MMS7 4	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MMS7 5	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	CN7	123
MMS7 6	Gram (+)	CN7	123
MMS7 7	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	MMS7	2
MMS7 8	<i>Escherichia coli</i>	CN7	123
MMS7 9	<i>Escherichia coli</i>	MMS7	2
MMS9 1	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS9	1
MMS9 2	<i>Proteus mirabilis</i>	MMS9	1



En esta tabla se citan:

- La identificación del microorganismo,
- El medio de cultivo líquido acondicionado de donde fue aislado y
- La muestra de suelo que se utilizó para inocular dichos medios, de donde:
 - 1, corresponde a la muestra de baño público,
 - 2, al de drenaje,
 - 3, al suelo del taller mecánico y
 - 123, fue una mezcla de los tres suelos que sirvieron para inocular los medios de cultivo de CN a los diferentes pH.

En la Tabla 16 a modo de resumen, se enlista la cantidad de estas cepas identificadas como el mismo microorganismo aunque se hayan seleccionado de diferentes medios de cultivo y pH. Adicionalmente esta información nos dice que la población bacteriana de los suelos, independientemente de las condiciones de pH, corresponde a enterobacterias y muy poca proporción a bacterias Gram (+).

Tabla 16. Microorganismos seleccionados.

Microorganismo	Número de cepas
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	16
<i>Proteus mirabilis</i>	10
Gram (+)	4
<i>Escherichia coli</i>	2
Total	32

Esta información ayudo a hacer una selección de microorganismos productores de lipasas más reducido de acuerdo a: la actividad observada en el ensayo en placa con Rodamina B y a la morfología presentada al crecer bajo las mismas condiciones de sustrato. El resultado de esta selección nos dio un total de 6 microorganismos para cuantificarles su actividad por medio del ensayo de *para*-Nitrofenil palmitato. Esta selección final también fue de acuerdo: al medio del cual se purificó, al suelo del cual fue aislado y a su identificación como se puede ver en la Tabla 17. En la Figura 9 se muestran los estos 6 microorganismos seleccionados.



Tabla 17. Identificación de microorganismos seleccionados, su medio de cultivo y muestra de suelo de la cual proviene.

ID Cepa, medio y condiciones de pH de cultivo	Microorganismo	Muestra de suelo
CN5 2	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	123
CN7 3	Gram (+)	2
MM5 2	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	123
MM7 5	Gram (+)	3
MMS7 3	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	123
MMS9 1	<i>Proteus mirabilis</i>	1



Figura 9. Cepas seleccionadas por su evaluación cualitativa a 30 h.

8.3. Obtención de extractos enzimáticos.

Con el fin de determinar la actividad de lipasas tanto intracelulares como extracelulares se obtuvieron extractos enzimáticos, para ello se realizaron cuatro cultivos a diferentes tiempos: 12, 24, 36 y 48 h por cada una de las seis cepas seleccionadas (Figura 9) para obtener los extractos celulares en forma de sobrenadantes liofilizados y células secas (Figura 10).

La obtención de estos extractos enzimáticos solo requirieron de dos pasos y comparado con el proceso de purificación de la lipasa microbial, estos requieren de al menos cuatro o cinco pasos (Gupta et al. 2005) (Figura 4). Esto contribuye a que la industria busque estrategias de purificación que sean económicas, rápidas, con alto rendimiento y manejable (Gupta et al. 2005). La producción de grandes cantidades de células como catalizadores son fáciles de preparar por cultivos y la permeabilización de las células completas al ser preparadas de esta manera ofrecen muchas ventajas para la aplicación industrial (Matsumoto et al. 2001). Esto es muy importante para la producción de biodiesel ya que debemos de contar con catalizadores baratos, y por esta razón podemos utilizar y evaluar células completas ya sea con células nativas o recombinantes que presenten una actividad lipolítica notable.

Adicionalmente en la Figura 11 se presentan las cinéticas de pH de las fermentaciones de las cepas seleccionadas y se puede ver que después de 6 h de fermentación, el pH de los cultivos se estableció entre los valores de 6 y 7, lo cual se

puede deber a que el microorganismo produce ácidos orgánicos u otros compuestos como parte de su metabolismo, lo cual también depende de las fuentes de carbono y nitrógeno disponibles en el medio de cultivo.

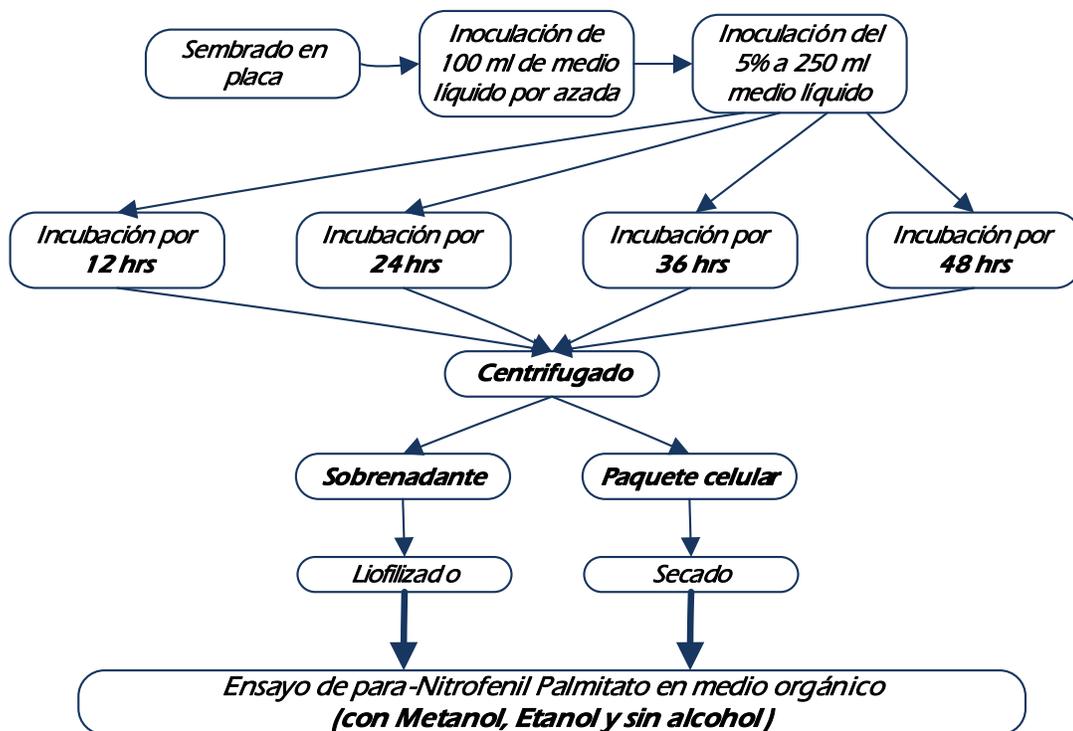


Figura 10. Diseño experimental para obtener extractos enzimáticos de cepas seleccionadas.

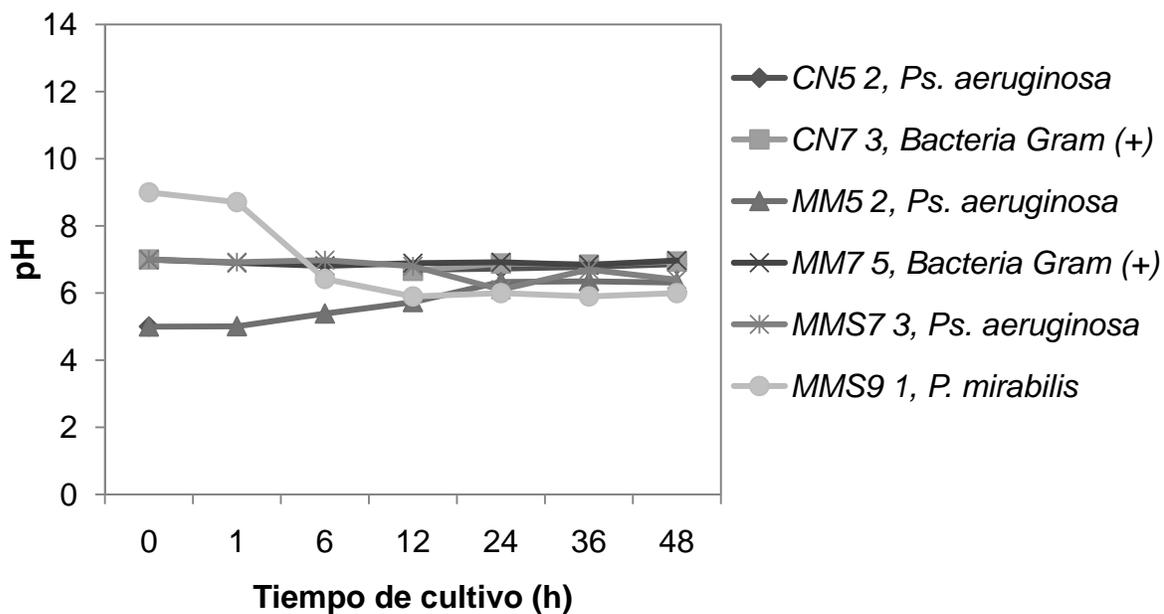


Figura 11. Cinética de pH en las fermentaciones de los microorganismos seleccionados.

8.4. Estandarización del ensayo de *para*-Nitrofenil Palmitato para cuantificar actividad lipolítica.

El *p*NPP es un sustrato conocido para la actividad de hidrólisis de lipasas y el *p*NP se obtiene a partir de la reacción de esterificación del *p*NPP con etanol, obteniéndose el mismo número de moles tanto de palmitato de etilo como de *p*NP como se muestra en la Figura 12. De esta manera se obtiene indirectamente la producción de palmitato de etilo.

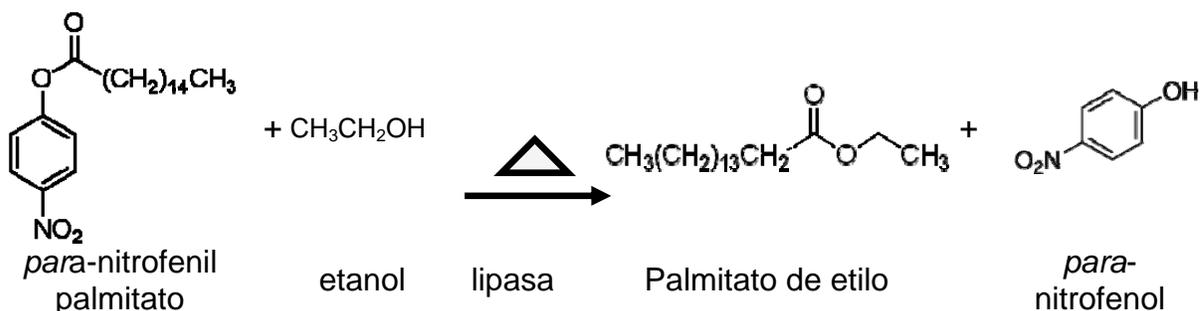


Figura 12. Reacción de ensayo de *para*-Nitrofenil Palmitato.

Primeramente se hizo un barrido en el espectrofotómetro de luz ultravioleta y luz visible (UV/Vis) en el rango de longitud de onda de 190 a 900 nm para observar el máximo de absorción del *p*NP, éste se presentó en la longitud de onda de 400 nm. Entonces éste valor se utilizó en las mediciones posteriores. Se hicieron soluciones en un intervalo de concentración de 0 a 250 μ moles de *p*NP para obtener un curva de respuesta entre la absorbancia y la concentración (Figura 13) y la ecuación de ajuste presentada en la misma figura con un coeficiente de correlación de 0.999. Para cada una de las muestras de reacción el espectro se obtuvo en un rango de longitud de onda de 190 a 900 nm, esto para poder hacer las correcciones pertinentes debido a que el espectro pudiese estar desplazado debido a las variaciones dadas por el propio equipo teniéndose que alinear a la línea base tomando de referencia un punto que este afectado por este tipo de error. La línea base se obtuvo con la misma reacción llevada a cabo sin utilizar ningún extracto enzimático.

Este ensayo se llevo a cabo con los diferentes extractos enzimáticos, tal como Teng y Xu en 2007 lo describe utilizando: 0.5 ml de solución de *p*NPP 10 mM en *n*-heptano al cual se le adicionan 30 μ l de solución de etanol 1 M en *n*-heptano para iniciar la reacción, de donde se toman muestras de 25 μ l para adicionarlas a una solución de NaOH 0.1 M y posteriormente sean medidas por espectroscopia de UV/Vis a una longitud de onda de 400 nm. Pero se observó una falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos, debido a que: la muestra de reacción está formada de dos fases (una fase orgánica y otra acuosa) que corresponden a la muestra de reacción en *n*-heptano y a la solución de NaOH 0.1 M respectivamente.



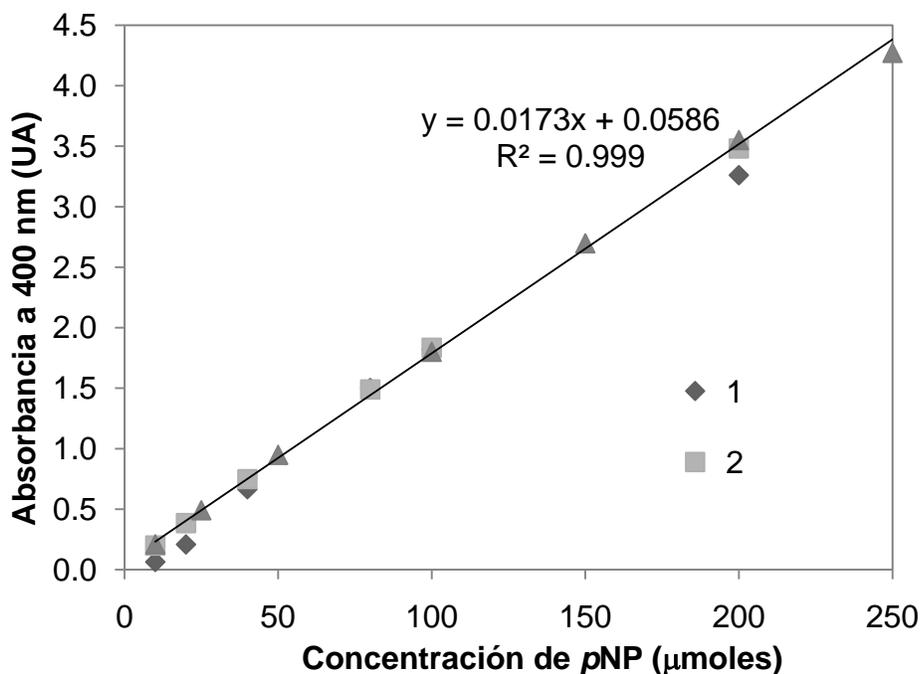


Figura 13. Curva de ajuste de datos de absorbancia a 400 nm contra concentración de *para*-Nitrofenol.

Al realizar los ensayos nos percatamos de que si esta muestra no es manejada adecuadamente para su análisis, existen errores (Figura 14) debido a la mezcla de fases en la celda, por lo cual una recomendación es: tomar la muestra con mucho cuidado y ser pasada del tubo que la contenga a la celda por medio de una micropipeta tomando solamente la fase acuosa que es en donde el pNP es liberado. En el caso de las CS utilizadas como extractos enzimáticos, las células también pudieron causar errores junto con las proteínas contenidas en ellas ya que son detectables por espectroscopia con UV/Vis en el rango de 200 a 300 nm (Bradford 1976), con lo que la absorbancia a la longitud de onda de 400 nm se ve afectada por estos errores.

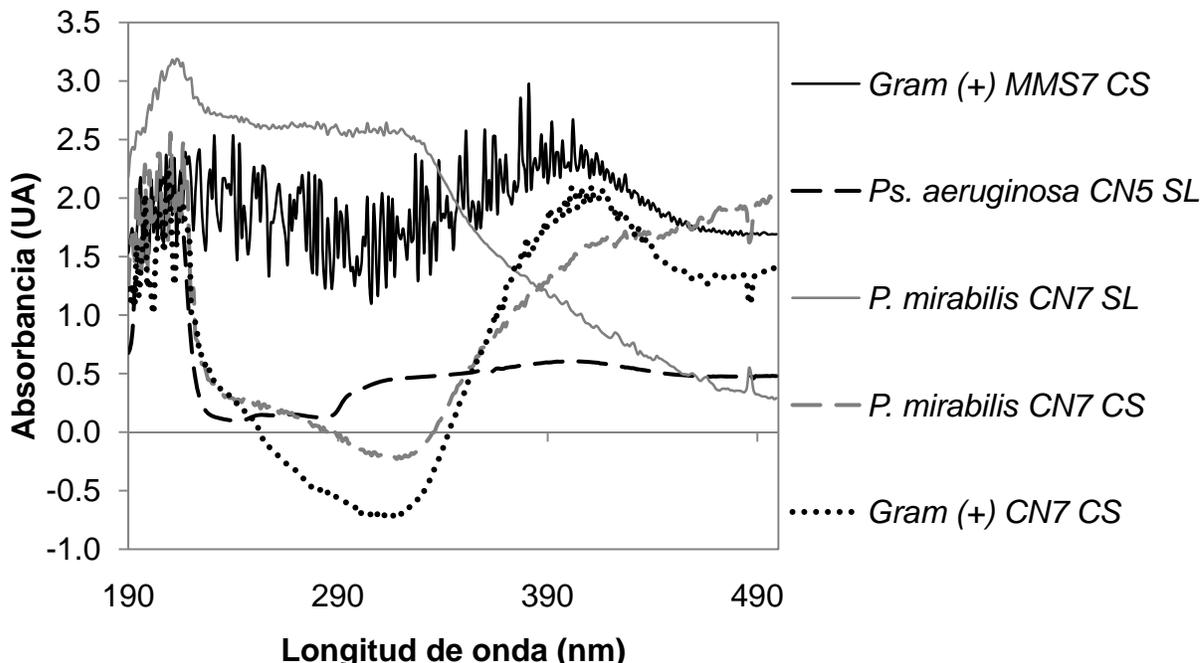


Figura 14. Espectros de absorción UV/Vis con errores obtenidos a partir de muestras de reacción.

Con estos resultados se determinó evaluar algunos parámetros de la técnica para poder obtener datos ciertos y reproducibles. Estos parámetros fueron: la concentración de solución de NaOH a la cual se adiciona la muestra de reacción, la agitación de la mezcla de reacción, la toma de muestra para ser analizada, agitación de muestras de reacción y tiempo de medición después de tomadas las muestras para asegurar que en ese tiempo el *p*NP producido en la reacción sea liberado en la fase alcalina.

El ensayo se realizó con CS de MM7, de un tiempo de cultivo de 12 h y las reacciones se realizaron con etanol. Se tomaron 9 muestras de reacción a distintos tiempos. Se realizó un barrido de cada una de las muestras de donde solamente se tomó el valor de absorbancia a 400 nm. Se midieron las muestras inmediatamente después de ser obtenidas, y posteriormente se volvieron a medir entre las 3 y 4 h, en la Figura 15, se puede observar un incremento de hasta un 53.55% en el tiempo de 30 min de reacción con etanol. Esto nos indica que la liberación del *p*NP, no se lleva inmediatamente al añadir la muestra de reacción a la solución de NaOH 0.1M, por lo que se tuvo que realizar una cinética de medición después de tomadas las muestras.

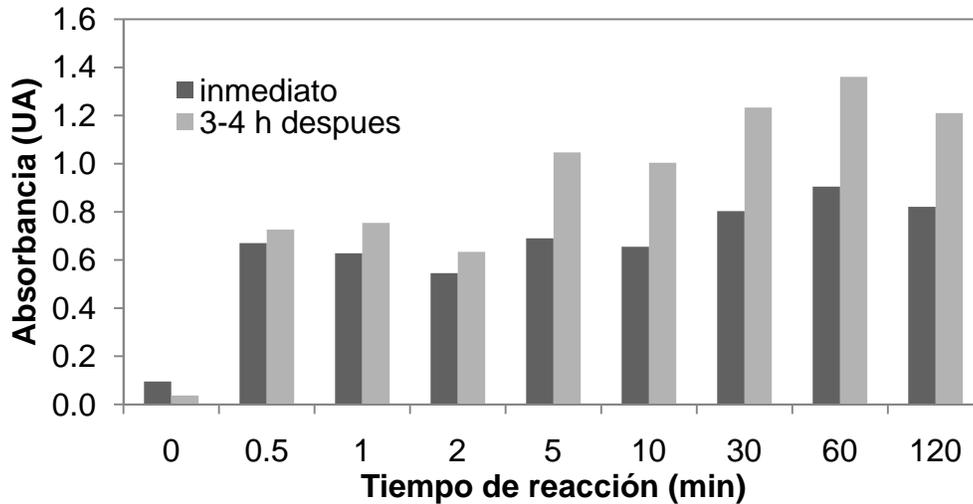


Figura 15. Ensayo de reacción con CS de MM7 de cultivo de 12 h con etanol, con su repetición de medición de muestras a las 3-4 h.

Con el ensayo anterior se observó que la concentración de pNP varía de acuerdo al tiempo en que es medida la muestra después de haber sido tomada, por lo que se realizó otro ensayo con metanol y CS de MMS7 de tiempo de cultivo de 12 h. La concentración de NaOH usada fue de 0.1 M, pero como podemos ver en la Figura 16 mientras más tiempo se dejó en reposo a la muestra para su posterior medición los valores de absorbancia aumentaron. Sin embargo estos valores tienden a estabilizarse después de un tiempo. Este ensayo se hizo con el objetivo de definir los tiempos de reacción en los que se tomarán muestras utilizando solución de NaOH 0.1 M. Se observó que los tres tiempos finales: 618, 725 y 1650 min no mostraron una gran variación.

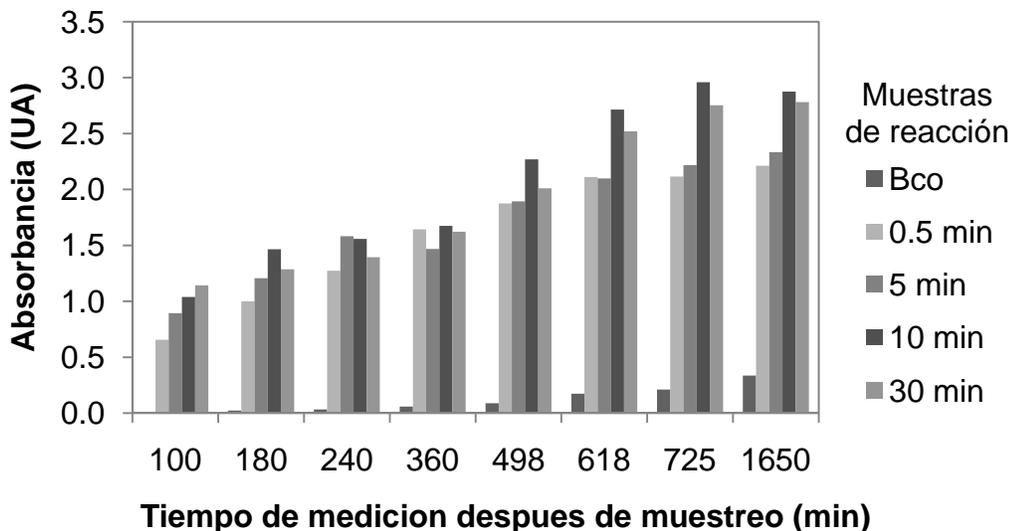


Figura 16. Ensayo de reacción con enzima y concentración de NaOH de 0.1 M, 4 muestras de reacción de 0.5, 5, 10 y 30 min y diferentes tiempos de medición después de tomada la muestra.

Con el fin de no tener que esperar de 10 a 12 h después de haber tomado la muestra de reacción, se varió la concentración de NaOH para reducir el tiempo de medición de la muestra y ver si su concentración tenía algún efecto en la velocidad de liberar el pNP producido en la reacción. En el ensayo de la Figura 17, con tres diferentes concentraciones de NaOH, se tomaron a tres tiempos las muestras de la reacción con metanol y CS de MM7 de tiempo de cultivo de 12 h. En el caso de las Figuras 18 y 19, se realizaron con seis concentraciones de NaOH. En el ensayo de la Figura 18 se preparó la reacción con metanol y CS de la cepa MM7 de tiempo de cultivo de 12 h y en el de la Figura 19 el ensayo se realizó con metanol y enzima de CS de MMS7 de cultivo de 12 hrs. Las mediciones de las muestras de reacción se realizaron después de distintos tiempos. En el ensayo mostrado en la Figura 17 se hicieron las mediciones: inmediatamente terminado el muestreo, una hora después y 23 horas después. En ensayo de la Figura 18 se pueden ver los resultados obtenidos de los blancos (mezcla de reacción) y muestras tomadas a dos tiempos de reacción. Estas muestras también fueron medidas en dos diferentes tiempos después de haber sido tomada de la muestra de reacción: a 1 y 72 h. Finalmente en el ensayo de la Figura 19 se tomaron tres tiempos de reacción y se hicieron mediciones a dos tiempos: 40 y 205 min.

En la Figura 20 se observan algunos espectros de muestras de reacción con 5 concentraciones distintas de NaOH. Con la concentración de 1.5 M se puede ver que alrededor de 400 nm la capacidad del espectro no alcanza para obtener un pico bien definido y sin error, si vemos el de concentración de 1 M y lo comparamos con el de 0.5 M medidos al mismo tiempo después de tomar la muestra, son valores muy similares. Finalmente si vemos el indicado en la técnica validada por (Teng y Xu 2007) de 0.1 M medida al mismo tiempo que los dos anteriores, el pico tiene un valor aproximado de 60 por ciento menor a los comentados anteriormente.

Por otro lado, el alcohol utilizado para estos ensayos fue el metanol en lugar del etanol propuesto por (Teng y Xu 2007), debido al interés por éste alcohol para ser usado en la producción de biodiesel, aunque el etanol también es demandado para este fin. Por esta razón se determinó evaluar realizando la reacción con metanol, etanol y sin alcohol, con lo que se podrá apreciar la capacidad que éstas enzimas tienen de transesterificar e hidrolizar al pNPP.

Todos estos experimentos se realizaron para que al final se correlacionaran los datos obtenidos y así poder fijar los parámetros del ensayo de pNPP.



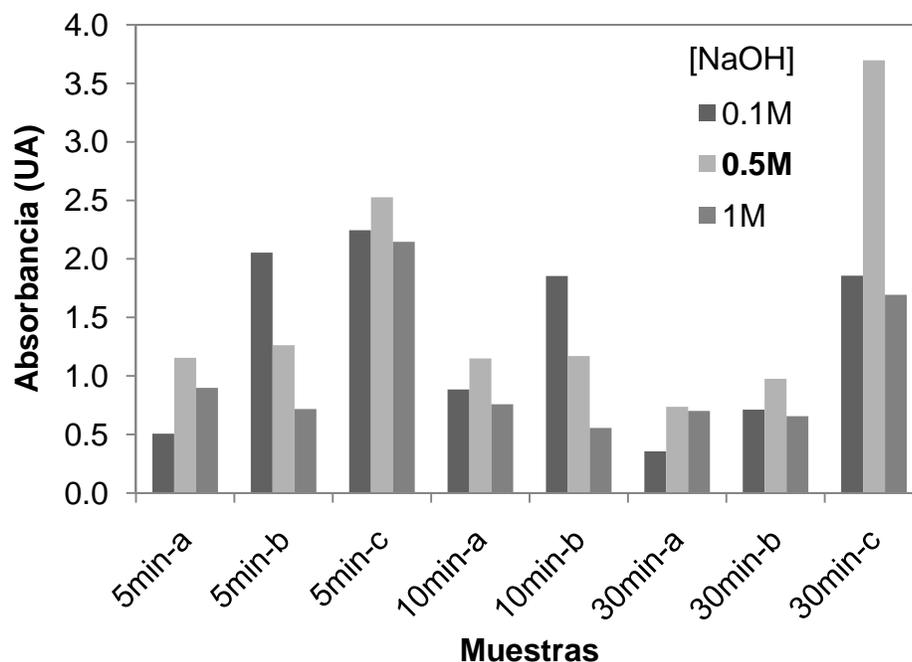


Figura 17. Ensayo de reacción variando la concentración de NaOH y tiempos de medición después de tomada la muestra. (a) medición inmediata; (b) 1 h después; (c) 23 h después.

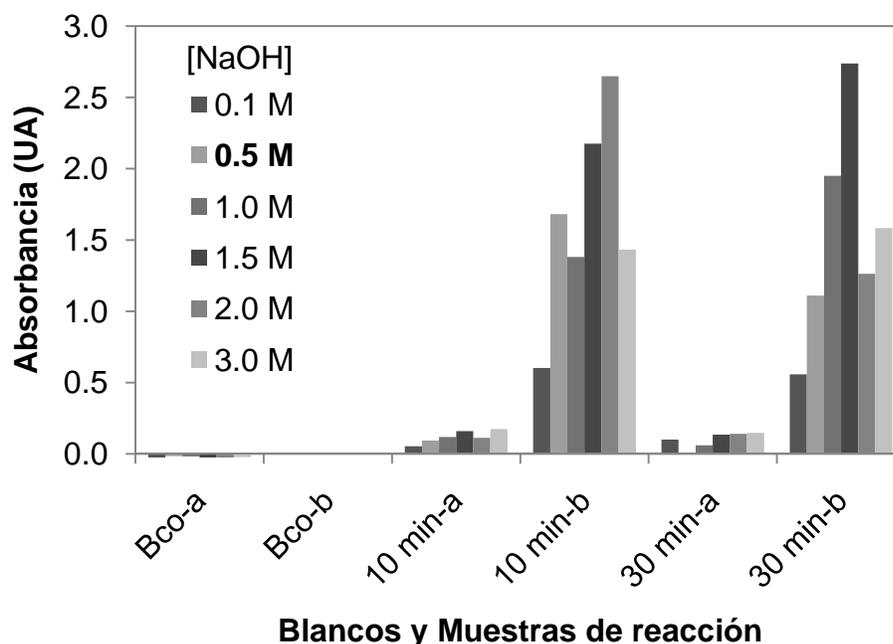


Figura 18. Ensayo de mezcla de reacción (blanco) y reacción con CS de MM7 de cultivo de 12 h y metanol, con diferentes concentraciones de NaOH. Dos muestras de reacción de 10 y 30 min. Dos tiempos de medición después de tomada la muestra. (a) 1 h después; (b) 72 h después.

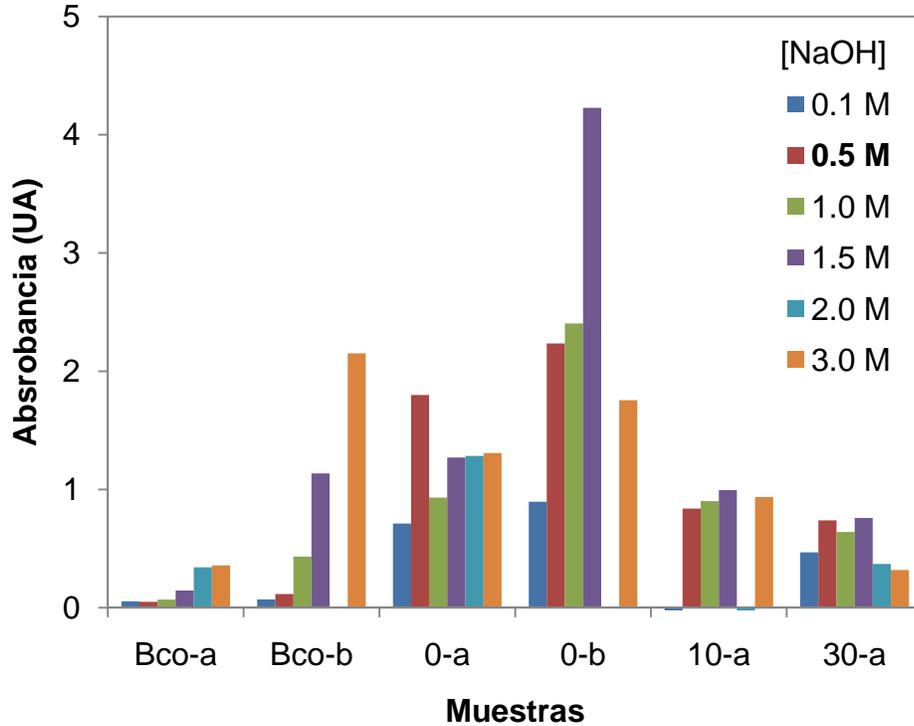


Figura 19. Ensayo de reacción con enzima, diferentes concentraciones de NaOH y dos distintos tiempos de medición después de muestreo: (a) 40 min; (b) 205 min.

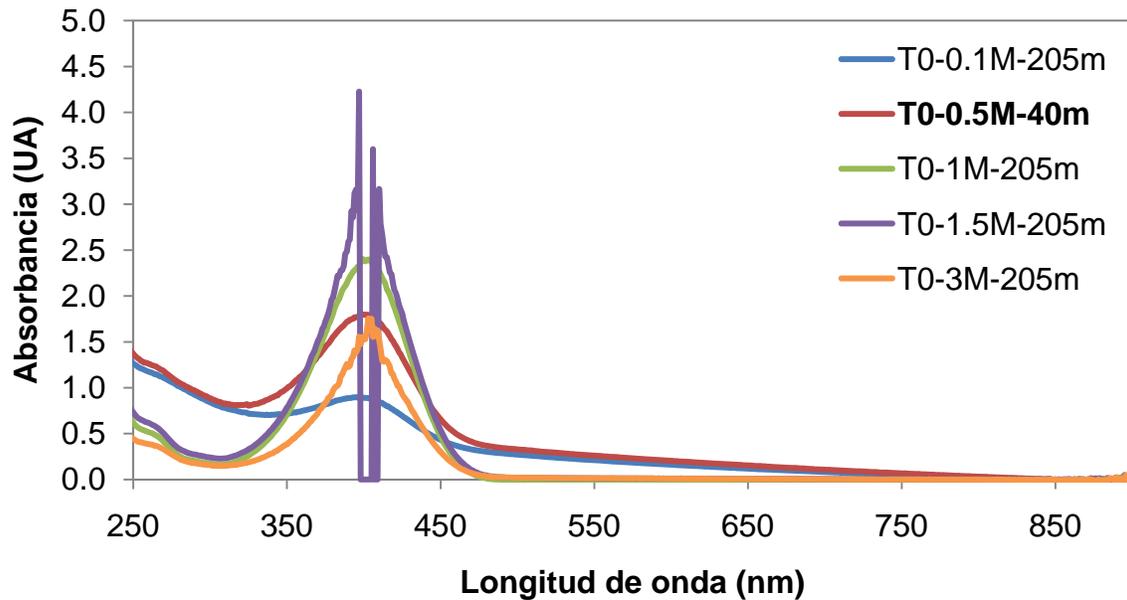


Figura 20. Espectros de muestras de reacción en diferentes concentraciones de NaOH y tiempos de medición después de tomada la muestra.

Finalmente para la estandarización de este ensayo se definieron los siguientes parámetros:

- Dos tiempos de muestreo de reacción: 0.5 y 10 min;
- Una concentración de la solución de NaOH de 0.5 M.
- Al momento de muestreo, agitar la mezcla de reacción por 10 segundos y después dejar reposar 1 min, para después tomar las muestras.
- A la muestra de reacción añadida a la solución de NaOH, se le agita por 10 segundos y se deja reposar para hacer las mediciones después de 205 min.

Y por resultados obtenidos anteriormente, otros parámetros quedaron definidos como:

- La cantidad de los extractos enzimáticos a utilizar serían: 10 mg y 20 mg de CS y SL, respectivamente.
- Las reacciones se realizarán con metanol, etanol y sin alcohol.

8.5. Cuantificación de actividad lipolítica con el ensayo de *p*NPP de microorganismos seleccionados.

Una vez estandarizado el método del *p*NPP es importante dejar claro que con éste ensayo la producción de *p*NP o porcentaje conversión de *p*NPP a *p*NP nos está indicando de manera indirecta la producción del éster palmitato de alquilo (metilo o etilo) en la misma proporción al *p*NP obtenido, cuantificándose de esta manera la capacidad lipolítica de los extractos enzimáticos evaluados. De acuerdo a la información de la Tabla 17 previamente citada, los microorganismos evaluados fueron: tres *Pseudomonas aeruginosa*, cultivados de CN5, MM5 y MMS7; una *Proteus mirabilis* de MMS9 y dos cepas identificadas hasta ahora como Gram (+) de CN7 y MM7, a partir de los cuales se obtuvieron CS y SL como extractos enzimáticos. Tal como se mencionó en materiales y métodos, la actividad se presenta en términos de porcentaje de conversión, esto en base a los 230 μ moles de *p*NP contenidos en la muestra de reacción y que representan un 100% de conversión en la reacción.

8.5.1. Actividad de lipasas para *Pseudomonas aeruginosa*, CN5, MM5 y MMS7.

Se seleccionaron y aislaron tres cepas cultivadas en tres distintos medios de cultivo: CN a pH 5, MM a pH 5, y MMS a pH 7 a partir del mismo inóculo (123) y que fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de actividad por medio del ensayo de *p*NPP. Es importante resaltar a los microorganismos que producen lipasas aislados a pH 5 porque la mayoría provienen de un pH alcalino.



***Pseudomonas aeruginosa* en CN5.**

En la Figura 21 se observa que las CS presentan mayor actividad que los SL, cuya actividad es casi nula. El perfil de actividad de CS de los distintos tiempos de cultivo fue diferente dependiendo del alcohol utilizado. En las reacciones sin alcohol el perfil de actividad fue distinto a comparación de los obtenidos con metanol y con etanol, se observó la mayor producción de pNP de este microorganismo con las CS de 36 h. En las reacciones con etanol las CS con mayor actividad fueron de los cultivos de 24 y 36 h. En las reacciones con metanol la actividad con las CS del cultivo de 12 h fue mayor y fue disminuyendo conforme el cultivo fuese de mayor tiempo. El SL de 36 h mostró actividad en los tres ensayos. Con esto concluimos que este microorganismo tiene mayor capacidad de hidrolizar el pNPP. Las muestras tomadas a los 0.5 y 10 min tienen la misma tendencia entre ellas en los ensayos con metanol y sin alcohol a diferencia del realizado con etanol.

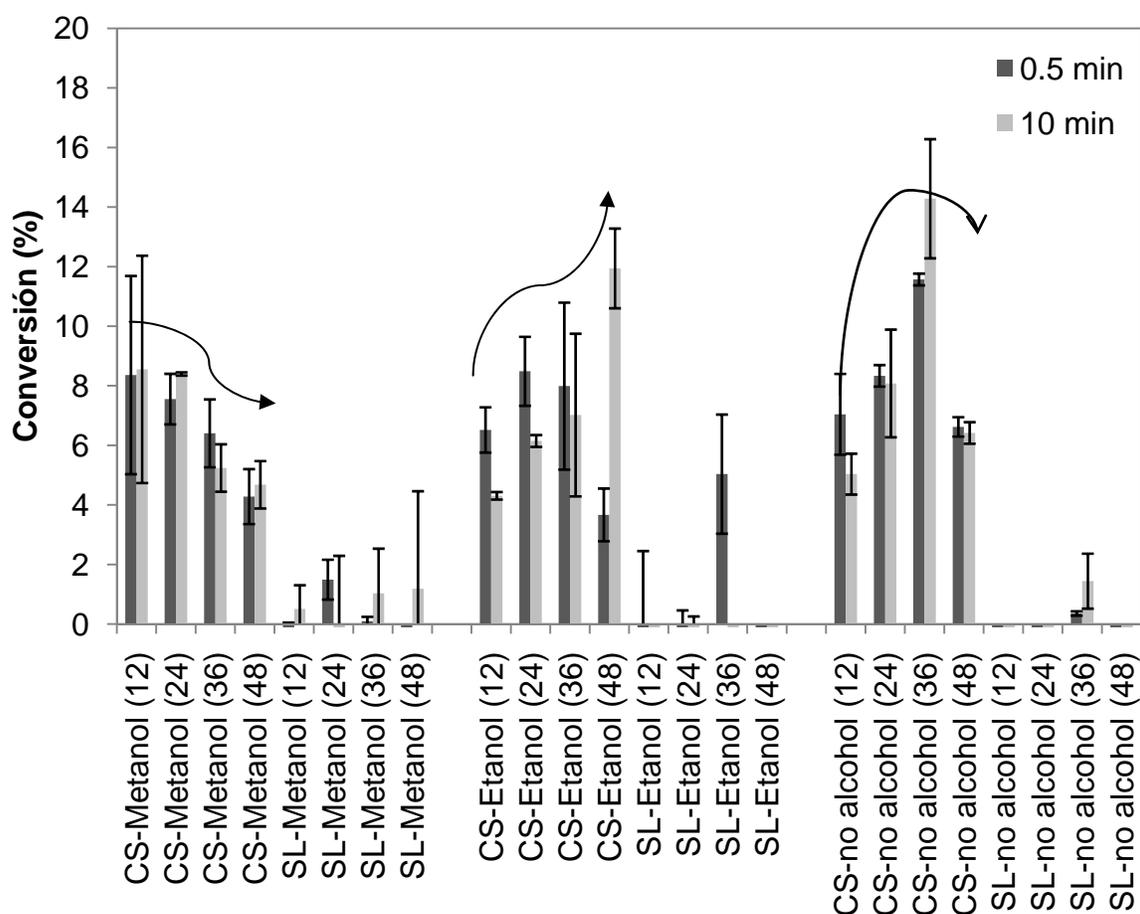


Figura 21. Cuantificación de actividad *Ps. aeruginosa* en CN5.

***Pseudomonas aeruginosa* en MM5.**

En la Figura 22 el perfil de actividad de las CS de esta cepa dependió del alcohol utilizado. Los perfiles obtenidos en los ensayos con etanol y sin alcohol se



asemejan a los de la cepa CN5 anteriormente descrita. Las CS mostraron una actividad relevante, mientras que sus SL una actividad muy baja. Con metanol el mayor porcentaje de conversión de los extractos de esta cepa se obtuvo con CS de 24 h y el menor con las del cultivo de 12 h. Con SL el valor mayor fue con 36 h. En las reacciones con etanol la mayor actividad fue con CS de 12 h a diferencia del realizado con metanol, obteniéndose la mayor producción de *p*NP de 29.85%. En las reacciones sin alcohol se puede ver una tendencia similar a la de las reacciones con etanol pero en menor proporción. La misma cepa cultivada en distinto medio dió mayores porcentajes de conversión utilizando MM a comparación de haber utilizado CN. Los cultivos de tiempos de 12 y 24 h dieron el mayor porcentaje de conversión.

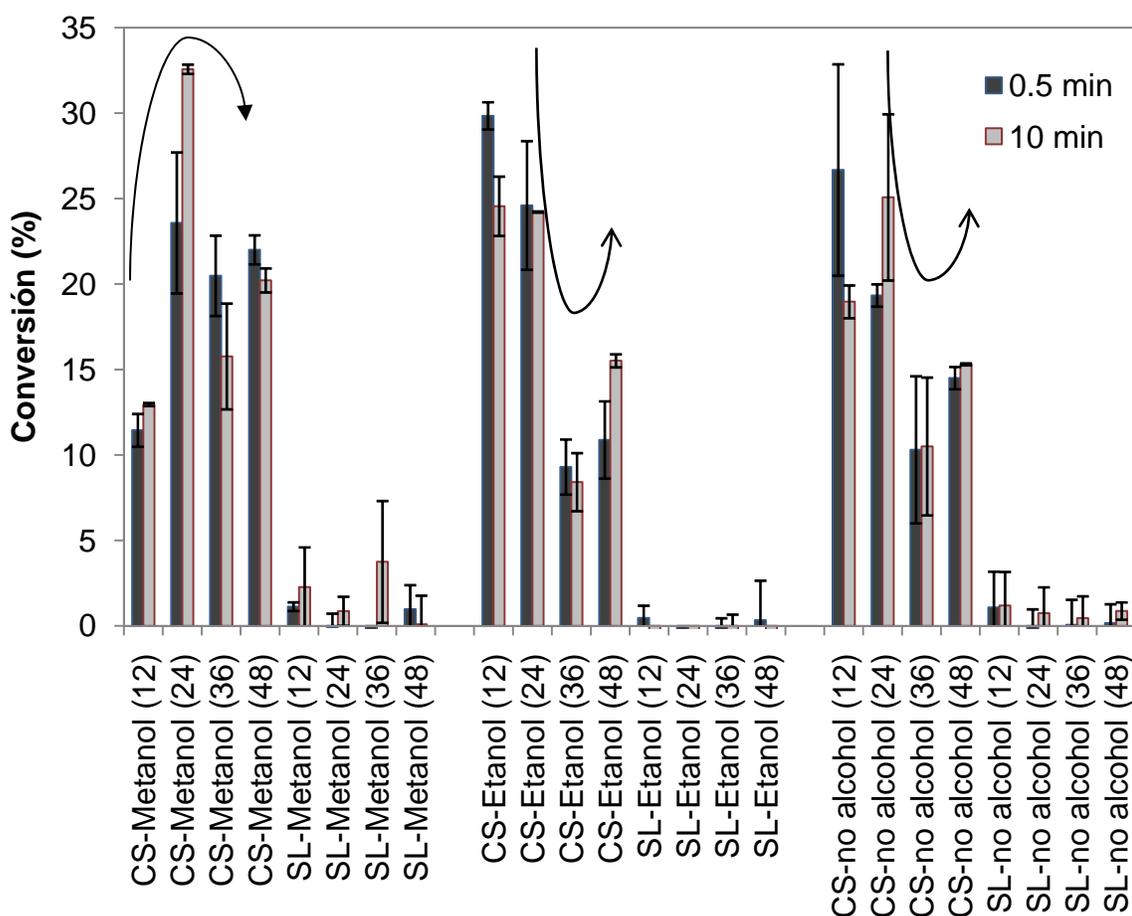


Figura 22. Cuantificación de actividad *Ps. aeruginosa* en MM5.

Pseudomonas aeruginosa en MMS7.

En la Figura 23 se puede observar que el perfil de actividad de las CS también fue diferente dependiendo del alcohol utilizado, los perfiles obtenidos con metanol y sin alcohol se asemejan a los de las cepas anteriormente descritas, en general las CS mostraron una actividad relevante y sus SL una actividad muy baja. Aunque se mostró actividad con SL de 24 h tanto con metanol, etanol y sin alcohol. Con etanol la mayor conversión fue de 59.7% con CS de 24 h y con metanol la

mayor conversión fue de 40.1% con CS de 36 h. En las reacciones sin alcohol, el mayor porcentaje de conversión, fue con CS de 36 h con 34.2% de conversión. Solo con SL de 24 h y con etanol se obtuvo una producción de pNP destacable.

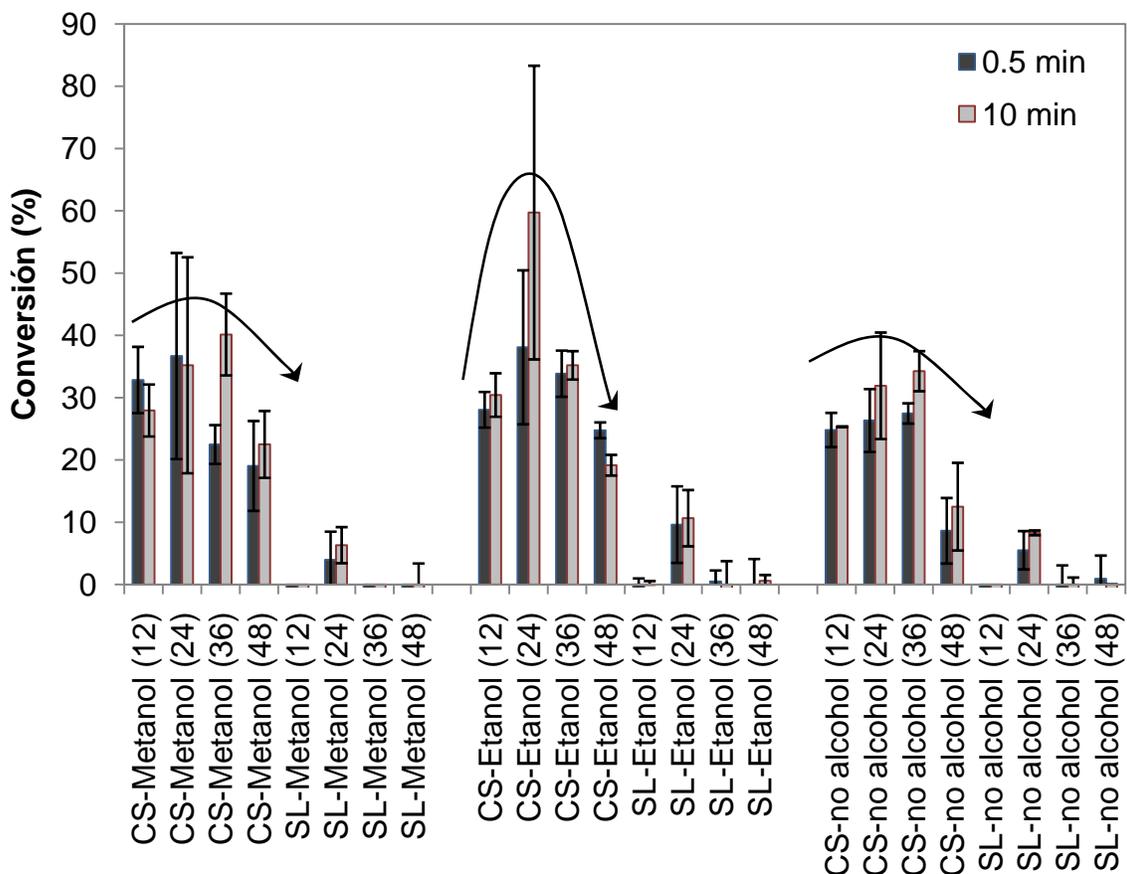


Figura 23. Cuantificación de actividad de *Ps. aeruginosa* en MMS7.

En resumen, los valores de actividad con la *Ps. aeruginosa* cultivada en los tres distintos medios: CN5, MM5 y MMS7 se presentan en la Figura 24. Aunque ningún SL presentó actividad relevante podríamos pensar que las enzimas se encuentran en una concentración pequeña a comparación de las CS ya que estas mostraron una diferencia de actividad importante. Puntualizando, con metanol y CS de 24 h con MM5 se obtuvo una producción de pNP 280% mayor que con el mismo extracto obtenido de CN5, pero del obtenido de MMS7 se presentó un porcentaje de conversión 3.2 mayor que el obtenido con CN5 y 8% mayor que con el de MM5. En donde se obtuvo el mejor porcentaje de 59.72% fue con etanol y CS de 24 h de MMS7 y de 40.14% con metanol y CS de 36 h. Con lo que podemos ver que aunque se trate del mismo microorganismo, al ser cultivado en diferentes medios y condiciones de pH nos da un valor distinto de porcentaje de conversión con CS, siendo el medio de cultivo un factor importante para la producción de lipasas.

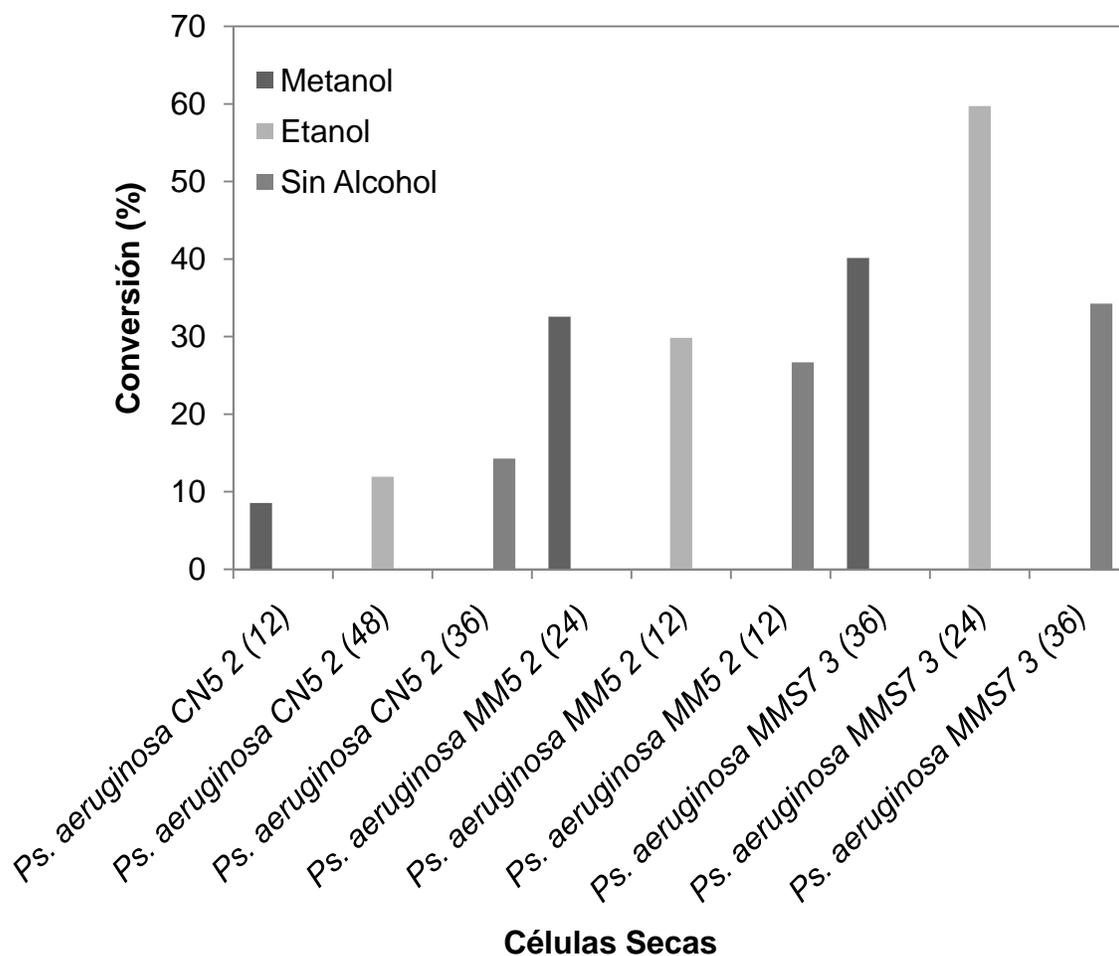


Figura 24. Cuantificación de actividad *Ps. aeruginosa* obtenidas en distintos medios de cultivo y condiciones de pH.

Según la literatura (Vakhlu y Kour 2006, Gupta et al. 2004, Sharma et al. 2001, Chi et al. 2009) las lipasas extracelulares son las más abundantes y las que mejor actividad tienen. Se observó que dependiendo de las condiciones de pH del medio de cultivo de donde se obtengan las *Pseudomonas aeruginosa*, es la actividad que presenten sus lipasas. Los SL no mostraron actividad relevante como lo dicen Ruchi et al. en 2008), a comparación de las CS que resultaron ser más activas y por lo tanto una opción potencialmente importante para la producción de biodiesel y otras aplicaciones (Fukuda et al. 2001). Las condiciones de cultivo de ésta cepa según Dharmstithi y Kuhasuntisul en 1998 son: pH 7, 48 h y 17 h según Stuer et al. en 1986. En algunos resultados obtenidos con la *Pseudomonas aeruginosa*, se observó una actividad menor al utilizar metanol, lo cual puede ser por la inhibición que este alcohol puede causar a las enzimas (Fjerbaek et al. 2009, Kaieda et al. 2001, Ranganathan et al. 2008) y que para la aplicación de producción del biodiesel, se requerirán de otros estudios y métodos para poder utilizar este alcohol como una opción (Yang et al. 2009).

8.5.2. Actividad de lipasas para bacterias Gram (+), CN7 y MM7.

Dos microorganismos seleccionados y aislados fueron identificados como bacterias Gram (+). Estas cepas se obtuvieron de dos medios de cultivo distintos: CN7 y MM7 y las muestras de suelo de donde provinieron fueron: la muestra 2 (Drenaje) y 3 (Taller mecánico) respectivamente.

Bacteria Gram (+) en CN7.

En la Figura 25, se puede observar una mayor producción de *pNP* al utilizar las CS, aunque a diferencia de *Pseudomonas aeruginosa* los SL de éste microorganismo si presentan actividad. Los perfiles de actividad tanto de CS como de SL son similares, mostrándose una mayor actividad conforme aumenta el tiempo de cultivo. En las reacciones sin alcohol se observó una mayor conversión a *pNP* de 26.4% con CS de 48 h, en comparación con las obtenidas con etanol de 22.6%. Con los SL éste microorganismo tiene una conversión de menor proporción en comparación con sus CS pero con la misma tendencia en los diferentes tiempos de cultivo.

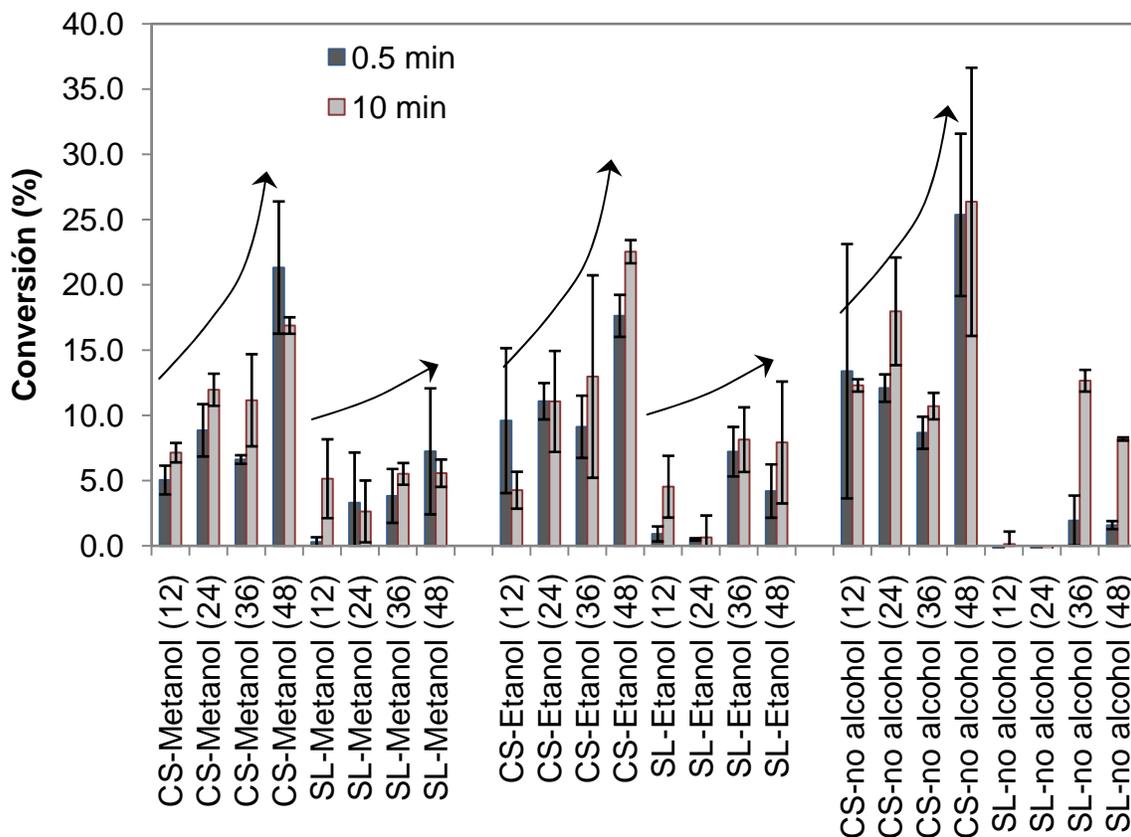


Figura 25. Cuantificación de actividad de bacteria Gram (+) en CN7.

Bacteria Gram (+) en MM7.

En la Figura 26 se observa que la mayor actividad se presentó con las CS, la tendencia de actividad con metanol y etanol es similar siendo las actividades mayores de las CS de 24 h y para la reacción sin alcohol de CS de 36 h. Para los SL se presentó actividad en los ensayos realizados con metanol y sin alcohol resaltando los cultivos de 48 h.

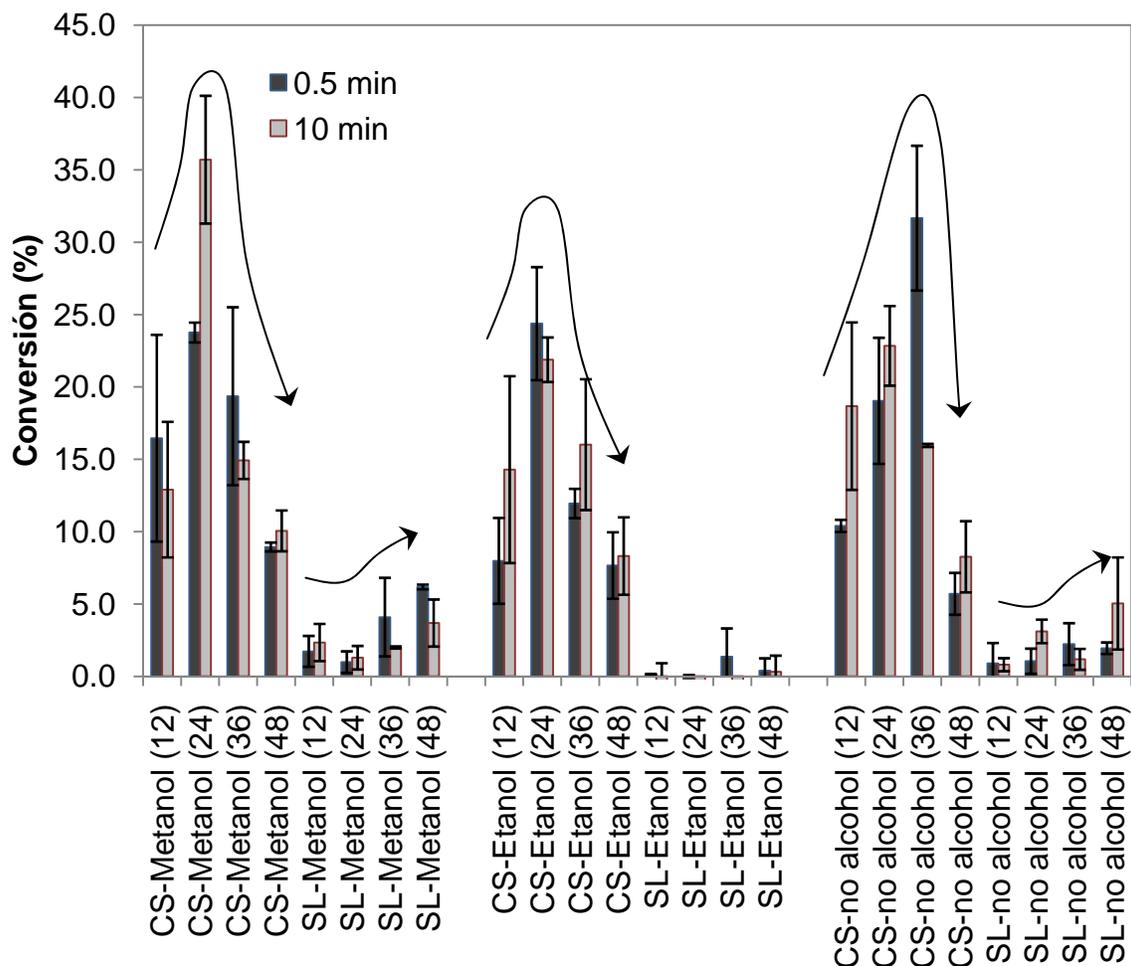


Figura 26. Cuantificación de actividad de bacteria Gram (+) en MM7.

En base a los resultados obtenidos con las dos bacterias identificadas como Gram (+), podemos ver que hay producción tanto de lipasas extracelulares como intracelulares, teniendo mayor actividad éstas últimas. Al ver sus perfiles de actividad podríamos pensar que se trata de dos microorganismos distintos, tomando en cuenta que fueron aislados de dos suelos distintos y que las mayores actividades se obtuvieron con los cultivos de CN7 a 48 y 36 h; y con MM7 a 24 y 36 h. Podemos suponer que en la bacteria Gram (+) de MM7 no hay inhibición por parte del metanol pues con éste se obtuvo un porcentaje de conversión mayor.

8.5.3. Actividad de lipasas para la cepa *P. mirabilis* en MMS9.

Dos microorganismos cultivados en MMS9 fueron identificados como *Proteus mirabilis* y la muestra de suelo a partir de la cual fueron aislados fue la 1 (baño público). Se seleccionó una en base a la evaluación cualitativa.

***Proteus mirabilis* en MMS9.**

Esta cepa fue identificada como *Proteus mirabilis* y fue una de las dos únicas cepas aisladas a pH 9. Aunque en el ensayo cualitativo no mostró gran actividad se seleccionó para ser evaluada ya que según la literatura la mayoría de las lipasas se producen en condiciones alcalinas (Gupta et al. 2004, Sharma et al. 2001, Chi et al. 2009). En la Figura 27 se observan las tendencias de actividad, distintas entre los ensayos con metanol, etanol y sin alcohol. Con metanol se obtuvo un porcentaje de conversión mayor con las CS de 48 h y con SL de 36 h con un 11.87% y 12.39% respectivamente. Con el etanol la mayor conversión se obtuvo con las CS de 12 h y con los SL se observó que el mayor porcentaje de conversión fue con el cultivo de 12 h. En las reacciones sin alcohol se obtuvo una actividad comparable entre CS y SL pero con CS de 36 h y SL de 36 h se obtuvieron los mayores porcentajes de conversión. Por lo que éste microorganismo si tiene producción de lipasas extracelulares al ser comparables con las intracelulares que se evaluaron con los SL y CS respectivamente.

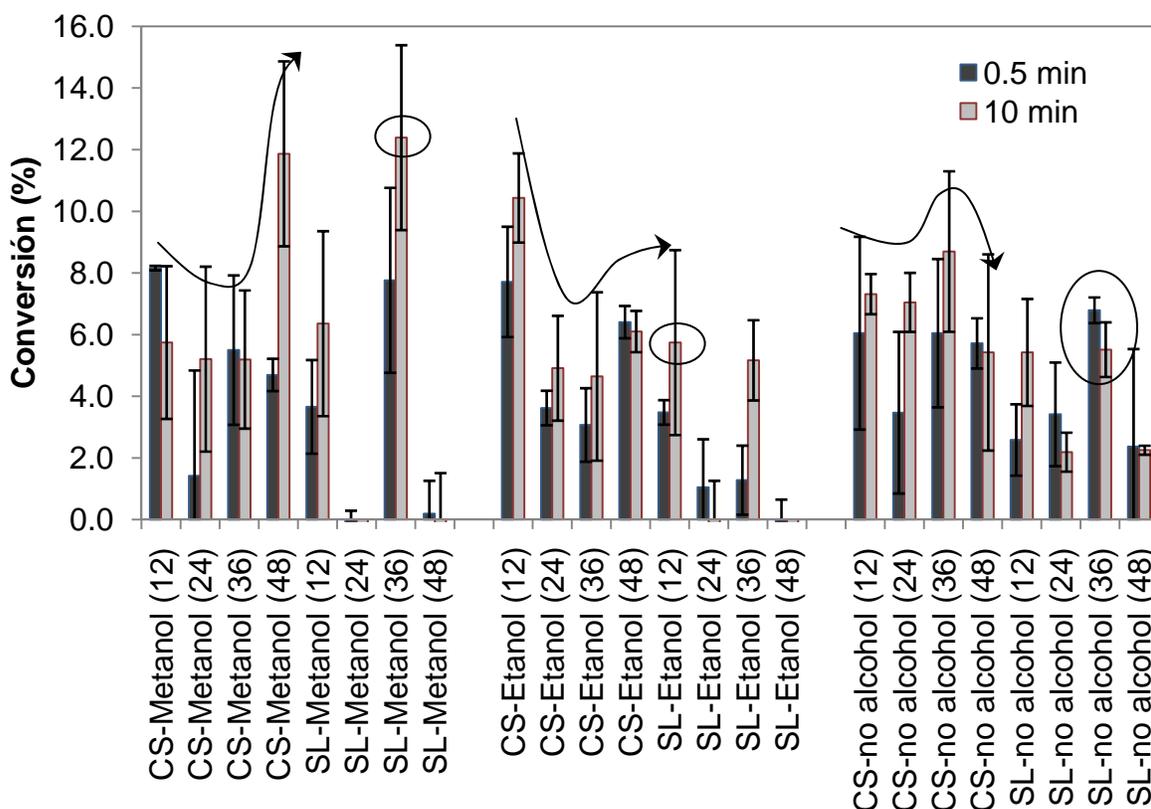


Figura 27. Cuantificación de actividad de *P. mirabilis* en MMS9.



Para concluir con la parte de evaluación cuantitativa de actividad lipolítica por medio del ensayo con *p*NPP, hay que considerar que la reacción catalizada en medio orgánico (esterificación o transesterificación) es diferente de la realizada en un medio acuoso (hidrólisis), además de considerar otros factores que rigen la actividad de las lipasas en medio orgánico como: el contenido de agua, agitación, temperatura, concentración del sustrato y tiempo de reacción (Pencreac'h y Baratti 1996), de los cuales para realizar los ensayos con los extractos enzimáticos se modificaron algunos de estos parámetros, para poder obtener valores reproducibles y rápidos por medio de este método (Pencreac'h y Baratti 1996). En resumen se muestran los valores máximos de actividad representada como porcentajes de conversión de *p*NPP a *p*NP de CS y SL en las Figuras 28 y 29 y Tablas 18 y 19 respectivamente reaccionando con metanol, etanol o sin alcohol, donde también se indican el tiempo de cultivo a partir del cual se obtuvieron los extractos enzimáticos. En la Figura 28 y Tabla 18, podemos ver que el microorganismo con el cual se obtuvo la mayor actividad fue con etanol utilizando CS de 24 h de *Pseudomonas aeruginosa* de MMS7 y con metanol pero con CS de 36 h. En la Figura 29 y Tabla 19 observamos la mayor actividad con SL con la bacteria Gram (+) de CN7 de 36 h y sin alcohol. Siguiéndole *Proteus mirabilis* de 36 h de MMS9 y con metanol.



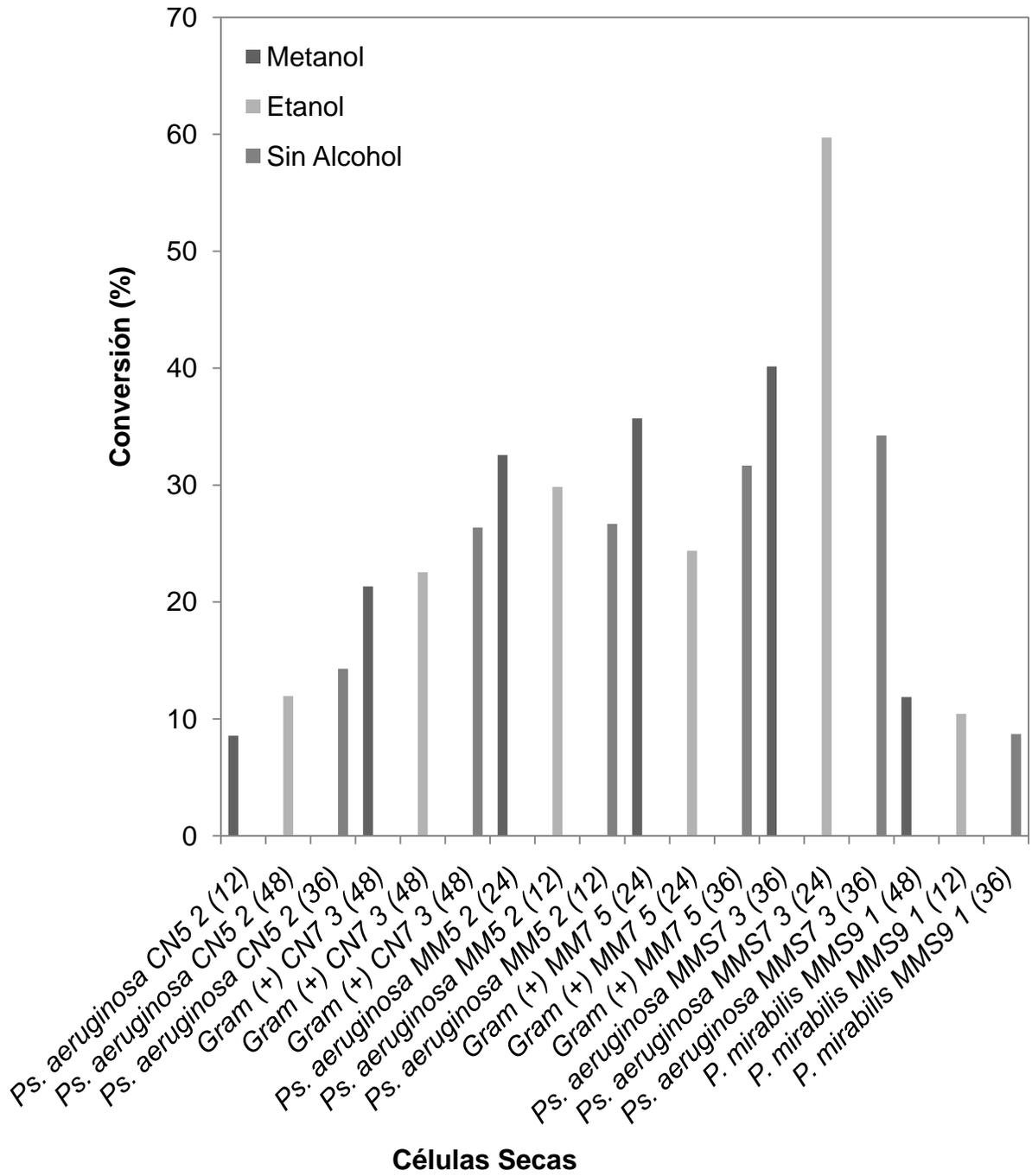


Figura 28. Comparación de actividad máxima de lipasas a partir de CS.

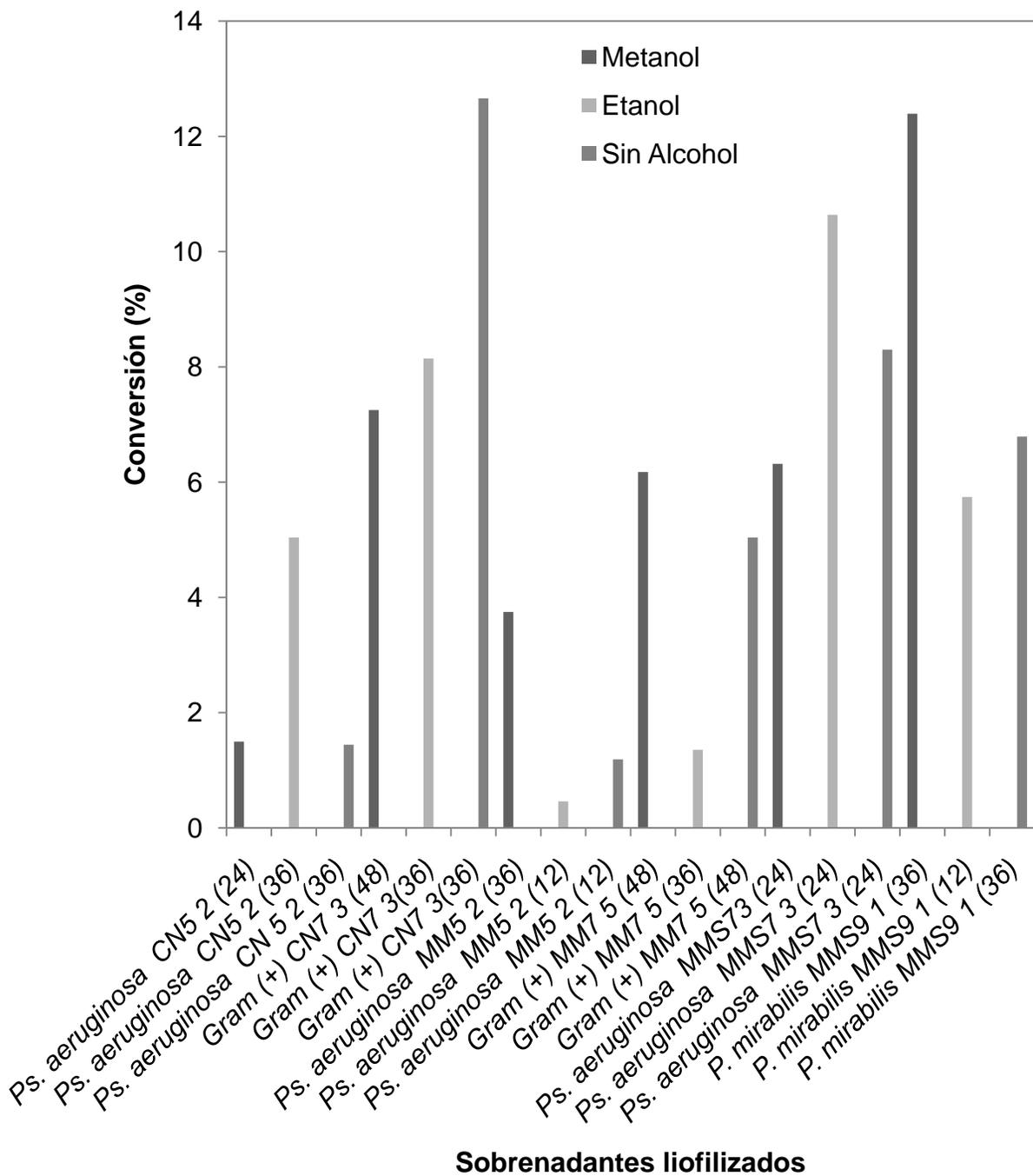


Figura 29. Comparación de actividad máxima de lipasas a partir de SL.

Tabla 18. Actividades máximas de CS de microorganismos seleccionados.

		Porcentaje de conversión de pNPP a pNP (%)											
		Metanol				Etanol				Sin alcohol			
Cepa	Cultivo	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
<i>Ps. aeruginosa</i>	CN5	8.6	-	-	-	-	-	-	11.9	-	-	14.3	-
	MM5	-	32.6	-	-	29.8	-	-	-	26.7	-	-	-
	MMS7	-	-	40.1	-	-	59.7	-	-	-	-	34.2	-
Gram (+)	CN7	-	-	-	21.3	-	-	-	22.5	-	-	-	26.4
	MM7	-	35.7	-	-	-	24.4	-	-	-	-	31.7	-
<i>P. mirabilis</i>	MMS9	-	-	-	11.9	10.4	-	-	-	-	-	8.7	-

Tabla 19. Actividades máximas de SL de microorganismos seleccionados.

		Porcentaje de conversión de pNPP a pNP (%)											
		Metanol				Etanol				Sin alcohol			
Cepa	Cultivo	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
<i>Ps. aeruginosa</i>	CN5	-	1.5	-	-	-	-	5.0	-	-	-	1.4	-
	MM5	-	-	3.7	-	0.5	-	-	-	1.2	-	-	-
	MMS7	-	6.3	-	-	-	10.6	-	-	-	8.3	-	-
Gram (+)	CN7	-	-	-	7.2	-	-	8.1	-	-	-	12.7	-
	MM7	-	-	-	6.2	-	-	1.4	-	-	-	-	5.0
<i>P. mirabilis</i>	MMS9	-	-	12.4	-	5.7	-	-	-	-	-	6.8	-

Considerando que las CS son las que tienen mayor actividad, solo se seleccionaron las CS más activas en base a los resultados obtenidos en la cuantificación de actividad lipolítica (Figura 28, Tabla 19), por lo que se hizo una selección de extractos enzimáticos, descritos en la Tabla 20 para evaluar la reacción de transesterificación con aceite de desecho y metanol.



Tabla 20. Extractos enzimáticos seleccionados.

Cepa seleccionada/ medio de cultivo	Tiempo de cultivo de extracto enzimático, CS (h).	
	Metanol	Etanol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / CN5 2	12	48
Bacteria Gram (+) / CN7 3	48	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / MM5 2	24	12
Bacteria Gram (+) / MM7 5	24	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / MMS7 3	36	24
<i>Proteus mirabilis</i> / MMS9 1	48	12

El pH de la reacción del ensayo de pNPP fue en promedio de 7.3. En los ensayos con metanol se obtuvo en promedio un pH de 7.0, con etanol fue de 7.5 y en el ensayo sin alcohol fue de 7.6. Esto era importante saberlo por los diferentes pH a los cuales fueron obtenidos los extractos y para descartar alguna interferencia en los resultados por este parámetro en las reacciones.

Hay que considerar que el ensayo de pNPP, puede realizarse en un medio acuoso u orgánico y los resultados de estas evaluaciones difieren por mucho (Pencreac'h y Baratti 1996, Lima et al. 2004). La mayoría de las lipasas son caracterizadas por medio del ensayo en medio acuoso, sin embargo la evaluación en medio orgánico nos da un parámetro de la capacidad de las enzimas de realizar también la reacción en este medio.

Los valores de actividad lipolítica reportados por (Teng y Xu 2007) con siete lipasas comerciales y células completas preparadas de *Rhizopus chinesis*, se muestran en la Tabla 21 que al ser comparados con los obtenidos en este trabajo (Tabla 20), podemos ver que los nuestros son similares pero hay que tomar en cuenta que en este trabajo, el ensayo de pNPP se realizó con extractos enzimáticos que no tuvieron un proceso de purificación y en donde la cantidad de lipasa está en mucho menor proporción a las lipasas comerciales con las que fueron realizados los ensayos de la Tabla 21. Con lo que podemos establecer que los resultados de la cuantificación de actividad lipolítica por medio del ensayo de pNPP en medio



orgánico son destacables y se comprobará al realizar la reacción de transesterificación.

Tabla 21. Datos de cuantificación de actividad obtenidos por Teng y Xu en 2007.

Microorganismo (lipasa)	Porcentaje de conversión (%)
<i>Candida antártica</i> (Novo435),	45
<i>Burkholderia</i> sp. (Amano PS-C),	75
<i>Penicillium</i> sp. (Amano G),	0
<i>Candida rugosa</i> (Amano AY),	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano AK),	43
<i>Candida rugosa</i> (lipasa tipo VII),	0
Páncreas porcinas (Tipo II)	0
<i>Rhizopus chinesis</i> (Células completas preparadas)	18

Condiciones de reacción: 0.5 ml de solución pNPP 10 mM en *n*-heptano, más 30 μ l de solución de etanol 1 M en *n*-heptano, incubada a 40°C y 200 rpm por 5 a 30 min, muestras de reacción de 25 μ l adicionadas a 1 ml de NaOH 0.1 M.

8.6. Reacciones de transesterificación.

Para evaluar la capacidad de transesterificación de los extractos enzimáticos seleccionados, primero se caracterizaron los sustratos y productos implicados en esta reacción y después se realizó la cinética de esta reacción.

8.6.1. Caracterización de sustratos y productos de la reacción de transesterificación.

Con la finalidad de identificar los picos correspondientes a cada uno de los estándares de metil ésteres se prepararon cuatro soluciones en hexano, cada una con 4 estándares (Tabla 22). En la Figura 30 se pueden observar los cromatogramas de los análisis de éstas soluciones y los tiempos en los cuales aparecen cada uno de los metil ésteres. Esta información es la base para identificar los productos generados en las reacciones de transesterificación.



Tabla 22. Soluciones de estándares de metil ésteres.

Solución de estándares	Abreviatura	Compuesto	No. Identificación en Figura 30
En A, B, C y D	-	Hexano	1
A	6:0	Hexanoato de metilo	2
	14:0	Miristato de metilo	3
	18:1 <i>cis</i>	<i>cis</i> -Vacenato de metilo	4
	22:1 n-9	Erucato de metilo	5
B	8:0	Octanoato de metilo	6
	16:1	Palmitoleato de metilo	7
	18:1	Elaidato de metilo	8
	20:0	Eicosenoato de metilo	9
C	10:0	Decanoato de metilo	10
	18:0	Octadecanoato de metilo	11
	18:2	Linolenato de metilo	12
	20:0	Araquidato de metilo	13
D	12:0	Laurato de metilo	14
	18:1	Petroselinato de metilo r	15
	18:2 n-6	Linoleato de metilo	16
	24:1	Nervonato de metilo	17



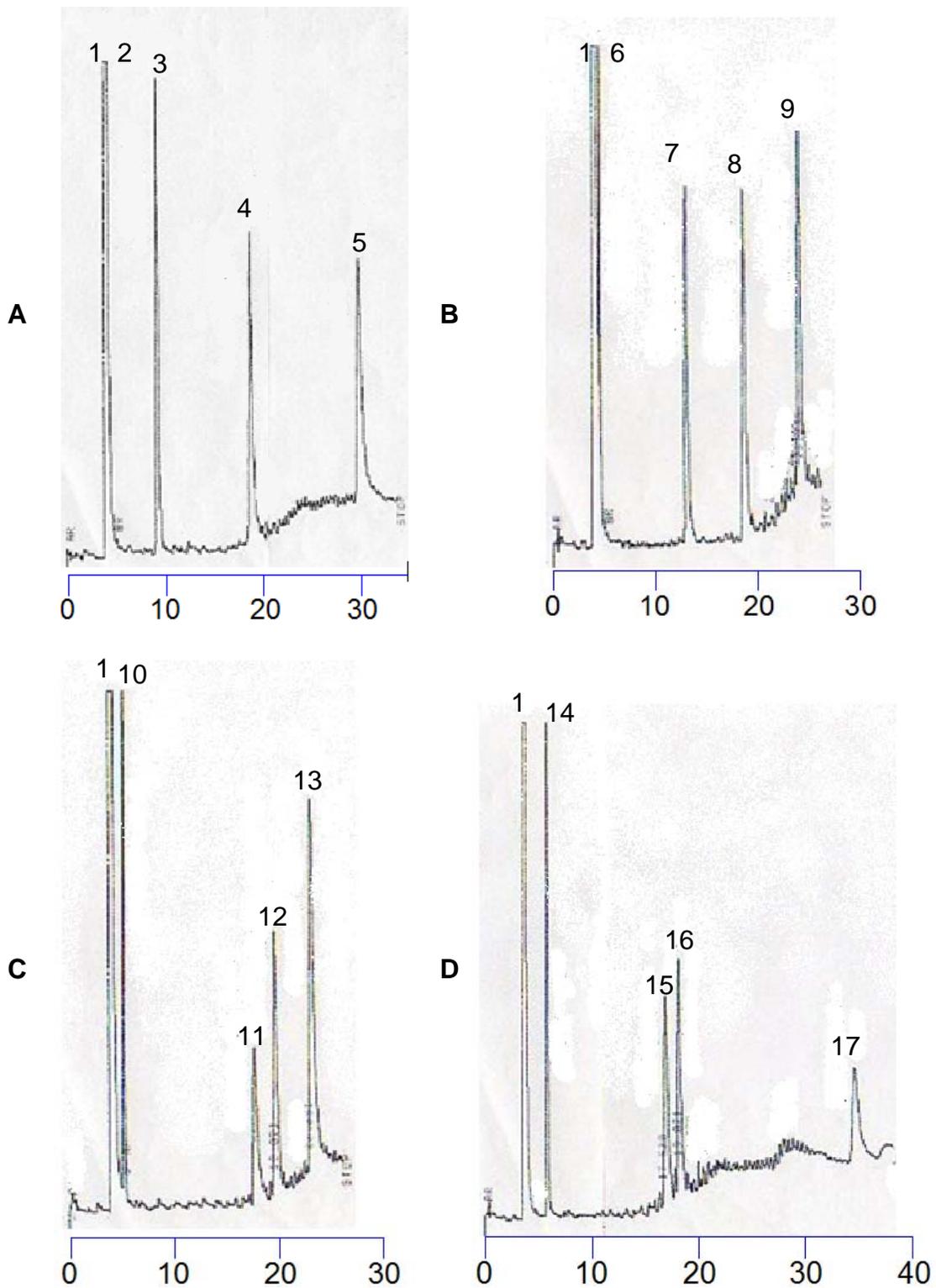


Figura 30. Cromatogramas de soluciones A, B, C y D de estándares de metil ésteres, la escala se presenta en min (ver Tabla 22).

Por otro lado, por medio de cromatografía de gases, tanto para el aceite de soya virgen como para el de desecho proporcionado por la Operadora Cever S.A. de C.V. se hizo la identificación y cuantificación de los ésteres de metilo presentes y que están relacionados proporcionalmente al contenido de ácidos grasos que componen a estos aceites. En las Figuras 31 a y b y Figuras 32 a y b se observan los cromatogramas para el aceite de soya virgen y el de desecho respectivamente, analizados de manera directa o metilada.

En el caso del análisis directo del aceite de soya virgen (Figura 31a) observamos que no aparece ningún pico de metil éster, pero en la Figura 31b se aprecian los diferentes metil ésteres que se obtuvieron con este mismo aceite metilado. Los picos mostrados nos indican el tipo de ácidos grasos que conforman el aceite de soya y su intensidad, proporción en la que están presentes (Tabla 23).

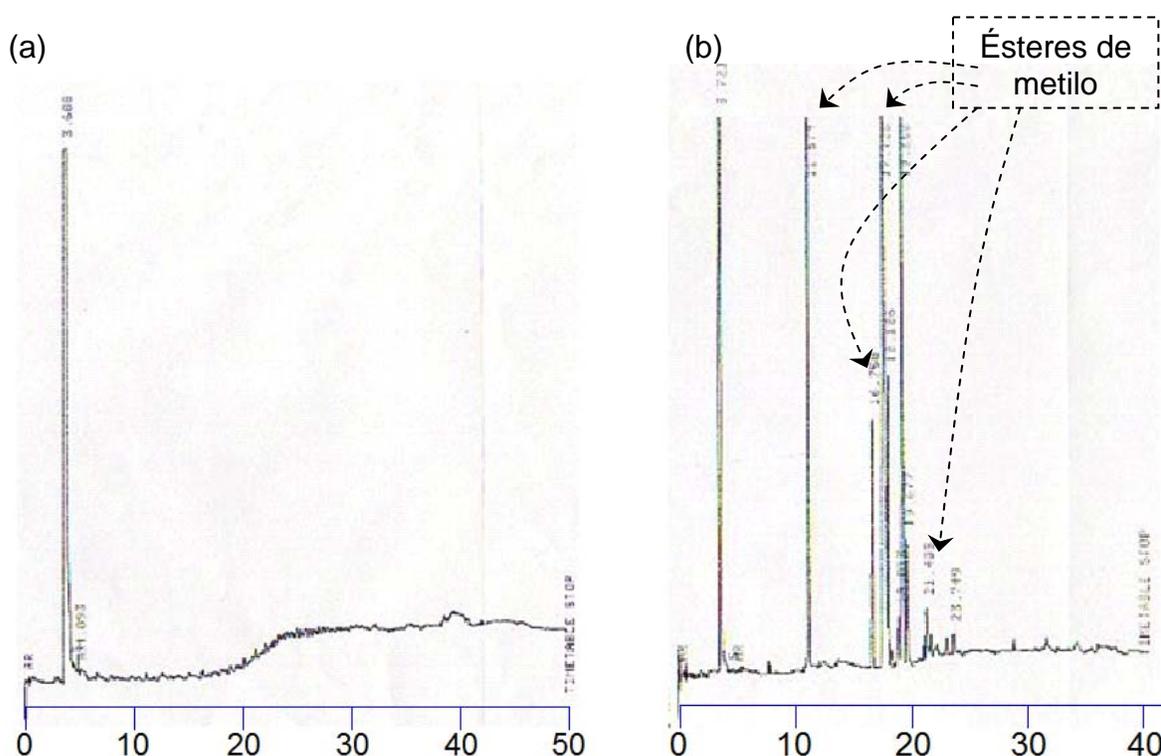


Figura 31. Cromatogramas de Aceite de soya virgen (a) directo y (b) metilado, la escala se presenta en min.

En el caso del análisis directo del aceite de desecho, podemos ver en la Figura 32a que tampoco aparecen los picos representativos de metil ésteres. Aunque aparecen 4 picos al final del cromatograma. En la Figura 32b se aprecian los metil ésteres del aceite de desecho metilado representados por el 62.9% de la muestra, pero también se detectaron los 4 picos que aparecieron y que representan el 37.1% de la muestra. Estos picos pueden ser otros componentes que se forman al usar el aceite vegetal resultado de las reacciones termolíticas, oxidativas o

hidrolíticas (Canakci 2007, Kulkarni y Dalai 2006) En la Tabla 23, podemos ver la composición en porcentaje del total de metil ésteres obtenidos en la metilación del aceite de desecho.

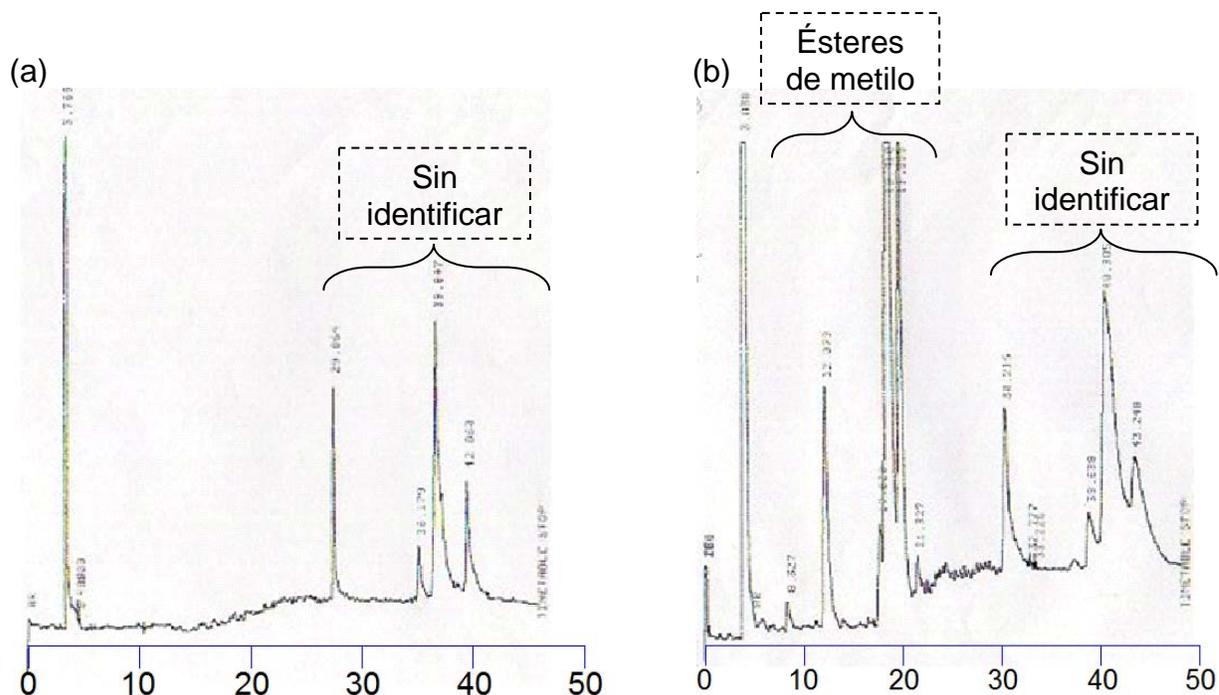


Figura 32. Cromatogramas de Aceite de desecho (a) directo y (b) metilado, la escala se presenta en min.

En la Tabla 23 se muestran densidades y pesos moleculares de los ácidos grasos que componen a los aceites analizados. También se muestran los porcentajes de composición de las dos muestras de aceite analizadas por cromatografía de gases. Los porcentajes son representativos solo del total de metil ésteres, sin tomar en cuenta los 4 picos no identificados presentes en las muestras de aceite de desecho.

Tabla 23. Propiedades y porcentaje de composición de ácidos grasos en el aceite de Soya virgen y de desecho.

Ácido graso	Densidad (g/ml)	PM	Composición (%)	
			Aceite de Soya virgen	Aceite de desecho
Palmítico, 16:0	0.85	256.4	14.9	13.8
Estearico, 18:0	0.84	284.5	7.0	3.6
Oleico, 18:1	0.87	282.5	46.6	53.3
Linoléico, 18:2	0.89	280.5	27.6	27.3
Linolénico, 18:3	0.90	278.4	4.0	2.0

8.6.2. Cinéticas de reacciones de transesterificación con metanol.

Los resultados obtenidos en esta sección por medio de cromatografía de gases con los 10 extractos seleccionados (Tabla 20), se representaron en unidades de porcentaje de conversión y miligramos de ésteres producidos. El porcentaje de conversión se calculó por componente y globalmente en base al porcentaje de composición de los ácidos grasos en el aceite de desecho (Tabla 23), que representa la máxima cantidad que se puede obtener de metil éster, calculandose así las cinéticas de reacción. En base a los 20 microlitros de muestra de reacción, los miligramos de ésteres y la densidad promedio del biodiesel producido en la reacción, se calcularon con el porcentaje de composición de ésteres, pesos moleculares y densidades respectivamente mostrados en la Tabla 23. La densidad calculada fue de 0.87 g/ml y la cantidad de muestra de reacción tomada corresponde a 17.5 mg, de cada muestra de reacción el 37.1% corresponden a los cuatro picos no identificados y el 62.9% a los metil ésteres que se pueden producir con el aceite de desecho o sea **11.0 mg de biodiesel**. En los gráficos obtenidos de las reacciones de transesterificación y mostrados a continuación se muestran las líneas de tendencia polinómicas de segundo orden, junto con los datos obtenidos en las cinéticas de reacción.

8.6.2.1. Evaluación de extractos enzimáticos de *Pseudomonas aeruginosa*, CN5, MM5 y MMS7.

Dado que tenemos tres *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo, en esta sección se muestran juntas para poder hacer una comparación entre ellas.



***Pseudomonas aeruginosa* en CN5, 12 y 48 h.**

Las cinéticas de reacción de transesterificación en términos de porcentaje de conversión se muestran en las Figuras 33 y 35 para los extractos enzimáticos de 12 h y 48 h respectivamente. En las Figuras 34 y 36 se presentan las cinéticas de producción de los ésteres cuantificados en miligramos para 12 h y 48 h respectivamente. En estas Figuras y la Tabla 24 podemos observar que para el extracto enzimático de 48 h se obtuvo un porcentaje de conversión mayor en comparación con el obtenido de 12 h. En esta Tabla se muestran los resultados en términos de: porcentaje de conversión final de cada éster de metilo, los miligramos obtenidos de biodiesel y la conversión total a biodiesel. El ácido esteárico fue el ácido graso que fue metilado en mayor proporción aunque éste no es el que está presente en mayor proporción, el ácido oleico es el más abundante en este aceite y su éster metílico fue el que se obtuvo en mayor proporción con relación a los demás, seguido del linoléico, palmítico, esteárico y finalmente linolénico.

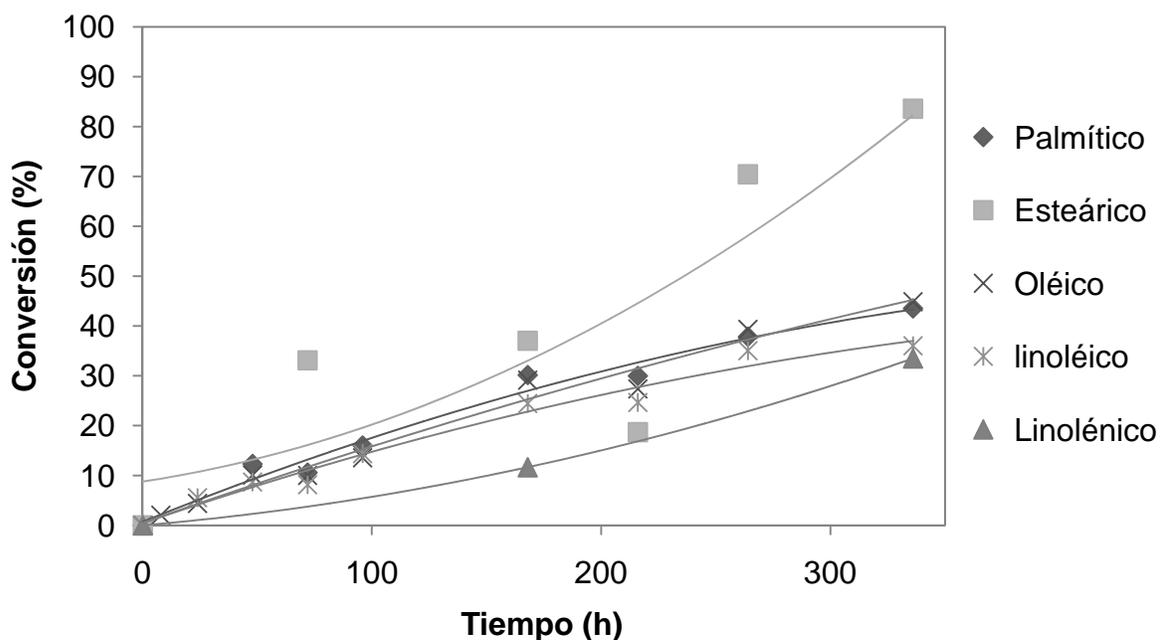


Figura 33. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en CN5, 12 h.

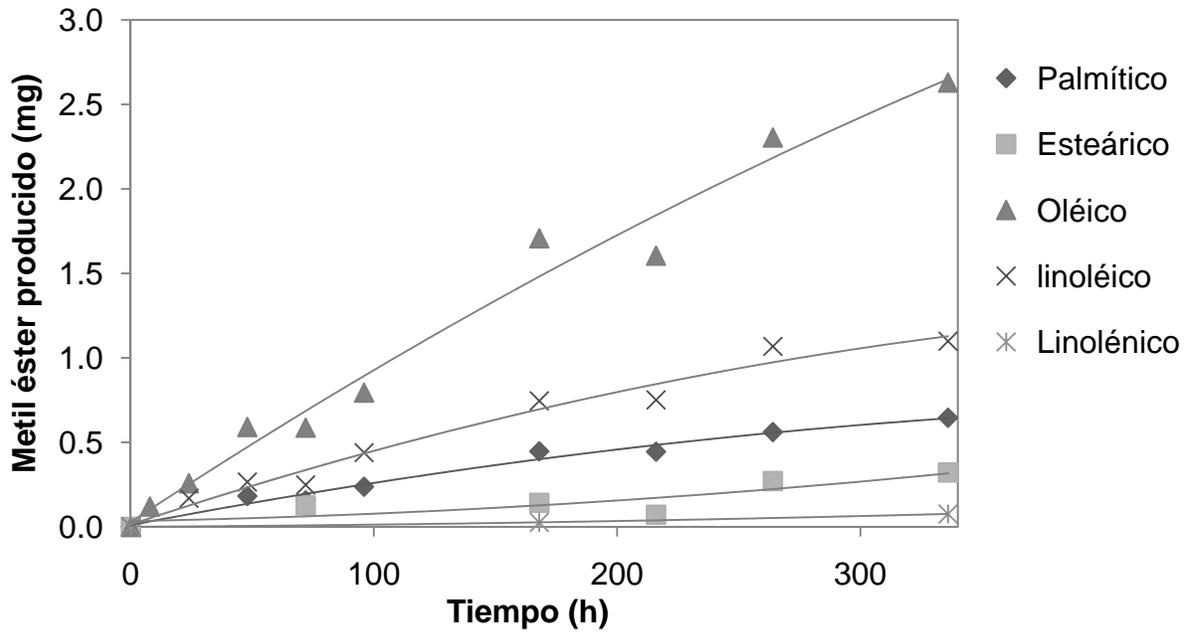


Figura 34. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en CN5, 12 h.

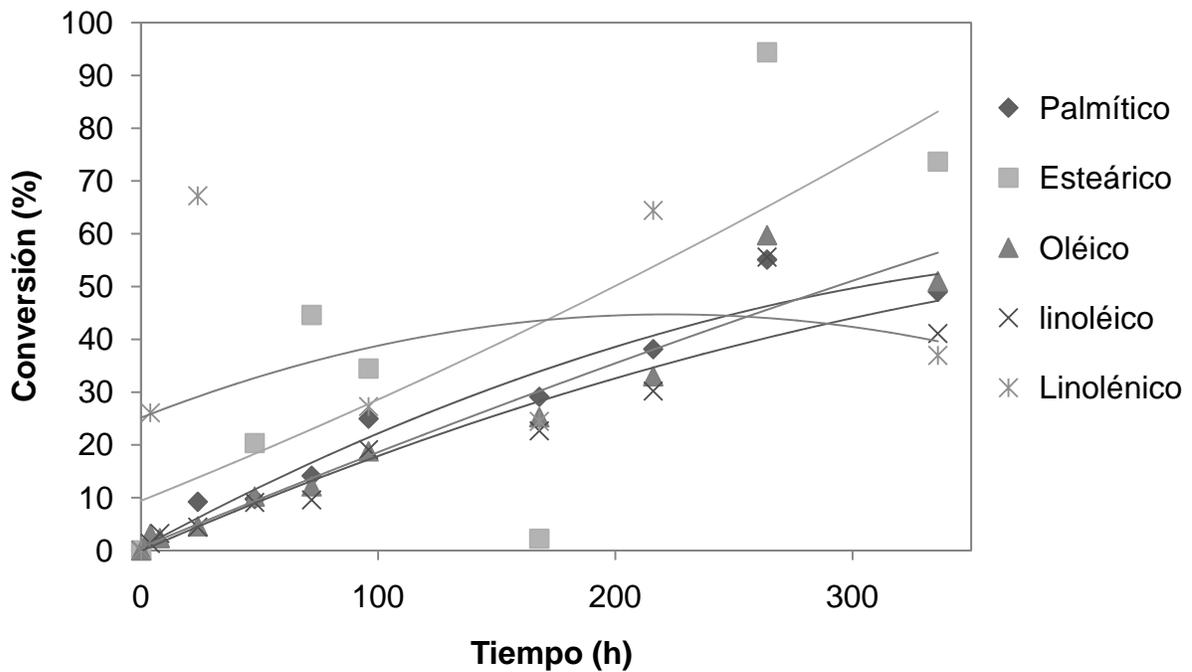


Figura 35. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en CN5, 48 h.

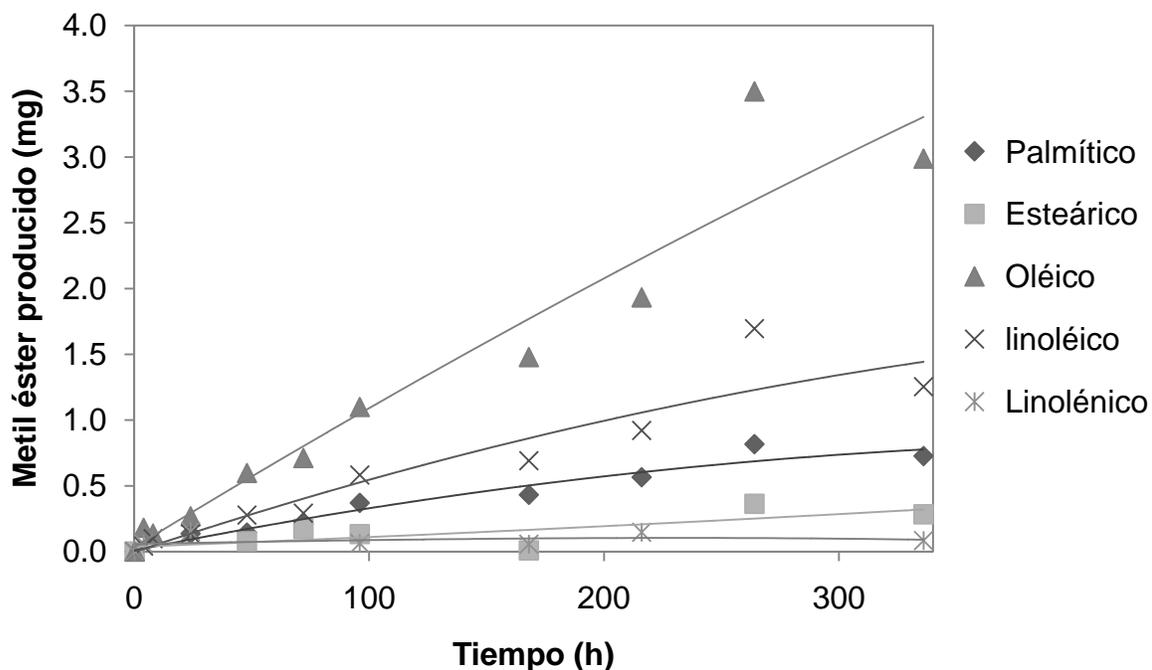


Figura 36. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en CN5, 48 h.

Tabla 24. Biodiesel producido con *Pseudomonas aeruginosa* en CN5.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%)		Biodiesel producido (mg)	
	12	48	12	48
Ésteres de metilo				
Palmítico	43.55	49.02	0.65	0.73
Esteárico	83.59	73.66	0.32	0.28
Oléico	44.89	51.00	2.63	2.99
Linoléico	36.03	41.10	1.10	1.25
Linolénico	33.48	36.97	0.08	0.08
Total	43.37	48.49	4.77	5.34

Pseudomonas aeruginosa en MM5, 12 y 24 h.

Los ésteres de metilo, productos de la reacción de transesterificación se muestran en las Figuras 37 y 39 en términos de porcentaje de conversión y en las Figuras 38 y 40 se presentan cuantificados en miligramos con los extractos enzimáticos de 12 h y 24 h respectivamente. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos. Con los dos extractos enzimáticos el ácido graso que tuvo un

mayor porcentaje de conversión fue el esteárico. Aunque destaca con el de 24 h con 57.51% de conversión total.

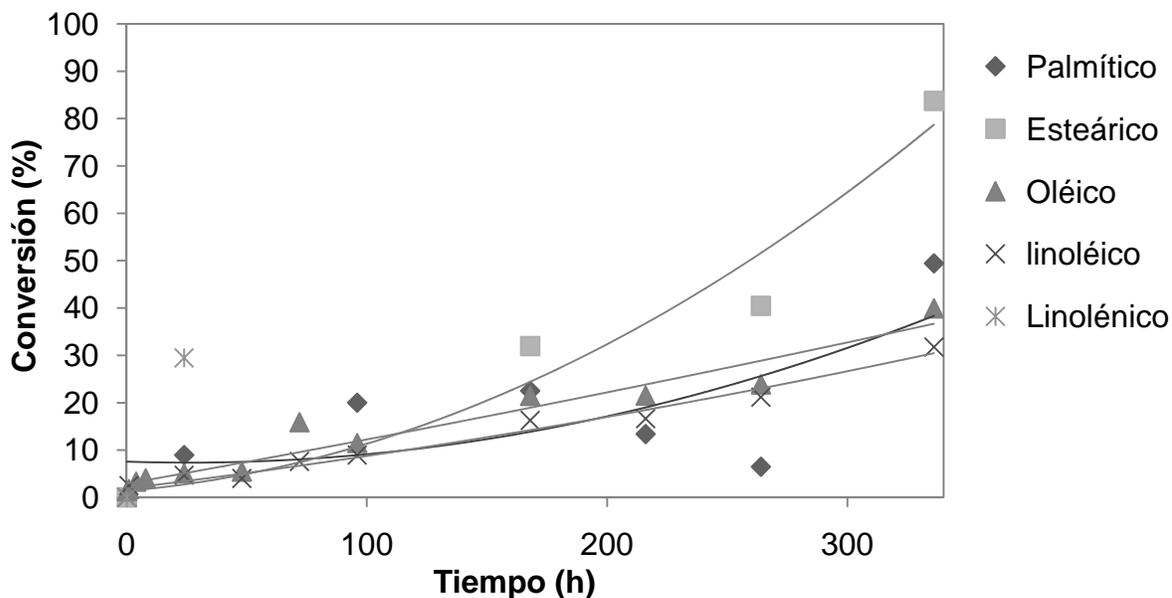


Figura 37. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en MM5, 12 h.

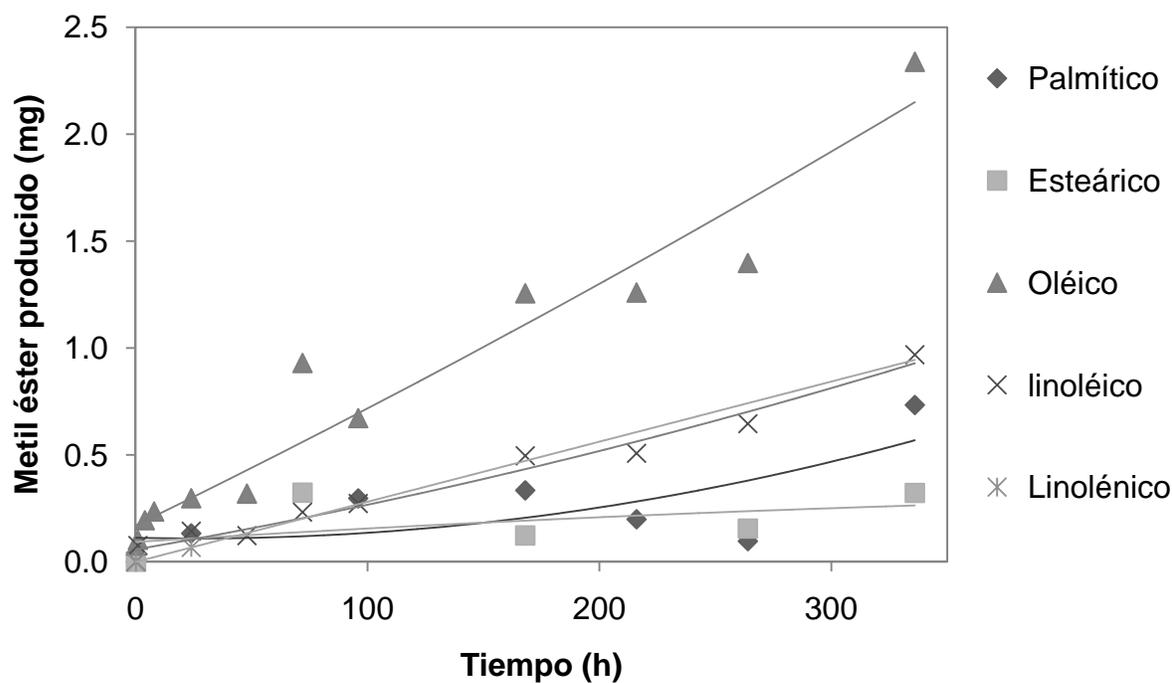


Figura 38. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en MM5, 12 h.



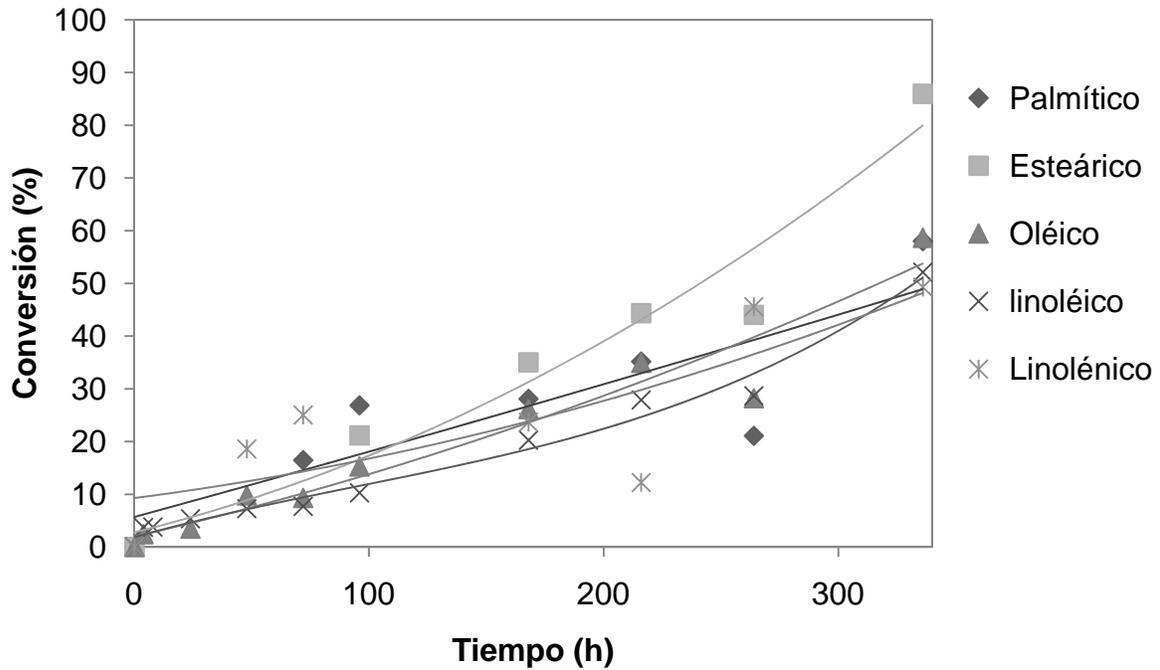


Figura 39. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en MM5, 24 h.

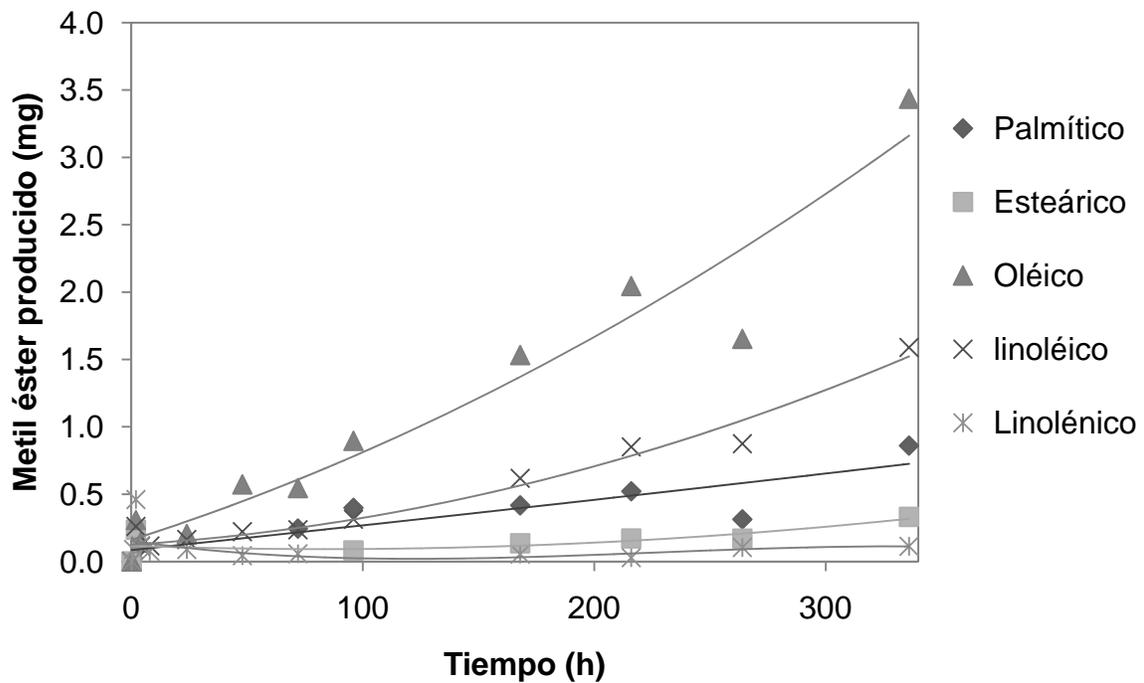


Figura 40. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en MM5, 24 h.

Tabla 25. Biodiesel producido con *Pseudomonas aeruginosa* en MM5.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%)		Biodiesel producido (mg)	
	12	24	12	24
Ésteres de metilo				
Palmítico	49.44	58.02	0.73	0.86
Esteárico	83.71	85.94	0.32	0.33
Oléico	39.91	58.64	2.34	3.44
Linoléico	31.76	52.13	0.97	1.59
Linolénico	29.49	49.30	0.07	0.11
Total	39.65	57.51	4.36	6.33

***Pseudomonas aeruginosa* en MMS7, 24 y 36 h.**

Las cinéticas de reacción de transesterificación en términos de porcentaje de conversión se muestran en las Figuras 41 y 43 respectivamente para los cultivos de 24h y 36 h y en las Figuras 42 y 44 se observan los ésteres cuantificados en miligramos. En la Tabla 26 se muestra que el cultivo de 36 h fue el que dió mayor porcentaje de conversión total con 46.42%. El éster que se obtuvo en mayor cantidad fue el esteárico dando un porcentaje de conversión de 75.69% y en el caso del ácido oleico su porcentaje de conversión fue de 49.29% aunque como ya se ha mencionado es el que ésta presente en mayor proporción.

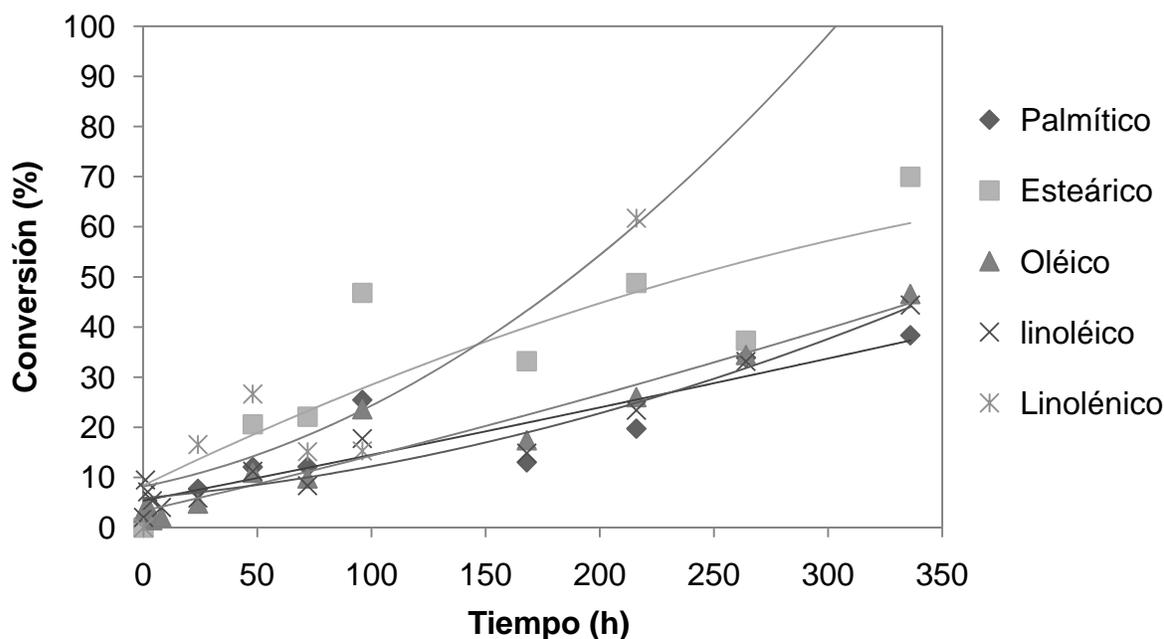


Figura 41. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en MMS7, 24 h.



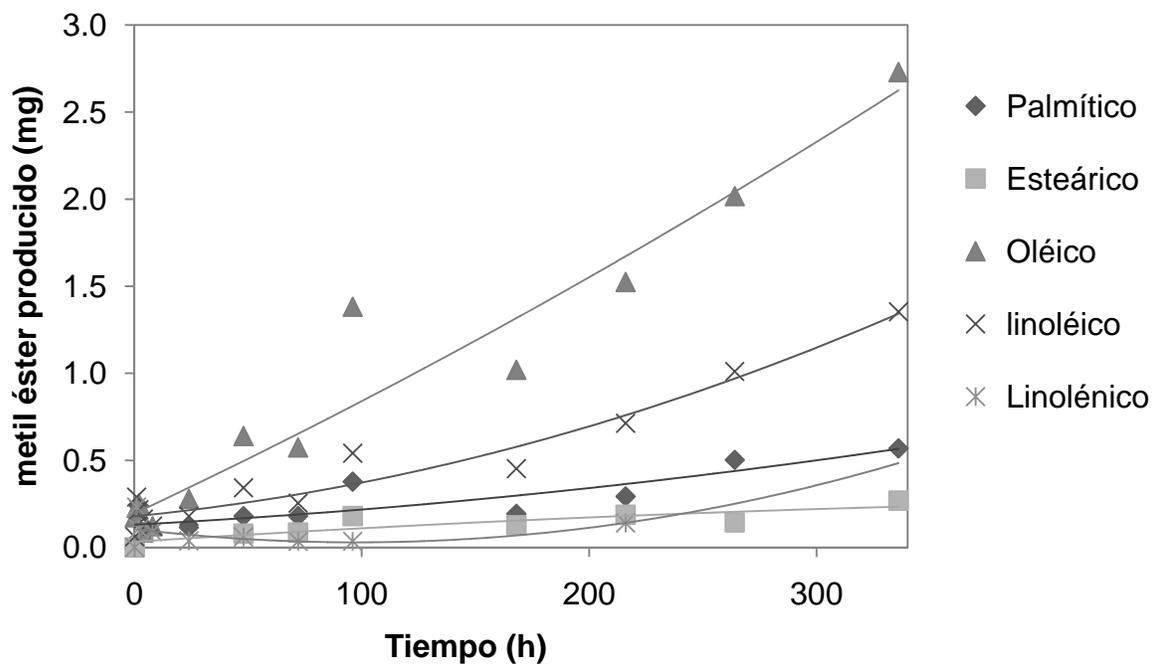


Figura 42. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en MMS 24 7, h.

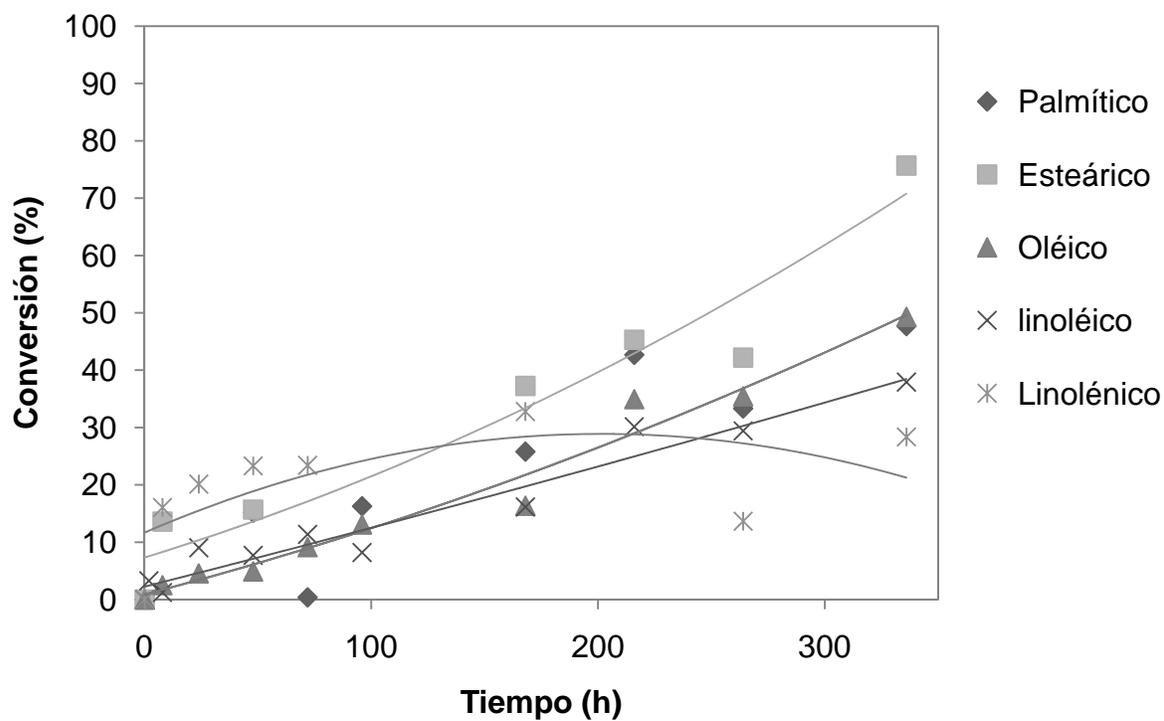


Figura 43. Cinética de reacción de transesterificación, *Pseudomonas aeruginosa* en MMS7, 36 h.

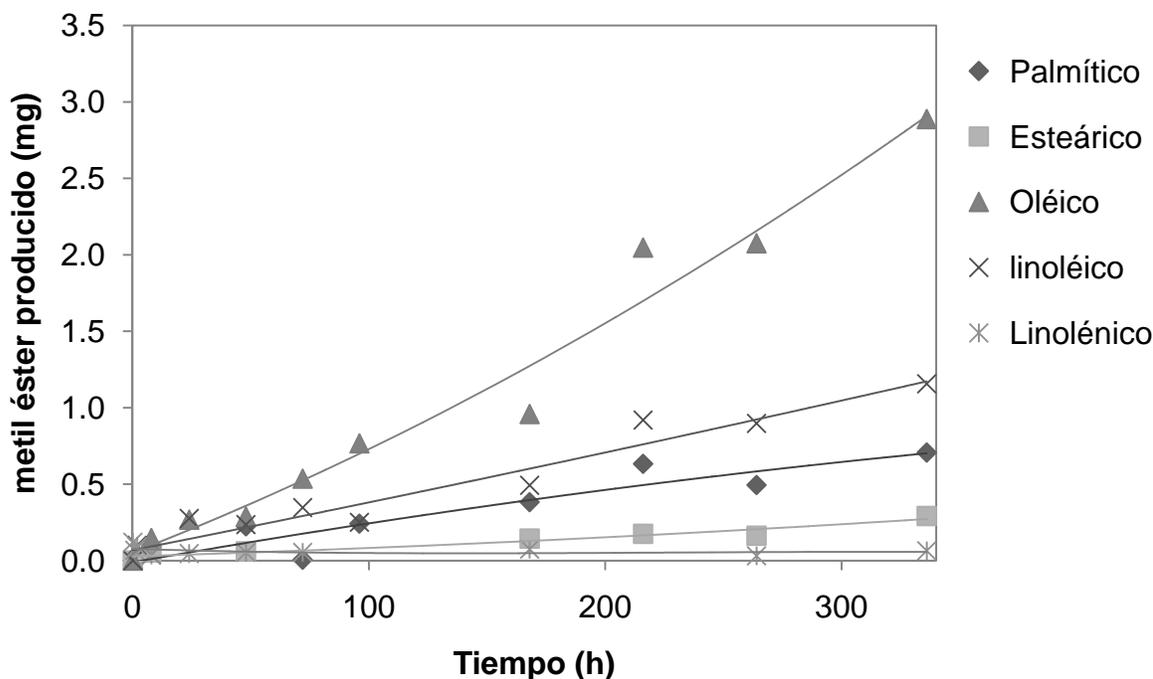


Figura 44. Cinética de producción de ésteres, *Pseudomonas aeruginosa* en MMS7, 36 h.

Tabla 26. Biodiesel producido con *Pseudomonas aeruginosa* en MMS7.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%)		Biodiesel producido (mg)	
	24	36	24	36
Ésteres de metilo				
Palmítico	38.38	47.70	0.57	0.71
Esteárico	69.96	75.69	0.27	0.29
Oléico	46.59	49.29	2.73	2.89
Linoléico	44.40	37.93	1.35	1.16
Linolénico	61.73	28.36	0.14	0.06
Total	44.73	46.42	4.92	5.11

En resumen para las *Pseudomonas aeruginosa* que fue cultivada en tres medios distintos, la comparación de producción total de biodiesel se muestra en la Figura 45 en donde está representado en miligramos de ésteres metílicos y porcentaje de conversión a biodiesel total. En este gráfico podemos observar que el extracto de CS de 12 h de MM5 fue el que dio una mayor producción de biodiesel al final de la reacción en comparación de los otros extractos enzimáticos con estos microorganismos obtenidos de distintos cultivos y condiciones de pH.



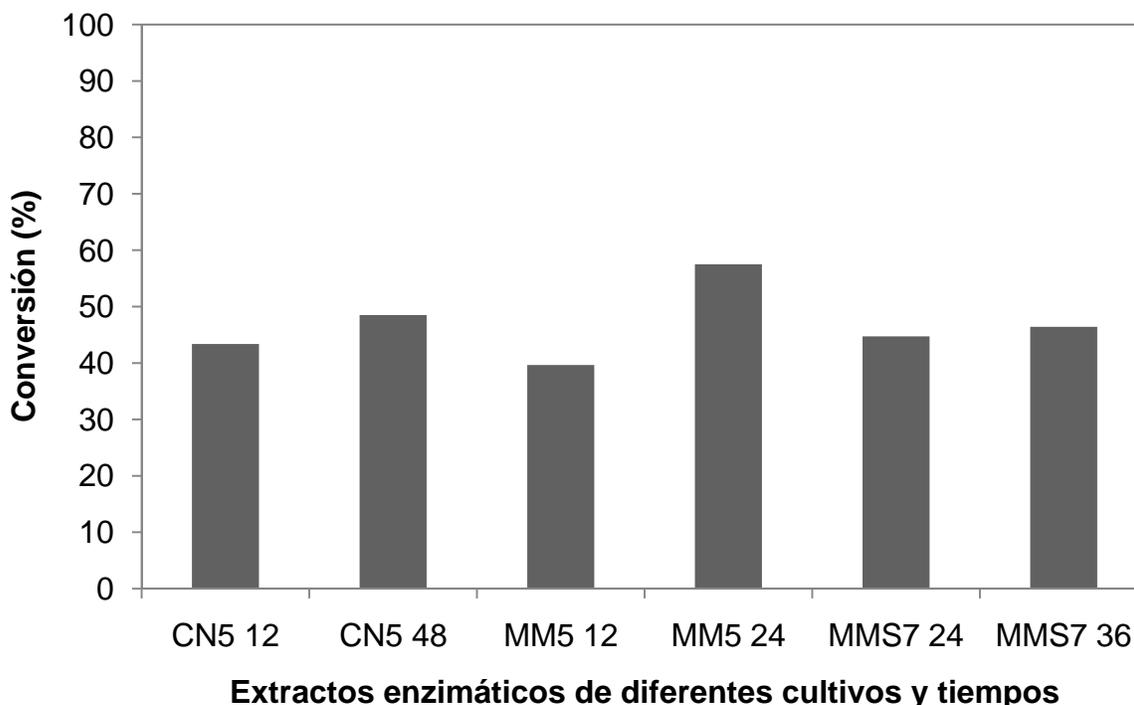


Figura 45. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de *Pseudomonas aeruginosa*.

8.6.2.2. Evaluación de extractos enzimáticos de Bacterias Gram (+), CN7 y MM7.

Se tienen dos bacterias seleccionadas que fueron identificadas como Gram (+), obtenidas de condiciones de pH y medios diferentes. Sus evaluaciones se muestran juntas para poder hacer una comparación entre ellas.

Bacteria Gram (+) en CN7, 48 h.

La cinética de reacción de transesterificación en términos de porcentaje de conversión de los ésteres presentes en el aceite de desecho, se muestra en la Figura 46 y en la Figura 47 se observan los ésteres cuantificados en miligramos. En la Tabla 27 se puede ver que el porcentaje de conversión total a biodiesel fue de 38.45% teniendo una mayor conversión el ácido esteárico de 63.48% y en el caso del ácido oleico, se obtuvo un porcentaje de conversión de 38.91%.

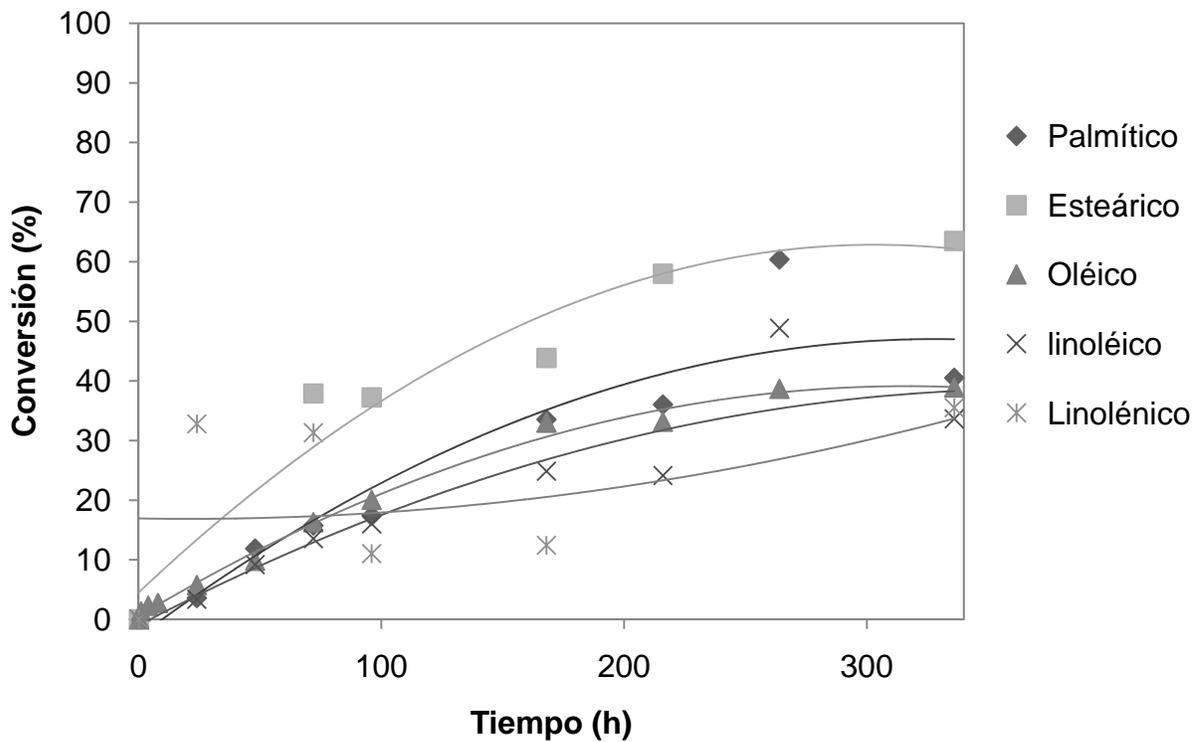


Figura 46. Cinética de reacción de transesterificación, bacteria Gram (+) en CN7, 48 h.

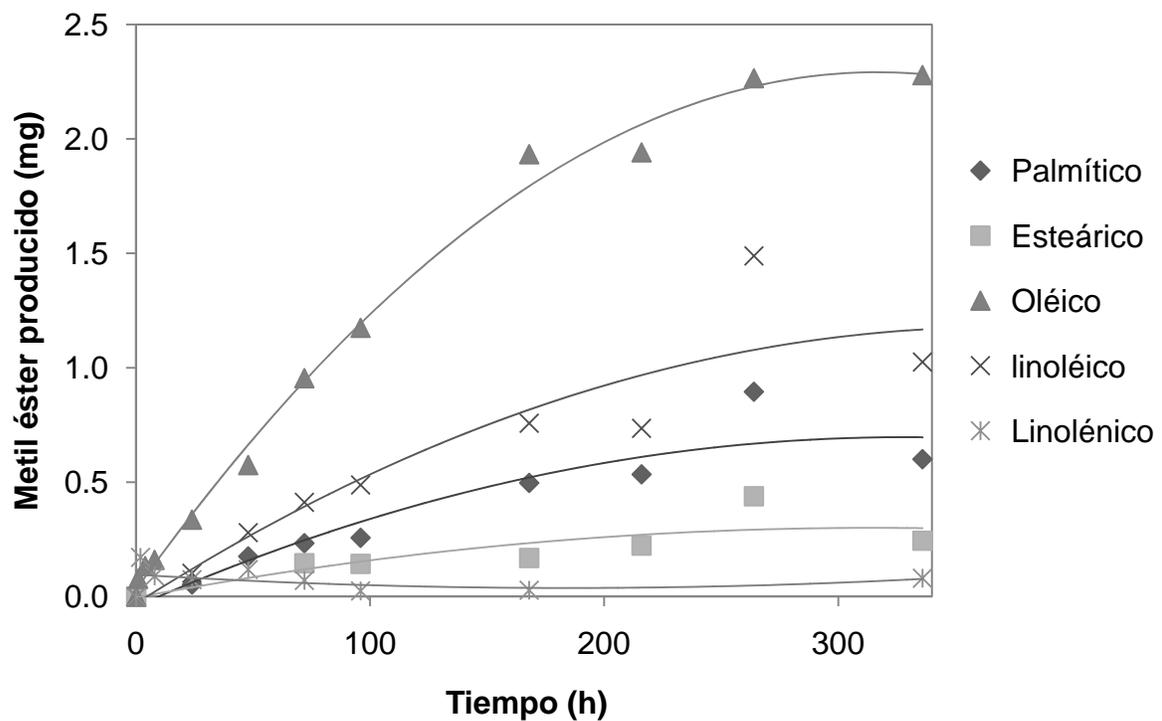


Figura 47. Cinética de producción de ésteres, bacteria Gram (+) en CN7, 48 h.

Tabla 27. Biodiesel producido con Bacteria Gram (+) en CN7.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%) Biodiesel producido (mg)	
	48	48
Ésteres de metilo		
Palmítico	40.50	0.60
Esteárico	63.48	0.24
Oléico	38.91	2.28
Linoléico	33.62	1.03
Linolénico	35.52	0.08
Total	38.45	4.23

Bacteria Gram (+) en MM7, 24 h.

La cinética de reacción de transesterificación en términos de porcentaje de conversión se muestra en la Figura 48 y en la Figura 49 se observan los ésteres producidos cuantificados en miligramos. En la Tabla 28 se observa que el porcentaje total de conversión fue de 37.1%. El ácido esteárico tuvo un porcentaje de conversión de 55.1% mayor comparado al de los otros ácidos grasos y el ácido oleico tuvo un porcentaje de conversión de 39.1%.

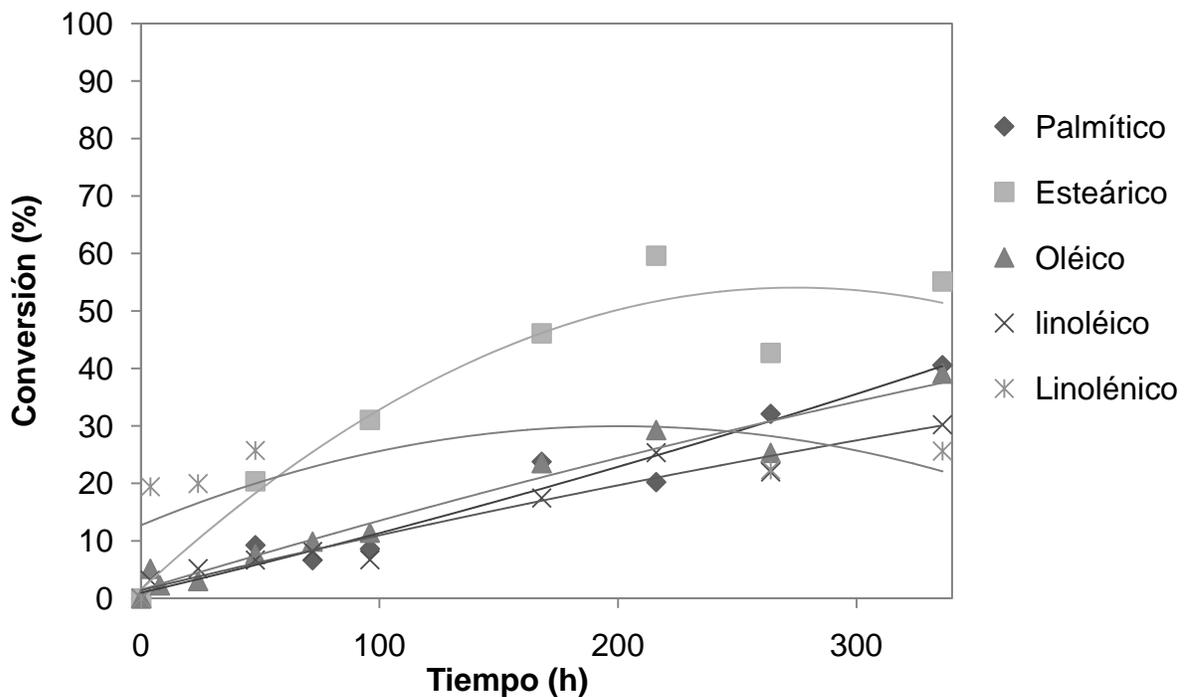


Figura 48. Cinética de reacción de transesterificación, bacteria Gram (+) en MM7, 24 h.



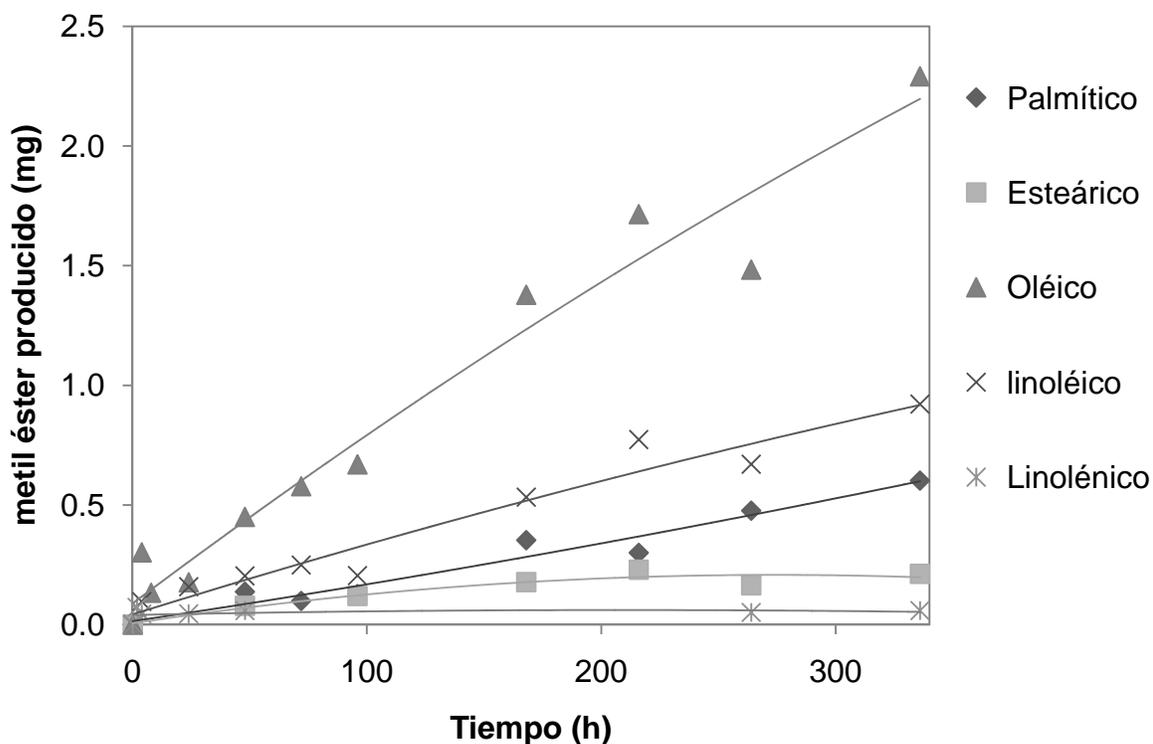


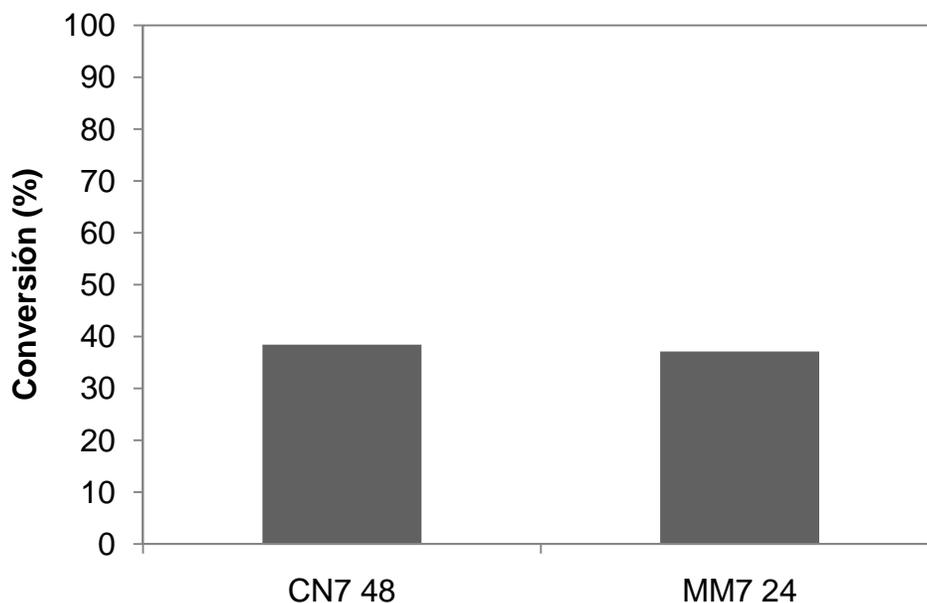
Figura 49. Cinética de producción de ésteres, bacteria Gram (+) en MM7, 24 h.

Tabla 28 Biodiesel producido con Bacteria Gram (+) en MM7.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%) Biodiesel producido (mg)	
	24	24
Ésteres de metilo		
Palmítico	40.6	0.60
Esteárico	55.1	0.21
Oléico	39.1	2.29
Linoléico	30.2	0.92
Linolénico	25.6	0.06
Total	37.13	4.08

En la Figura 50, se muestran las cepas identificadas como Bacterias Gram (+), cada una de ellas tiene un solo tiempo de cultivo de donde se obtuvieron las CS. La que se cultivo en CN5, obtuvo un porcentaje ligeramente mayor de producción de biodiesel.





Cepas a diferentes tiempos de cultivo

Figura 50. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de bacterias Gram (+).

8.6.2.3. Evaluación de extractos enzimáticos de *Proteus mirabilis*, MMS9.

***Proteus mirabilis* en MMS9, 12 y 48 h.**

Esta cepa cultivada de MMS a pH 9 está identificada como *Proteus mirabilis* y se tienen dos tiempos de cultivo: a las 12 y 48 h. Las cinéticas de reacción de transesterificación en términos de porcentaje de conversión de los ésteres presentes en el aceite de desecho se muestran en las Figuras 51 y 53 respectivamente y en las Figuras 52 y 54 se observan los ésteres cuantificados en miligramos. En la Tabla 29 se muestra que el ácido graso que mayor porcentaje de conversión tuvo fue el esteárico con el cultivo de 12 h con 79.2%, aunque no es el ácido graso más abundante en este aceite. El porcentaje total de conversión a biodiesel, fue de 55.3% con el extracto de 12 h.

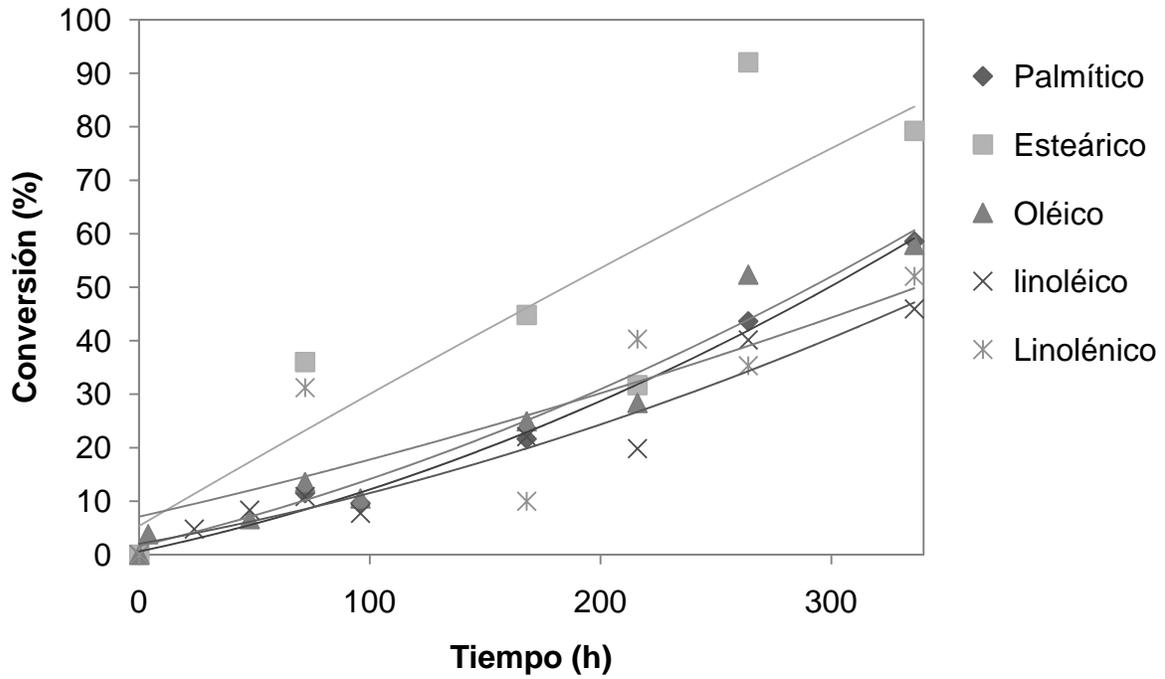


Figura 51. Cinética de reacción de transesterificación, *Proteus mirabilis* en MMS9, 12 h.

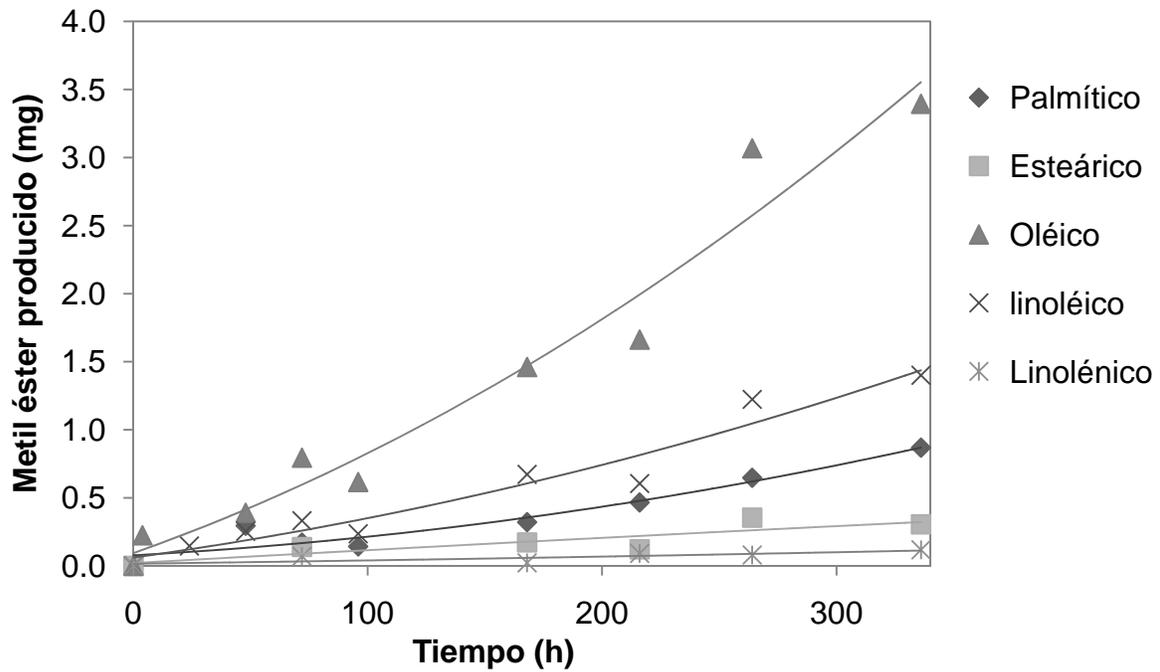


Figura 52. Cinética de producción de ésteres, *Proteus mirabilis* en MMS9, 12 h.

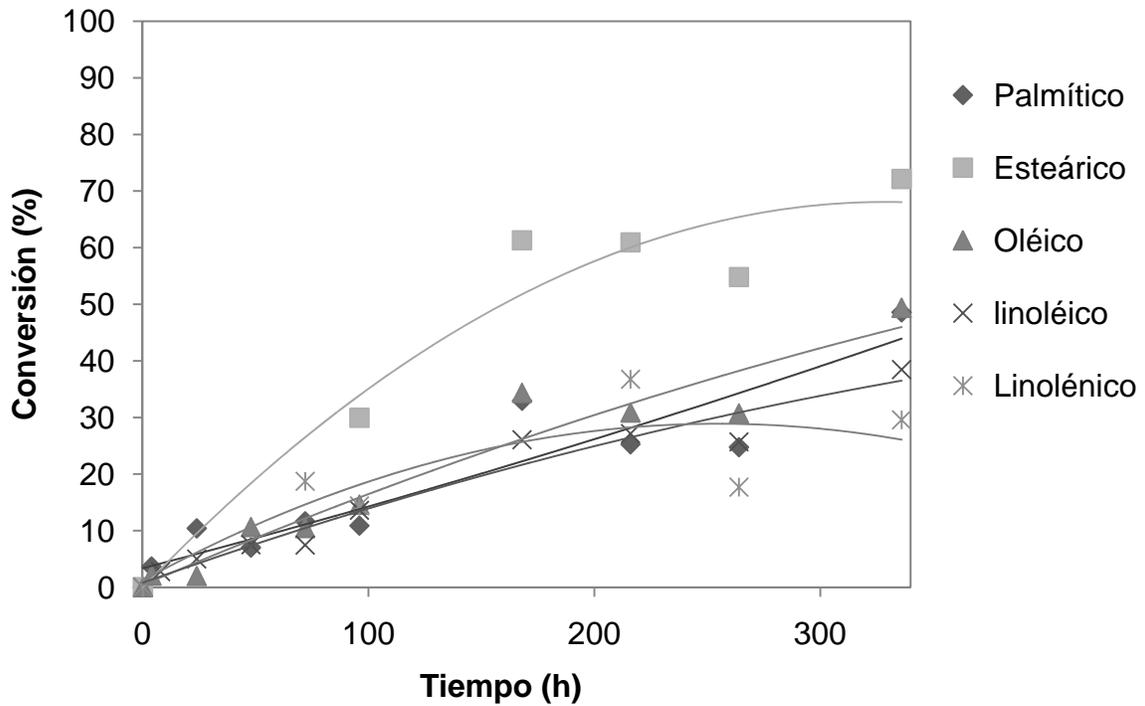


Figura 53. Cinética de reacción de transesterificación, *Proteus mirabilis* en MMS9, 48 h.

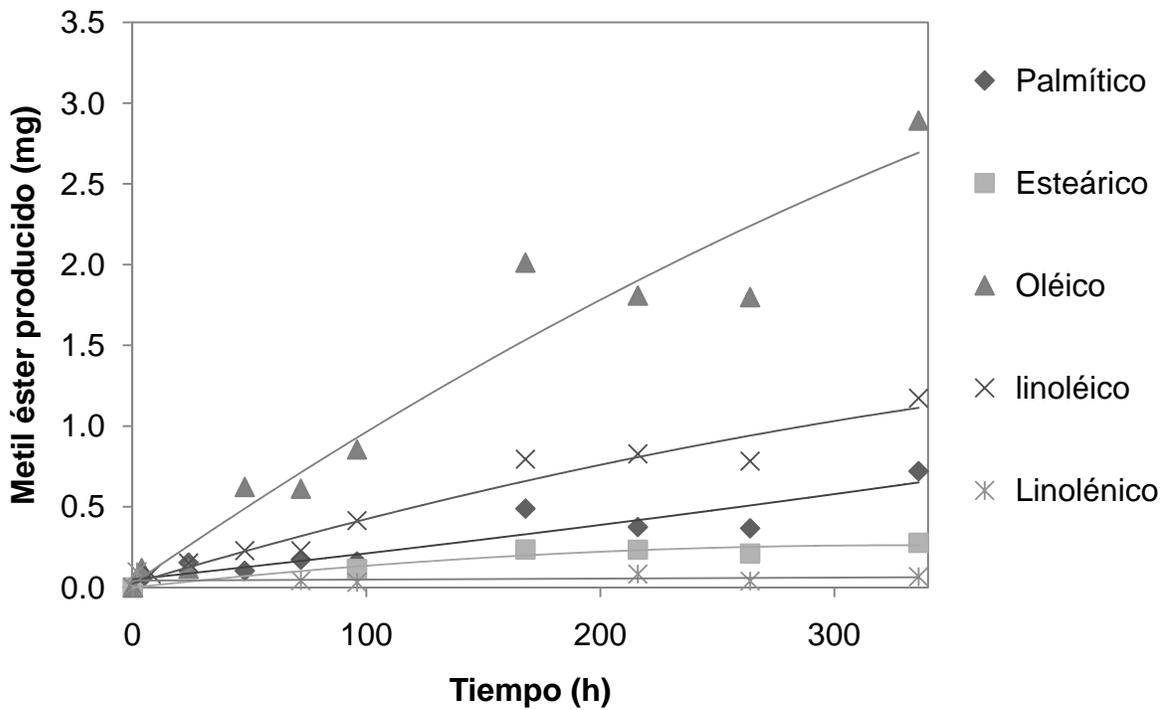


Figura 54. Cinética de producción de ésteres, *Proteus mirabilis* en MMS9, 48 h.

Tabla 29. Biodiesel producido con *Proteus mirabilis* en MMS9.

Cultivo (h)	Porcentaje de conversión (%)		Biodiesel producido (mg)	
	12	48	12	48
Ésteres de metilo				
Palmitico	58.6	48.59	0.87	0.72
Esteárico	79.2	72.15	0.31	0.28
Oléico	58.0	49.37	3.39	2.89
Linoléico	45.9	38.47	1.40	1.17
Linolénico	52.1	29.57	0.12	0.07
Total	55.3	46.6	6.09	5.13

En la Figura 55 podemos ver que se obtuvo un mayor porcentaje de producción de biodiesel con el cultivo de 12 h a comparación con el cultivo de 48 h.

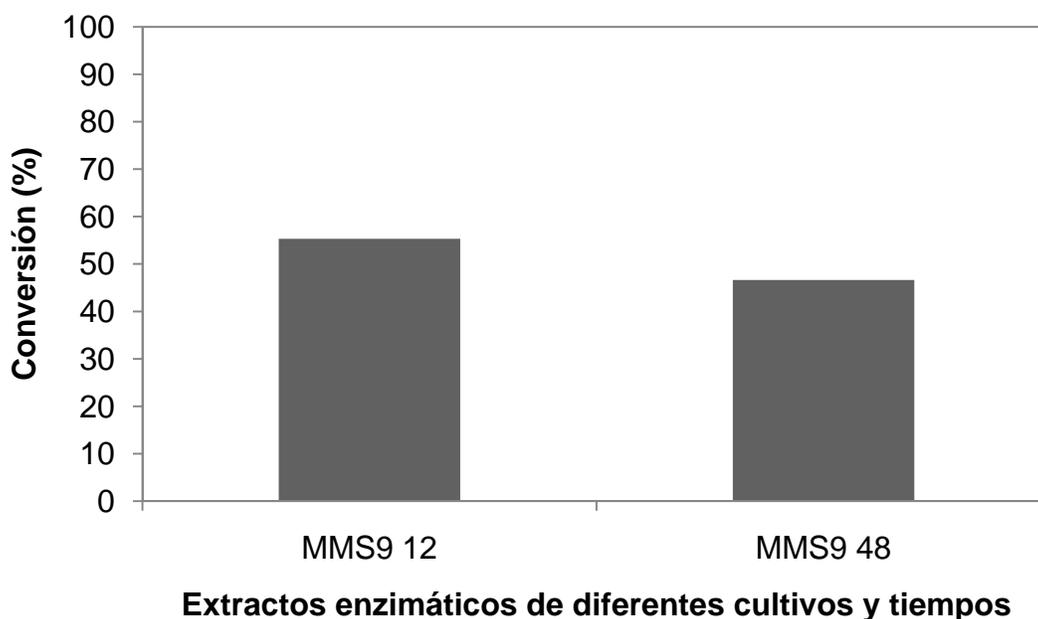


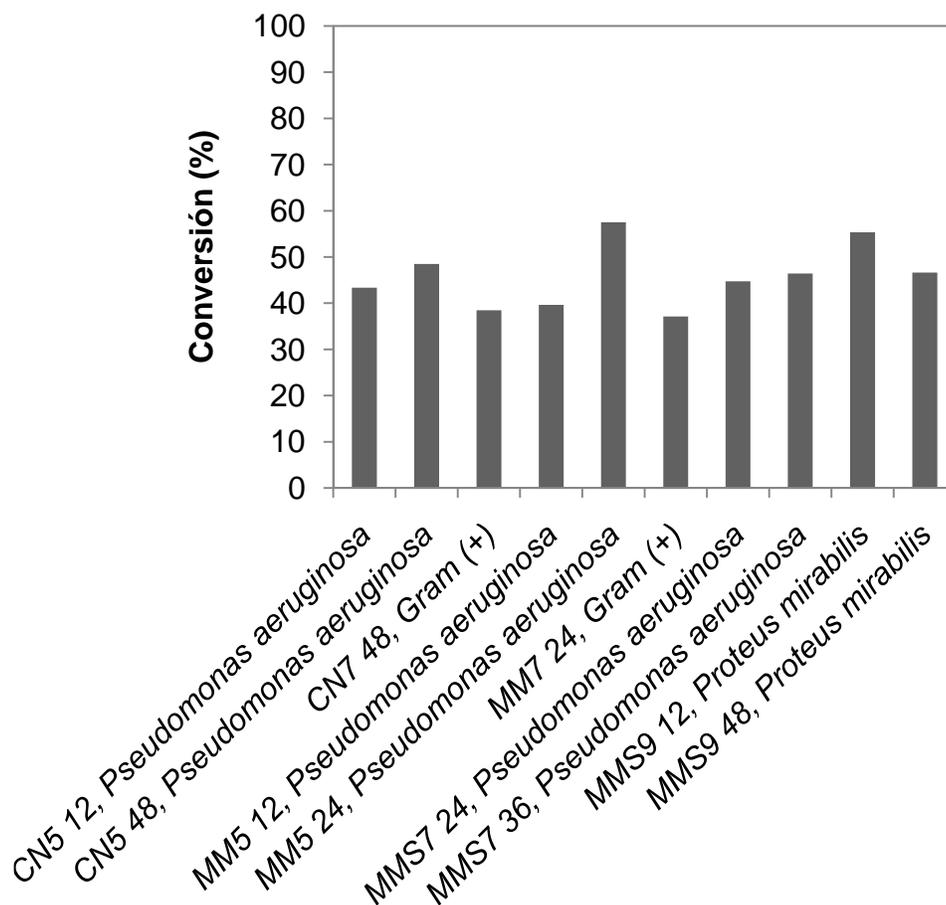
Figura 55. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos de *Proteus mirabilis*.

En la Figura 56 se presentan los resultados de las reacciones de transesterificación con todos los extractos enzimáticos. Podemos observar que con el extracto enzimático de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada a las 24 h del MM5, se obtuvo la mayor producción de biodiesel con 57.51% de conversión (Tabla 25 y 30), le sigue *Proteus mirabilis* cultivada a las 12 h del MMS9 con 55.3% de conversión



(Tabla 29 y 30) y finalmente con la bacteria Gram (+) cultivada a las 24 h del MM7 se obtuvo la menor producción de biodiesel.

Como el porcentaje de conversión se calculó para cada uno de los ésteres de metilo obtenidos y de manera global, esto nos permitió ver que el ácido esteárico, fue del que se obtuvo mayor conversión aunque éste no sea el que está presente en mayor proporción en el aceite. El porcentaje de composición del ácido oleico es el más alto en este aceite y no se obtuvo un porcentaje de conversión elevado con éste. Por lo que suponemos una selectividad de las enzimas por el ácido esteárico.



Cepas a diferentes tiempos de cultivo

Figura 56. Porcentaje de conversión a biodiesel con extractos enzimáticos seleccionados.

Tabla 30. Biodiesel producido con los extractos enzimáticos seleccionados.

Extracto enzimático	Cultivo	Porcentaje de conversión (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CN a pH 5, 12 h	43.37
	CN a pH 5, 48 h	48.49
	MM a pH 5, 12 h	39.65
	MM a pH 5, 24 h	57.51
	MMS a pH 7, 24 h	44.73
	MMS a pH 7, 36 h	46.42
Bacteria Gram (+)	CN a pH 7, 48 h	38.45
	MM a pH 7, 24 h	37.13
<i>Proteus mirabilis</i>	MMS a pH 9, 12 h	55.33
	MMS a pH 9, 48 h	46.63

Para la comparación de producción de biodiesel se citan los siguientes puntos importantes:

- Costo de producción de enzimas.
- Microorganismos productores de lipasas: nativos o modificados genéticamente.
- Enzima: pura, inmovilizada o pretratada.
- Fuente de glicéridos: aceite vegetal virgen o de desecho.

En general los extractos seleccionados para evaluar la transesterificación de acuerdo al pH, quedan de la siguiente manera: 4 a pH 5, 4 a pH 7 y 2 a pH de 9.

De manera puntual, tenemos:

- La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cultivada de tres medios y pH distintos, resalta el porcentaje de conversión con el cultivo en MM5 de 24 h, con lo que podemos concluir que el medio de cultivo y pH tienen influencia sobre la actividad de las lipasas de este microorganismo. La lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* está reportada con una destacable estabilidad en un amplio rango de disolventes orgánicos, característica útil para su uso en biorremediaciones y biotransformaciones en medios no acuosos (Ruchi et al. 2008).
- En el caso de *Proteus mirabilis*, no se han reportado datos de actividad enzimática de sus lipasas, y cabe resaltar que este microorganismo se cultivó a pH de 9, y aunque con el ensayo de pNPP no mostró una actividad relevante, en la reacción de transesterificación dio el segundo más alto porcentaje de conversión.
- Y finalmente para las Gram (+), se obtuvieron valores por debajo de 40% de conversión.



Es importante puntualizar que el uso de aceites de desecho como fuente de glicéridos para la producción de biodiesel presenta un porcentaje de conversión pequeño debido a las impurezas y agua presentes en este tipo de fuentes (Yang et al. 2009), tal como sucedió en este trabajo con los 4 picos no identificados en la muestra de aceite de desecho y las reacciones realizadas con él, los cuales pueden referirse a los productos de las reacciones de oxidación e hidrólisis que se llevan a cabo durante el uso de los aceites vegetales, pero que tampoco causan inhibición en la metanólisis de los acilgliceroles (Kulkarni y Dalai 2006).

Comparando con otras investigaciones que utilizan lipasas comerciales donde se han obtenido conversiones por arriba del 90%, pero que a diferencia de los extractos utilizados en este trabajo, éstas enzimas comerciales tienen: una pureza alta, un alto costo y pueden estar inmovilizadas o pretratadas; estos factores son importantes para obtener una alta conversión. Con las lipasas aproximadamente se tiene hasta 74 veces más productividad (Fjerbaek et al. 2009). Otro punto son las condiciones de reacción desde: la temperatura, agitación, tiempo de reacción, la fuente de glicéridos y alcohol utilizado.

Por lo que en la Tabla 31 se citan algunas reacciones y las condiciones a las cuales se llevaron a cabo para poder hacer una comparación con los extractos utilizados en este trabajo, donde se obtuvo un porcentaje máximo de conversión a metil ésteres de **57.51%**, considerando que las cantidades reales de lipasas en nuestro extracto enzimático no tienen el mismo grado de pureza que los utilizados en la mayoría de los trabajos de investigación citados, por ejemplo: la lipasa comercial de *Pseudomonas.cepacia* en polvo contiene 60 mg de enzima/g y tiene una pureza de lipasa de 95% (Pencreac'h y Baratti 1996), otros ejemplos son las enzimas citadas en la Tabla 31 donde algunas de ellas se obtuvieron a partir de cultivos de microorganismos modificados genéticamente, mientras que en este trabajo se utilizaron extractos enzimáticos sin ningún método de purificación. Estos extractos fueron evaluados en su capacidad de realizar la reacción de transesterificación por medio de dos ensayos distintos que nos dieron resultados buenos, comparables o mejores que los citados en la Tabla 31.



Tabla 31. Condiciones y porcentaje de producción de metil ésteres de reacciones de transesterificación enzimática de otras investigaciones.

Reacción de Transesterificación	Enzima	Porcentaje de producción de metil ésteres (%)	Referencia
Grasa reciclada de restaurante, metanol y utilizando 10% enzima en base al peso de la grasa, una relación molar de alcohol-grasa de 4:1, a 40°C y 200 rpm	<i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada (IM PS-30), con una concentración final de proteína en la matriz, de 8-12 mg de proteína/g de enzima inmovilizada	88	(Hsu et al. 2002)
	Lipasa inmovilizada SP435 de <i>C. antártica</i> (tipo B)	60	
	<i>C. antártica</i> soportada en silica granulada, (gran-C.a. tipo A)	27	
	<i>Thermonyces lanuginosa</i> soportada en silica granulada, (gran-T.I.)	4	
9.65 g de aceite de soya y 0.35 g de metanol, se utilizó 1 ml de la solución o 0.5 g de enzima en polvo, 50 h de reacción	0.1-0.5 g de lipasa en polvo comercial (<i>P. cepacia</i>), o disuelta en 5 ml de agua, se centrifuga, se recupera el sobrenadante	Polvo: 32 Solución de enzima: 32.6	(Kaieda et al. 2001)
165 h de reacción a 37°C con adición en dos pasos de metanol	Células secas de la cepa rProIROL (<i>S. cerevisiae</i> con expresión de lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> IFO4697)	71	(Matsumoto et al. 2001)
5 g de aceite de <i>Jatropha</i> , a 30°C, 150 rpm por 90 h, razón molar alcohol-aceite de 3:1, y 0.2 g de lipasas	Células completas inmovilizadas de <i>R. oryzae</i>	80.2	(Tamalampudi et al. 2008)



	Células completas inmovilizadas de Novozym 435	75.1	
10 g de aceite de soya, 3 g de metanol, 3 g de lipasa inmovilizada, 0.5 g de agua, a 700 rpm, 40°C y 90 min de reacción	PS de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada	67 % mol	(Noureddini et al. 2005)
19.30 g de aceite de soya y adición a pasos de metanol, cantidad de agua de 0-2%, a 30°C y 150 rpm	Novozym 435, enzima inmovilizada de <i>Candida antártica</i>	98.7	(Samukawa et al. 2000)
1 g de cebo, 0.2 g de lipasa inmovilizada, 8 ml de hexano como disolvente, 20% de agua en base al peso del cebo, 40°C, y adición en pasos del metanol	Lipasa inmovilizada <i>Candida</i> sp 99-125	87.4	(Lu et al. 2007)

Existen actualmente datos en la bibliografía utilizando enzimas comerciales que tienen una actividad específica considerable, pero con mayor grado de pureza y provenientes de microorganismos modificados genéticamente para que produzcan una mayor cantidad de lipasas o con una actividad alta. Sin embargo este trabajo se realizó con microorganismos que fueron aislados y seleccionados a partir de suelos por la actividad lipolítica que mostraron en los ensayos en placa con rodamina B y posteriormente en la evaluación cuantitativa por medio del ensayo de pNPP. Con lo que se verificó la capacidad de transesterificación llevando a cabo esta reacción directamente con aceite vegetal de desecho y metanol para obtener biodiesel.



9. CONCLUSIONES.

- Se seleccionaron, aislaron y conservaron 32 microorganismos con actividad lipolítica a partir de tres muestras de suelos con el ensayo en placa con rodamina B, siendo:
 - 3 cepas en Caldo Nutritivo a pH 5, CN5
 - 5 cepas en Caldo Nutritivo a pH 7, CN7
 - 4 cepas en Medio Mineral a pH 5, MM5
 - 9 cepas en Medio Mineral a pH 7, MM7
 - 9 cepas en Medio Mineral con Sacarosa a pH 7, MMS7
 - 2 cepas en Medio Mineral con Sacarosa a pH 9, MMS9

Los 32 microorganismos aislados son bacterias y correspondieron a 4 diferentes identificadas como: 4 bacterias Gram (+), 16 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Escherichia coli*, y 10 *Proteus mirabilis*.

- De la evaluación cualitativa se seleccionaron 6 cepas con actividad destacada: tres *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en CN5, MM5 y MMS7, dos bacterias Gram (+) cultivadas en CN7 y MM7 y una *Proteus mirabilis* cultivada en MMS9.
- El uso del ensayo del pNPP fue adecuado para realizar la evaluación cuantitativa de la actividad de lipasas una vez estandarizado el ensayo. Los mayores porcentajes de conversión utilizando dicho ensayo se determinaron en CS y son comparables a los reportados en la literatura. El mayor porcentaje de conversión fue del 59.7% y se obtuvo con *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 h de cultivo con el MMS y utilizando etanol.
- Los mayores porcentajes de conversión determinados en la reacción de transesterificación con CS y metanol fueron 57.5 %, 55.33 % y 38.45 % con *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y la bacteria Gram(+) respectivamente. Estos valores son comparables con aquellos reportados en la literatura con enzimas recombinantes y purificadas, así como con microorganismos genéticamente modificados para utilizarse como células completas en estudios de producción de biodiesel.



10. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS.

Algunos puntos importantes que deja esta investigación para continuar investigando son:

- La comparación de la evaluación enzimática con $pNPP$ tanto en medio acuoso como en medio orgánico.
- Optimizar la reacción de transesterificación considerando:
 - La inmovilización de CS para incrementar la estabilidad de la enzima.
 - El pretratamiento a extractos enzimáticos para que puedan ser reutilizados y competir con el NaOH, que es consumido en el proceso de producción de biodiesel.
 - Condiciones de reacción:
 - Temperatura,
 - Tiempo de reacción,
 - Modo de adición del metanol (Yang et al. 2009),
 - Concentración de agua (Noureddini et al. 2005, Lu et al. 2007).



11. BIBLIOGRAFIA.

- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ***Analytical Biochemistry***, 72.
- Canakci M. 2007. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. ***Bioresource Technology***, 98: 183–190.
- Chi Z, Chi Z, Zhang T, Liu G, Li J, Wang X. 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. ***Biotechnology Advances***, 27: 236-255.
- Dharmsthiti S, Kuhasuntisuk B. 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, 21: 75–80.
- Du W, Xu Y, Liu D. 2003. Lipase-catalysed transesterification of soy bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, 38: 103–106.
- FAO. 1997. Composición de las grasas alimentarias. In FAO (Ed.), ***Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos, Roma 19-26 octubre de 1993***. Roma.
- Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. ***Biotechnology and Bioengineering***, 102: 1298-1315.
- Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 92: 405-416.
- Gupta MN, Roy I. 2004. Review article. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. ***European Journal of Biochemistry***, 271: 2575–2583.
- Gupta N, Rathi P, Rajni Singh, Goswami VK, Gupta R. 2005. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 67: 648–653.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 64: 763–781.
- Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. 2003. REVIEW, Lipase assays for conventional and molecular screening:an overview. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, 37: 63–71.



- Hsu AF, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. 2002. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. ***Biotechnology Applied Biochemistry***, 36: 181–186.
- Hsu AF, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. 2003. Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase. ***Biotechnology Letters***, 25: 1713–1716.
- Hsu AF, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. 2004. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. ***Biotechnology Letters***, 26: 917–921.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. 1994. Bacterial lipases. ***FEMS Microbiology Reviews***, 15: 29-63.
- Jitputti J, Kitiyanan B, Rangsunvigit P, Bunyakiat K, Attanatho L, Jenvanitpanjakul P. 2006. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconutoil by different solid catalysts. ***Chemical Engineering Journal***, 116: 61–66.
- Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 91: 12-15.
- Khan AK. 2002. ***Research into Biodiesel, Kinetics and Catalyst Development***. Ph. D. Thesis, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia.
- Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. ***Applied and Environmental Microbiology***, 53: 211-213.
- Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Fontana JD. 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. ***Biochemical Engineering Journal***, 18: 64-71.
- Lu J, Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. 2007. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp.* 99-125. ***Process Biochemistry***, 42: 1367-1370
- Makhsomkhanov AA, Yakubov IT, Davranov K. 2003. Conditions for Cultivation of the Fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and Its Biosynthesis of Lipases. ***Applied Biochemistry and Microbiology***, 39: 40-43.
- Manguesh G, Kulkarni, AK Dalai. 2006. Waste Cooking Oils, An Economical Source for Biodiesel: A Review. ***Industrial Engineering Chemistry Resource***, 45: 2901-2913.



- Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A. 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. ***Applied Microbiology and Biotechnology***; 57: 515–520.
- Modi MK, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN. 2006. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. ***Biotechnology Letters***, 28: 637–640.
- Noureddini H, Gao X, Philkana RS. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. ***Bioresource Technology***, 96: 769–777.
- Pencreac'h G, Baratti JC. 1996. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. ***Enzyme and Microbial Technology***, 18: 417-422.
- Pinto AC, Guareiro LLN, Rezende MJC, Ribeiro NM, Torres EA, Lopes WA, Pereira PAP, de Andrade JB. 2005. Biodiesel: An Overview. ***J. Braz. Chem. Soc.***, 16(6B): 1313-1330.
- Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. 2008. Review An overview of enzymatic production of biodiesel. ***Bioresource Technology***, 99: 3975–3981.
- Ruchi G, G Anshu, Khare SK. 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. ***Bioresource Technology***, 99: 4796–4802.
- Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Noda H, Fukuda H. 2000. Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Plant Oil. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 90(2): 180-183.
- Sandoval G, Marty A. 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. ***Enzyme and Microbial Technology***, 40: 390–393.
- Sarukhán, J. 2009. Biocombustibles I. ***El universal***. 04 de septiembre.
- Shah S, Sharma Sh, Gupta MN. 2004. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. ***Energy & Fuels***, 18: 154-159.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. 2001. Research review paper. Production, purification, characterization and applications of lipases. ***Biotechnology Advances***, 19: 627–662.
- Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK. 1986. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. ***Journal of Bacteriology***, 168(3): 1070-1074.



- Tamalampudi S, Talukder MR, Hama S, Numata T, Kondo A, Fukuda H. 2008. Enzymatic production of Biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, 39: 185-189.
- Teng Y, Xu Y. 2007. A modified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, 363: 297–299.
- Vakhlu J, Kou A. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, DOI: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-9.
- Xu Y, Du W, Liu D, Zeng J. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, 25: 1239–1241.
- Yang KS, Shon JH, Kim HK. 2009. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 107: 599–604.
- Zhang X, Peterson CL, Reece D, Möller G, Haws R. 1997. **Biodegradability of Biodiesel in the Aquatic Environment**. Paper presented at the Commercialization of Biodiesel: Environmental and Health Benefits, University of Idaho, Moscow, Idaho.
- Zheng S, Kates M, Dube MA, McLean DD. 2006. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy**, 30: 267–272.

