

**ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE ESTERES ETÍLICOS POR
TRANSESTERIFICACIÓN, USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE
*Thermomyces lanuginosus***

**ERICK RODRIGUEZ PEÑA
MARIA ANTONIA AMADO DÍAZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006**

**ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE ESTERES ETÍLICOS POR
TRANSESTERIFICACIÓN, USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE
*Thermomyces lanuginosus***

ERICK RODRIGUEZ PEÑA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de Ingeniero Químico**

**Director: Prof. ARISTÓBULO CENTENO HURTADO
Ingeniero Químico M. Sc. PhD.**

**Codirectora: Prof. JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, M. Sc. Doctora en Química**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CATÁLISIS
CICAT**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS
CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006**

**ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE ESTERES ETÍLICOS POR
TRANSESTERIFICACIÓN, USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE
*Thermomyces lanuginosus***

MARIA ANTONIA AMADO DÍAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de Química**

**Directora: Prof. JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, M. Sc. Doctora en Química**

**Codirector: Prof. ARISTÓBULO CENTENO HURTADO
Ingeniero Químico M. Sc. PhD.**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CATÁLISIS
CICAT**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS
CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006**

DEDICATORIA

A mi mamá por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y a mis más queridos colegas Piedad y Gabriel Otero.

María Antonia Amado Díaz

A mis padres Trino y Cristina gracias por estar siempre conmigo apoyándome y creyendo siempre en mis capacidades.

A mis hermanos Iskander y Diana Cristina quienes en el transcurso de mi vida han estado presentes.

Erick Rodríguez Peña

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Alimentos CICTA y el laboratorio de Catálisis CICAT, por la colaboración prestada para ejecución de este proyecto.

A la Doctora Janeth Aidé Perea por el tiempo y trabajo dedicado a este proyecto.

A los calificadores por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de este trabajo.

A la empresa Santandereana C.I SACEITES S.A por aportar parte de los materiales requeridos para este proyecto

A nuestros padres, amigos y compañeros que nos acompañaron en nuestras carreras.

A la Universidad Industrial de Santander, nuestra querida institución, por entregarnos conocimiento, sabiduría y alegría

TABLA DE CONTENIDO

| | pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 22 |
| 1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO | 22 |
| 1.2 TRANSESTERIFICACIÓN | 24 |
| 1.3 ANTECEDENTES | 28 |
| 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 34 |
| 2.1 MATERIALES Y REACTIVOS | 34 |
| 2.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS | 36 |
| 2.2.1 Índice de acidez | 36 |
| 2.2.2 Análisis de ácidos grasos en el sustrato PKO | 36 |
| 2.2.3 Determinación del peso molecular promedio del PKO | 37 |
| 2.2.4 Análisis de esteres grasos y acilgliceroles | 37 |
| 2.3 REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN | 37 |
| 2.3.1 Evaluación de las condiciones de reacción | 39 |
| 2.4 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DE DIFUSIÓN EXTERNA | 40 |
| 2.5 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DE DIFUSIÓN INTERNA | 41 |
| 2.6 ESTABILIDAD OPERATIVA | 41 |
| 2.7 CINÉTICA DE LA REACCIÓN | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3. | RESULTADOS | 42 |
| 3.1 | CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCION | 42 |
| 3.2 | EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DIFUSIONALES | 44 |
| 3.3 | EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE REACCIÓN EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO | 45 |
| 3.3.1 | Variable de respuesta Y_1 – Porcentaje de conversión | 47 |
| 3.3.2 | Variable de respuesta Y_2 – Índice de acidez | 52 |
| 3.3.3 | Selección de las condiciones de reacción | 55 |
| 3.4 | ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA | 61 |
| 3.5 | CINÉTICA DE LA REACCIÓN | 62 |
| 3.6 | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 63 |
| 4. | CONCLUSIONES | 72 |
| 5. | RECOMENDACIONES | 73 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 74 |
| | ANEXOS | 83 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco | 23 |
| Tabla 2. Transesterificación enzimática de diferentes aceites | 33 |
| Tabla 3. Características de la lipasa Lipozyme TL IM | 35 |
| Tabla 4. Variables independientes y niveles del diseño | 39 |
| Tabla 5. Puntos del diseño experimental | 40 |
| Tabla 6. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto rotatorio de 2^3 + estrella (CCRD) aplicado en la reacción de alcoholísis | 47 |
| Tabla 7. Coeficientes de regresión del modelo polinomial predichos para la respuesta Y_1 (% de conversión) | 49 |
| Tabla 8. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y_1 (% de conversión) | 51 |
| Tabla 9. Coeficientes de regresión del modelo polinomial predichos para la respuesta Y_2 (Índice de acidez) | 54 |
| Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y_2 (Índice de acidez) | 55 |
| Tabla 11. Rangos entre los cuales se realizó la optimización de las respuestas Y_1 (% de conversión) e Y_2 (Índice de acidez) | 59 |
| Tabla 12. Validación del modelo ajustado | 60 |
| Tabla 13. Transesterificación con enzimas diferentes a la Lipozyme TL,IM | 65 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 14. | Condiciones óptimas finales y comparación con otros trabajo que utilizan Lipozyme TL IM en sistemas libres de solvente | 67 |
| Tabla 15. | Transesterificación química de diferentes aceites | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Fruto de la palma de aceite | 22 |
| Figura 2. Reacción de alcoholólisis | 25 |
| Figura 3. Mecanismo de esterificación catalizada por lipasas | 26 |
| Figura 4. a) Cultivo de <i>Thermomyces lanuginosus</i> b) Soporte de la lipozyme TL, IM | 36 |
| Figura 5. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de Alcoholólisis | 37 |
| Figura 6. Conversión versus tiempo para tres diferentes velocidades de agitación | 44 |
| Figura 7. Efectos de difusión interna para la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas finales | 45 |
| Figura 8. Diagrama de efectos principales para Y_1 (% de Conversión) | 48 |
| Figura 9. Diagrama de pareto para Y_1 (% de Conversión) | 52 |
| Figura 10. Efectos principales para Y_2 (Índice de acidez) | 53 |
| Figura 11. Diagrama de pareto para Y_2 (Índice de acidez) | 54 |
| Figura 12. Superficie de respuesta Y_1 con la temperatura constante en su valor central | 56 |
| Figura 13. Superficie de respuesta Y_1 con la cantidad de enzima constante en su valor central | 56 |
| Figura 14. Superficie de respuesta Y_1 con la agitación constante en su valor central | 57 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 15. | Superficie de respuesta para Y_2 con la temperatura constante en su valor central | 58 |
| Figura 16. | Superficie de respuesta para Y_2 con la agitación constante en su valor central | 58 |
| Figura 17. | Superficie de respuesta para Y_2 con la cantidad de enzima constante en su valor central | 59 |
| Figura 18. | Superficie de respuesta el grado de optimización | 60 |
| Figura 19. | Estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas finales | 62 |
| Figura 20. | Cinética de la reacción de alcoholisis en un sistema en discontinuo | 63 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|--|-------------|
| Anexo A. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en el PKO | 83 |
| Anexo B. Perfil cromatográfico de un producto de la reacción de alcoholisis (62,11 % de ETE's) | 84 |
| Anexo C. Perfil cromatográfico de ETE's preparados a partir del PKO | 85 |
| Anexo D. Perfil cromatográfico de TAG's en el PKO | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza) |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación oficial de químicos analíticos) |
| Asp | <i>Aspartic acid</i> (Ácido aspártico) |
| ASTM | <i>American Society for Testing and Materials</i> (Sociedad Americana de pruebas y materiales) |
| CCRD | <i>Central Composite Rotatable Design</i> (Diseño central compuesto rotatorio) |
| CNO | <i>Coconut Oil</i> (Aceite de coco) |
| ETE´s | Ésteres etílicos |
| FAME´s | <i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos) |
| FID | <i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama) |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases) |
| His | <i>Histidine</i> (Histidina) |
| HRGC | <i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución) |
| HTGC | <i>High Temperature Gas Chromatography</i> (Cromatografía gaseosa de alta temperatura) |
| IU | <i>International Units</i> (unidades internacionales) |
| MAG | Monoacilglicerol |
| NTC | Norma Técnica Colombiana |
| PAG´s | Acilgliceroles parciales (MAG´s + DAG´s) |
| PKO | <i>Palm Kernel Oil</i> (Aceite de palmiste) |
| PO | <i>Palm Oil</i> (Aceite de palma) |
| R² | Coeficiente de determinación |

| | |
|------------|--|
| RDB | <i>Refined, Bleached, Deodorized</i> (Refinado, desodorizado y blanqueado) |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RSM | <i>Response Surface Methodology</i> (Metodología de superficie de respuesta) |
| Ser | <i>Serine</i> (Serina) |
| TAG | Triacilglicerol |

RESUMEN

TÍTULO

ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE ESTERES ETÍLICOS POR TRANSESTERIFICACIÓN, USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE *Thermomyces lanuginosus* ¹

AUTORES

Amado Díaz, María Antonia. Rodríguez Peña, Erick. ²

PALABRAS CLAVES

Alcoholólisis, aceite de Palmiste, ésteres alquílicos, biodiesel, lipasa inmovilizada, diseño experimental.

DESCRIPCIÓN

Para la obtención de ésteres alquílicos por transesterificación de aceites vegetales se han empleado catalizadores químicos que requieren condiciones fuertes de operación, poseen un alto poder de corrosión y presentan dificultades en la recuperación del glicerol y la remoción del catalizador. Las lipasas pueden ser utilizadas como biocatalizadores, estas trabajan en condiciones suaves y medios libres de solventes, son biodegradables y su reutilización es posible si son inmovilizadas.

En este trabajo se llevó a cabo la obtención de ésteres etílicos a partir del aceite de palmiste, empleando como catalizador lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus*. La primera fase del desarrollo experimental consistió en la determinación del peso molecular promedio de un triacilglicerol en el aceite y seguidamente la evaluación de los efectos de difusión interna y externa en el sistema, posteriormente se seleccionaron las mejores condiciones de reacción aplicando un diseño experimental de tres variables por tres niveles, basado en un diseño central compuesto rotatorio de 2³ + estrella, analizado por metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics centurión XV. Finalmente, se realizó la evaluación de la estabilidad operativa de la enzima y la cinética de la reacción.

Se encontró que no se presentan restricciones de difusión interna ni externa en el sistema y que la variable más influyente sobre el porcentaje de conversión es la cantidad de enzima mientras que la agitación lo es sobre el índice de acidez. Las condiciones de reacción seleccionadas (Relación de sustratos 4:1-alcohol:aceite, 9% de enzima con respecto al peso del aceite, 100 rpm y 40 ° C) permiten alcanzar conversiones de 96,7 ± 1,6 % con un índice de acidez de 1,3 ± 0,1. La formación de acilgliceroles parciales es mínima (1,47%) y la enzima presenta buena estabilidad operativa.

¹ Trabajo de Grado

² Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Janeth Aidé Perea V; Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Aristóbulo Centeno Hurtado

SUMMARY

TITLE

STUDY OF THE OBTAINING OF ETHYL ESTERS BY TRANSESTERIFICATION, USING IMMOBILIZED LIPASE OF *Thermomyces lanuginosus*.

AUTHORS

Amado Díaz, Maria Antonia. Rodriguez Peña, Erick.

KEY WORDS

Alcoholysis, palm kernel, fatty acid alkyl esters, biodiesel, immobilized lipase, experimental design.

DESCRIPTION

For the obtaining of alkyl esters by transesterification of vegetal oils, chemical catalysis have been used, this process requires strong operation conditions, and has high corrosion power. It also presents difficulties in the recovery of glycerol and removal of the catalyst. Lipases can be used as biocatalyst, they work in smooth conditions and free solvent mediums, they are biodegradable and its reusability is possible if they are immobilized.

In this work, it was carried out the obtaining of ethyl esters from palm kernel oil, using lipase immobilized of *Thermomyces lanuginosus* as catalyst. First stage of the experimental development was the determination of the average molecular weight of one triacylglycerol in the oil and next, the evaluation of internal and external diffusion effects in the system. Later, the best reaction conditions were selected by applying an experimental design of three variables by three levels, based on a central design compound of $2^3 + \text{star}$, it was analyzed by response surface methodology with aid of the statistical software, Statgraphics centurión XV. Finally, it was evaluated the operative stability of the enzyme and the kinetic of the reaction.

It was found that there are not restrictions of internal nor external diffusion in the system and that the variable that is most influent on the percentage of conversion is the amount of enzyme whereas the agitation is it on the total acid number. The conditions of reaction selected (Substrates relation 4:1- alcohol:oil, 9 % of enzyme with respect to weight of the oil, 100 rpm and 40 ° C) allow to reach $96.7 \pm 1.6\%$ of conversions with a total acid number of $1.3 \pm 0,1$. The formation of partial acylglycerols is minima (1,47%) and the enzyme displays good operative stability.

INTRODUCCIÓN

La palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*), es el cultivo de oleaginosas más productivo por hectárea. Colombia en el 2004, tenía alrededor de 200.000 hectáreas sembradas, las cuales generaron 800.000 toneladas de aceite de palma y 85.000 de aceite de palmiste. De esta producción, se exportó el 25% del aceite de palma y el 50% del aceite de palmiste.

Los aceites de palma y de palmiste son productos muy versátiles y tienen una gran multiplicidad de usos que actualmente se centran en la industria de alimentos (90%). Sin embargo, la creciente preocupación mundial por los asuntos del medio ambiente y el desarrollo de biocombustibles, ha despertado el interés en los aceites vegetales, para ser utilizados en procesos que tradicionalmente se han llevado a cabo a partir de grasas animales o de materias primas de la petroquímica, por ser materias primas naturales, biodegradables, de baja toxicidad y renovables.

A nivel nacional, actualmente, por políticas de estado que favorecen el cultivo de palma africana como reemplazo a los cultivos ilícitos, se ha incrementado el interés por la investigación en el área de la Oleoquímica, industria que tiene un bajo nivel de desarrollo como se deduce de la balanza comercial de exportaciones (3.195 toneladas) e importaciones (27.089 toneladas).

Dentro de los productos importantes de la oleoquímica se encuentran los ésteres alquílicos, los cuales son atractivos para reemplazar el diesel convencional debido a su bajo impacto ambiental. Estos compuestos se pueden obtener por reacciones

de transesterificación entre triacilglicerolos, diacilglicerolos, monoacilglicerolos, ácidos grasos libres y alcoholes de bajo peso molecular.

Como materias primas se han empleado ácidos grasos libres y aceites vegetales. El aceite de palmiste, considerado un aceite láurico, puede ser utilizado como combustible en los motores de diesel convencionales; sin embargo, su alta viscosidad dificulta el proceso de inyección, mientras que, la insaturación de sus cadenas interfiere con su modo de operación. Estos problemas pueden ser solucionados modificando el aceite para la obtención de biodiesel [Barnwal y col., 2005].

Uno de los métodos de modificación, la transesterificación, en este caso, la alcoholisis, ha sido ampliamente estudiada. Puede llevarse a cabo en presencia de catalizadores químicos o enzimáticos. En el caso de la catálisis química el requerimiento de la remoción del catalizador y la gran cantidad de energía necesaria son algunas de las desventajas del proceso, por lo cual, se recomienda el uso de enzimas lipasas como catalizadores alternativos.

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces tipo ester en tri, di y monoacilglicerolos y pueden ser utilizadas con o sin solvente [Gerpen., 2005]. Por lo general son muy efectivas por poseer especificidad de sustrato, de grupo funcional y estereo – especificidad en medio acuoso, además de requerir condiciones de trabajo suaves (bajas temperaturas, presión atmosférica, baja agitación), trabajo sin solventes, biodegradabilidad. Su uso a escala industrial, sin embargo, se ve limitado por su elevado costo.

Recientemente, la Novo Nordisk ha iniciado la comercialización de la lipasa 1,3 estereoespecífica de *Thermomyces lanuginosus* en forma inmovilizada, la cual

puede ser una opción viable, si se tiene en cuenta que su precio en el mercado es seis veces menor que el de las enzimas comerciales utilizadas actualmente (Enzimas de *Mucor miehei* y *Candida antarctica*).

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se abordó el estudio de una reacción de interés industrial como la transesterificación del aceite de palmiste con el etanol, en un sistema en discontinuo libre de solvente, utilizando como catalizador lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL, IM) con el objeto de determinar las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso en un sistema libre de solvente, y alcanzar altos niveles de conversión con bajos índices de acidez. Igualmente, se evaluó la estabilidad operativa de la enzima. El uso de aceite de palmiste como materia prima, usando esta enzima, no ha sido considerado por otros investigadores.

La investigación que se desarrolló a través del Centro de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) y del Centro de Investigación en Catálisis (CICAT), contribuyó a afianzar además la investigación en el área de oleoquímica para transferir y adaptar nuevas tecnologías, aplicar nuevos procesos que pueden ser más económicos por requerir condiciones más suaves y promover el uso de tecnologías limpias, brindándole así más alternativas de desarrollo al sector palmero, uno de los más promisorias del agro colombiano [Bernal., 2005].

El documento presentado se estructuró en 5 capítulos, el primero de ellos basado en la revisión bibliográfica que se realizó sobre el tema. El segundo, presenta el desarrollo experimental llevado a cabo para el logro de los objetivos. En el tercer capítulo se presentan los resultados obtenidos y su comparación con los resultados de otras investigaciones. Finalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones.

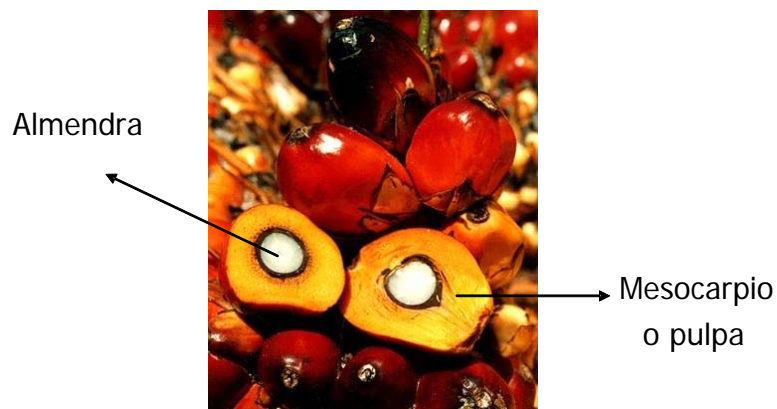
1. MARCO TEÓRICO

1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

Botánicamente a la palma de aceite se le conoce como *Elaeis guineensis*. Es una planta monocotiledónea que pertenece al orden de las *palmales* y a la familia *palmaceae*. Sus frutos (figura 1) están formados por un exocarpio liso y brillante, una pulpa o tejido fibroso que contiene las células con el aceite (mesocarpio), una nuez o semilla compuesta de un cuesco lignificado de grosor variable (endocarpio) y una almendra aceitosa (endospermo) de la cual se extrae el aceite de palmiste.

La palma americana de aceite *Elaeis oleifera* HBK, también conocida como palma nolí, es originaria de diversas regiones del centro y sur de América. Actualmente en Colombia se cultiva un híbrido resultante del cruzamiento de las especies, Palma Africana de aceite con la Palma Americana de Aceite.

Figura 1. Fruto de la palma de aceite



La extracción del aceite de palma (PO) se hace a partir del mesocarpio o pulpa. Este aceite presenta un elevado contenido de carotenoides en su parte insaponificable, lo que le confiere un color rojo-anaranjado. Posee además un fuerte aroma floral. Los ácidos grasos presentes en mayor proporción son el palmítico, linoléico y linolénico (Tabla 1). El aceite de palmiste (PKO) se extrae de la almendra del fruto y su composición es similar a la del aceite de coco (CON) tal como se observa en la tabla 1. El PKO presenta ácidos de cadena intermedia (C₈ - C₁₄), lo cual lo hace atractivo para la industria de detergentes y emulsificantes. Hace parte de los aceites laúricos junto con el de coco y el de babassu.

Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco

| Ácido graso | | Aceite de palma | Aceite de palmiste | Aceite de coco |
|-------------|----------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| Caprónico | (C ₆) | --- | 0,3 | 0,4 |
| Caprílico | (C ₈) | --- | 4,2 | 7,3 |
| Cáprico | (C ₁₀) | --- | 3,7 | 6,6 |
| Laúrico | (C ₁₂) | 0,2 | 48,7 | 47,8 |
| Mirístico | (C ₁₄) | 1,1 | 15,6 | 18,1 |
| Palmítico | (C ₁₆) | 44,1 | 7,5 | 8,9 |
| Oléico | (C _{18:0}) | 4,4 | 1,8 | 2,7 |
| Linoléico | (C _{18:1}) | 39,0 | 14,8 | 6,4 |
| Linolénico | (C _{18:2}) | 10,6 | 2,6 | 1,6 |

1. Centro de investigación en ciencia y tecnología de alimentos

2. Malaysian Palm Oil Board, 2001

Debido a que el PKO es más insaturado que el CON, éste puede ser hidrogenado para obtener una mayor variedad de productos para la industria de alimentos, sector en el cual tiene actualmente la mayor aplicación. Por sus propiedades de fusión, se emplea en la elaboración de fórmulas de confitería, como sustituto de la manteca de cacao, en moldeados de chocolate, coberturas y rellenos de galletas, rellenos de wafers y de tortas. En toffes y caramelos estas grasas se

incorporan para dar textura, cuerpo y riqueza de sabor; se utilizan además en helados y cremas para café no lácteos y en la fabricación de margarina y triglicéridos de cadena media (Volpato., 2004).

Actualmente, el uso del aceite de palmiste se está incrementando en otras áreas como fabricación de jabón, producción de grasas especializadas y producción de oleoquímicos [Pantzaris y Ahmad, 2000]. Los productos oleoquímicos hechos de grasas láuricas incluyen ácidos grasos, glicerina, ésteres, alcoholes grasos, aminas, los cuales, a su vez, sirven de materia prima para la industria de detergentes, productos cosméticos y farmacéuticos. Su importancia creciente radica en provenir de fuentes naturales renovables y ser fácilmente biodegradables.

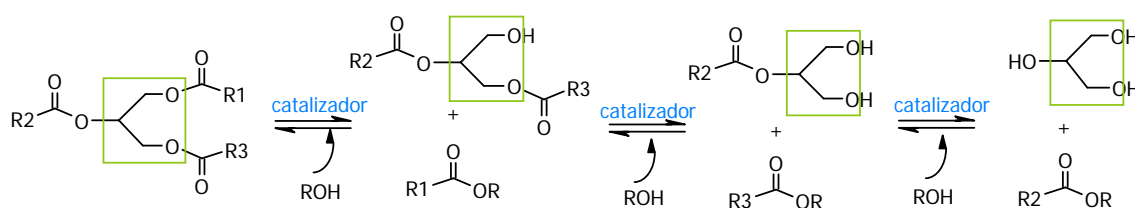
El aceite de palmiste constituye también un combustible alternativo, pero su uso directo en motores de inyección diesel está limitado por algunas de sus propiedades fisicoquímicas, en particular su viscosidad, puesto que ésta es 10 veces mayor que la del diesel convencional. Sin embargo, el aceite puede ser utilizado como materia prima para la fabricación de biodiesel, haciendo uso de cuatro tratamientos para superar estos inconvenientes: dilución, microemulsificación, pirólisis y transesterificación. Este último es el más empleado [Encinar y col., 2001; Fukuda y col., 2001].

1.2 TRANSESTERIFICACIÓN

La transesterificación es una reacción de desplazamiento de un alcohol desde un éster por otro alcohol en un proceso similar a la hidrólisis, pero utilizando alcohol en vez de agua; por esta razón, se le conoce también como alcoholólisis (Figura 1). El resultado de esta reacción es la conversión de los triacilgliceroles en ésteres grasos con la formación de glicerol como subproducto y en ocasiones mono y di-

acilglicerol. Por lo general, esta reacción es utilizada para la producción de ésteres metílicos, etílicos, propílicos o butílicos, y el sustrato depende de los productos que se deseen obtener. [Ma y Hanna., 1999; Dossat., 2002].

Figura 1. Reacción de alcoholisis

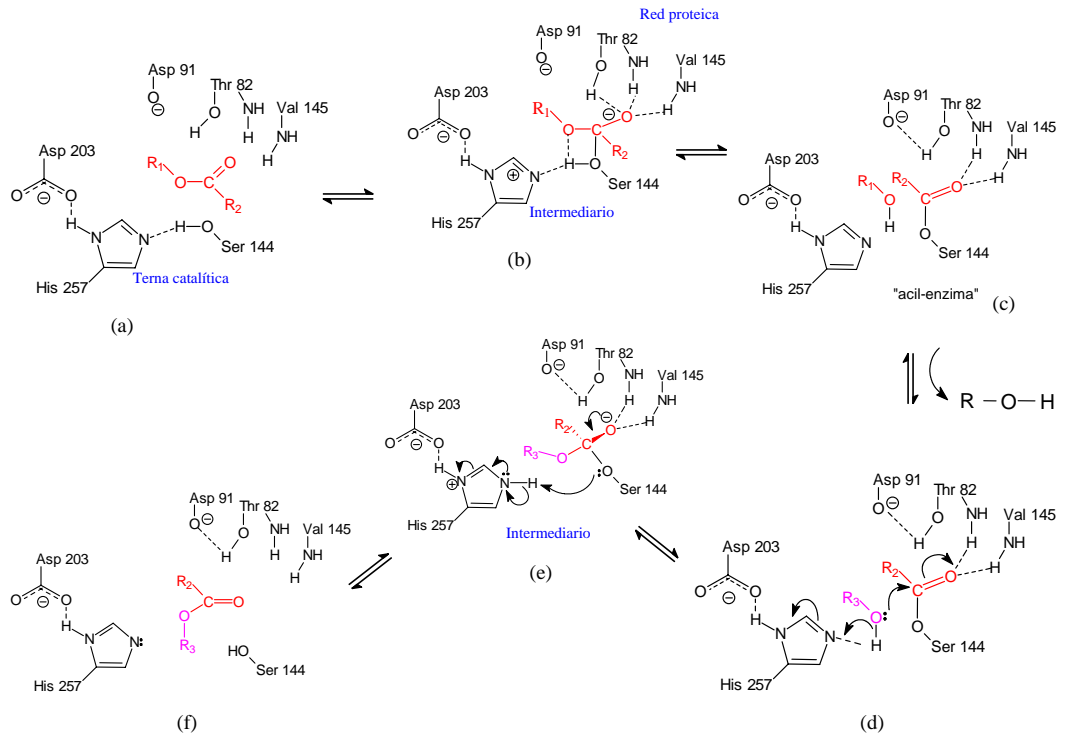


La reacción puede ser catalizada por ácidos, los más utilizados son el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico; también se utilizan catalizadores básicos como hidróxidos y metóxidos de sodio y potasio o enzimas lipasas. Estas últimas actualmente presentan un gran potencial de aplicación por requerir condiciones suaves de reacción, como temperaturas inferiores a 60 °C, presión atmosférica y pH de 4 – 8 [Balcão y col., 1996].

En la naturaleza, las lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilglicéridos a sus correspondientes ácidos grasos y glicerol, mediante reacciones de esterificación e interesterificación, por lo cual, pueden ser utilizadas en síntesis de compuestos quirales, lípidos estructurados, ésteres, etc. [Sharma y col., 2001].

Estas enzimas, provenientes de diferentes microorganismos se encuentran disponibles comercialmente y exhiben una especificidad de sustrato, regioselectividad y estereoselectividad por sus características [Jaeger y col., 2002].

Figura 2. Mecanismo de esterificación catalizada por lipasas



La estructura tridimensional de las lipasas posee un sitio activo formado por una terna Ser-His-Asp/Glu. [Brady y col., 1990 Winkler; y col., 1990]. Durante la esterificación catalizada por lipasas el grupo hidroxilo de la serina se activa inicialmente por una sucesión de desplazamientos de cargas eléctricas las cuales afectan la triada catalítica (a). El mecanismo involucra dos intermediarios tetraédricos, el primero de ellos (b) se forma por un ataque nucleofílico de los pares electrónicos del oxígeno al carbono sp^2 del enlace éster. Posteriormente, la formación del enlace CO (c), conlleva a la liberación del radical alcoxi, el cual toma el protón del ión imidazolio para formar un alcohol libre. Seguidamente, ocurre el ataque de una molécula de alcohol al complejo acil-enzima (d) para dar origen al segundo intermediario tetraédrico (e), el cual finalmente pierde una molécula de éster dejando la enzima en su forma nativa (f). Los dos intermediarios

involucrados en el mecanismo poseen un oxianión que es estabilizado por puentes de hidrógeno [Graille., 1999].

Las enzimas se pueden utilizar en forma soluble o en forma inmovilizada, en este último caso, la estabilidad y el tiempo de uso de estos catalizadores se puede incrementar [Sharma y col., 2001].

Los sistemas que contienen enzimas inmovilizadas deben ser analizados como procesos de catálisis en fase heterogénea, dado que los reactantes y el catalizador se encuentra en fases distintas.

Las reacciones en fase heterogénea se realizan normalmente en tres etapas: (a) transporte del sustrato desde el seno del líquido a la superficie del catalizador, (b) transformación del sustrato en producto y (c) transporte del producto desde la superficie del catalizador al seno del líquido. En éstas se pueden presentar efectos de partición y restricciones difusionales. Los efectos de partición debido a cargas eléctricas son especialmente relevantes, ya que soportes cargados provocan partición de sustratos cargados y de protones [Mosbach., 1976]. Las restricciones difusionales se presentan, debido a que las reacciones enzimáticas generalmente están limitadas por la velocidad de transporte de los sustratos y por lo tanto, su velocidad de transformación a productos estará determinada por el flujo de los mismos.

Las restricciones difusionales pueden ser externas e internas. Las externas son significativas cuando la enzima está localizada en la superficie de un soporte impermeable [Engasse y Horbath., 1976]. Estas restricciones pueden ser despreciables, si existe una buena agitación en la cercanía de la superficie del catalizador. Para sistemas discontinuos, se realizan experimentos donde las

condiciones de la reacción se mantienen constantes y sólo la velocidad de agitación se varía en un rango de velocidades. Si las curvas se superponen, esto indica que no existen limitaciones por difusión externa. Las restricciones difusionales internas pueden ser consideradas cuando la enzima se encuentra inmovilizada en el interior de una partícula, como consecuencia de la baja velocidad de transporte de sustratos (y productos) dentro de una matriz sólida (gel) o a través de una estructura de microporos. Para su determinación a nivel de laboratorio, se mantienen constantes todas las variables de operación (temperatura, cantidad del catalizador, agitación, etc) y se varían progresivamente los tamaños de partícula del catalizador. [Lepage y col., 1987].

1.3 ANTECEDENTES

La transesterificación de aceites vegetales y de grasas animales para la producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos ha sido ampliamente estudiada, puesto que estos compuestos poseen aplicación como agentes aromatizantes, solventes en productos fitosanitarios, surfactantes, sustitutos de grasas y biodiesel [Patente US 5525126A; Patente US 6399800B1; Patente US 6364917B1; Du y col., 2003].

Como fuente de triacilgliceroles para la reacción de alcoholisis han sido utilizados los aceites de soya [Du y col., 2003-2005], de girasol [Soumanou y col., 2003], de palmiste y/o coco [Abigor y col., 2000; Oliveira y col., 2001, Castellanos y col., 2004; Jitputti y col., 2006], de salicornia [Desai., 2006], de jathropa [Shah., 2004], de karanja [Meher., 2005], de joroba [Canoira., 2006], la trioleína [Salis y col., 2003], y aceites usados [Wu y col., 1999 -2003; Shimada y col., 2002].

Además, se utilizan alcoholes sencillos de cadena corta; los más estudiados han sido el metanol³, el etanol⁴, el propanol [Köse y col., 2002], el isopropanol y el 2-butanol, investigados por Nelson y col., [1996], el 1-butanol [Iso y col., 2001; Dossat y col., 2002; Köse y col., 2002; Salis y col., 2003], el alcohol amílico y el alcohol isoamílico, evaluados por Köse y col., [2002].

Como alcohol, tradicionalmente, se utiliza el metanol. Sin embargo, en los últimos años, por los problemas que presenta este reactivo al inactivar la enzima, se han propuesto reacciones en las cuales, el alcohol se adiciona por etapas [Shimada y col., 2002; Wu y col., 2003; Soumanou y col., 2003; Du y col., 2005]. El butanol, también es de uso reciente, con él se alcanzan rendimientos estequiométricos [Salis y col., 2003], pero su costo para realizar los procesos a escala industrial puede limitar su uso.

Screenings realizados por diferentes autores, han permitido determinar que otros alcoholes, que conducen a altos rendimientos en la reacción, son el etanol y el alcohol isoamílico. [Iso y col., 2001; Köse y col., 2002; Castellanos y col., 2004].

Los solventes orgánicos han sido utilizados convencionalmente, aunque también se encuentran resultados de estudios llevados a cabo en sistemas con CO₂ supercrítico y en sistemas libres de solvente, con muy buen desempeño [Oliveira y Oliveira., 2001; Al-Widyan y Al-Shyoukh., 2002; Weber y Mukherjee., 2004].

En cuanto al catalizador, se utilizan catalizadores ácidos, básicos o catalizadores enzimáticos. Dentro de los catalizadores básicos se encuentran alcóxidos,

³ [Crabbe y col., 2001; Shimada y col., 2002; Köse y col., 2002; Meher y col., 2005; Canoira y col., 2006; Zhengy y col., 2006; Jitputti y col., 2006]

⁴ [Abigor y col., 2000; Oliveira y col., 2001; Castellanos y col., 2004; Shah y col., 2004; Nouredini y col., 2005; Torres y col., 2004; Salis y col., 2003; Desai y col., 2006]

hidróxidos y carbonatos de sodio y potasio, sulfatos y nitratos [Schuchardt U. y col., 1998; Boocock y col., 1998; Encinar y col., 2001 y Al-Widyan y Al-Shyoukh., 2002; Meher y col., 2005; Canoira y col., 2006; Zhengy y col., 2006; Jitputti y col., 2006] y dentro de los catalizadores ácidos, el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico [Otera y col., 1993; Al-Widyan y Al-Shyoukh., 2002; Zhengy y col., 2006].

Si se desea producir ésteres alquílicos a partir de aceites usados, en los cuales el contenido de ácidos grasos libres oscila entre el 10 y el 15%, se requiere catálisis ácida. Los ácidos grasos son inhibidores de la reacción, y por tanto, deben ser convertidos en alquilésteres con ayuda de un catalizador ácido.

A nivel nacional se encuentra el trabajo realizado por Jiménez y col., 2005, que utilizan como sustratos aceite de palma y metanol anhidro y un catalizador básico (ZnO), alcanzando conversiones de 11,7 %. Otro trabajo reportado es el de Urresta y Col., 2004, que utilizan para la reacción aceite de palma, etanol y como catalizador un sistema bimetalico (Sn-Ni/ZnO 2%), obteniendo un porcentaje de conversión de 87,6 %.

En general, los rendimientos alcanzados con catalizadores químicos son altos [Meher y col., 2005; Zhengy y col., 2006], pero el catalizador, en sistemas heterogéneos, es removido junto con el glicerol y no puede ser reutilizado. Adicionalmente, la purificación del glicerol, que es un producto secundario de gran importancia, es complicada, pues se requiere remover gran cantidad de material inorgánico [Marchetti y col., 2006]

Las enzimas pueden ser utilizadas como catalizadores alternativos porque poseen especificidad de sustrato, de grupo funcional y estereo-especificidad en medio acuoso [Iso y col., 2001, Jaeger y Eggert., 2002], en un medio con o sin solvente.

Además, no requieren condiciones fuertes de reacción, las temperaturas reportadas en la bibliografía varían de 40 a 70 °C y la reutilización del catalizador es posible si está inmovilizado [Balcão y col., 1996; Salis y col., 2003; Desai y col., 2006].

Las más empleadas en procesos de transesterificación provienen de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *P. cepacia* (Lipase PS), *Burkholderias cepacia*, *Mucor javanicus* (Lipase M), *Candida rugosa* (Lipase AY) *Mucor miehei* (Lipase AY), *Candida antarctica* y *Rhizopus niveus* (Newlase F). [Wu W.H. y col., 1999; Iso y col., 2001; Fukuda y col., 2001; Shimada y col., 2002; Lara y Park., 2003; Soumanou y Bornscheuer., 2003; Hsu y col., 2004; Noureddini y col; 2005].

Investigaciones realizadas por diferentes autores, han mostrado que las lipasas de *Chromobacterium viscosum* inmovilizada en Celite-545, *Pseudomona cepacia*, *Pseudomona fluorescens*, *R. miehei* y *Thermomyces lanuginosus* son las que presentan mayor actividad en las reacciones de alcoholólisis [Noureddini, 2005.; Salis, 2003.; Castellanos, 2004; Soumanou y col., 2003; Iso y col., 2001].

Recientemente, la Novo Nordisk inició la comercialización de la lipasa 1,3-estereoespecífica de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada en sílica gel (Lipozyme TL, IM), la cual puede ser una opción viable para la producción de ésteres alquílicos puesto que su precio en el mercado es mucho menor que el de las enzimas utilizadas actualmente.

A nivel internacional se han reportado varios trabajos, utilizando como catalizador esta enzima. Soumanou y col., 2003 alcanzaron un rendimiento de aproximadamente 60% en la reacción de aceite de girasol y metanol en un sistema libre de solvente, mientras que Wu y col., 2003 y Du y col., 2003-2005,

obtienen rendimientos que superan el 90% utilizando el metanol. A nivel nacional, el empleo de la Lipozyme TL, IM fue referenciado por Castellanos y col., 2004, quienes hicieron un estudio exploratorio, logrando rendimientos del 67%, usando aceite de palmiste y etanol como sustrato.

En la tabla 2, se relacionan los trabajos más recientes sobre obtención de ésteres alquílicos con catálisis enzimática. Factores operacionales como: sistema de agitación, velocidad de agitación, temperatura, relación de sustratos, cantidad de enzima, fueron considerados como relevantes. Todos los trabajos referidos, salvo el realizado por Hsu y col., 2004, se desarrollaron en sistemas en discontinuo a escala de laboratorio.

En esta investigación se empleó aceite de palmiste por ser rico en ácidos grasos de cadena corta y de cadena media; esto puede favorecer algunas de las propiedades del biodiesel, como la viscosidad cinemática, el índice de cetano y el punto de congelación. Knothe y Steidley., 2005, establecen que la naturaleza de los ácidos grasos (tamaño de cadena y grado de insaturación) pueden influir en las características finales de los ésteres alquílicos. Adicionalmente, el PKO es una materia prima asequible, por los incrementos que se están presentando en el cultivo de palma africana en el país.

Como alcohol, se escogió el etanol absoluto, por presentar un alto grado de solubilidad en el aceite comparado con el metanol; como enzima se seleccionó la Lipozyme TL IM, una enzima desarrollada recientemente por Novozymes, de bajo costo y cuya actividad en la reacción de alcoholisis fue evaluada de manera exploratoria, previamente en el grupo de investigación (CICTA), por Castellanos y col., 2004.

Tabla 2. Transesterificación enzimática de diferentes aceites

| =Variables | Foglia (1999) | Abigor (2000) | Oliveira (2001) | | Castellanos (2004) | Shah (2004) | Noureddini (2005) | Salis (2005) | Desai (2006) |
|---|-------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|--|---|---|---|
| Enzima | PS30 | PS30 | a) Lipozyme IM b) Novozym 435 | | Lipozyme IM | Chromobacterium viscosum | <i>Pseudomonas cepacia</i> (PS) | <i>Pseudomonas cepacia</i> (PSD) | a) Lipasa pancreática de porcino b) Lipasa pancreática de porcino inmovilizada |
| Alcohol | Etanol | Etanol | Etanol | | Etanol | Etanol | a) Metanol b) Etanol | 1- Butanol | Metanol |
| Fuente de TAG's | Grasa Usada | a) PKO b) CON | PKO | | PKO | Aceite de Jatropha ² | Aceite de soya | Trioleina | Aceite de salicornia ¹ |
| Relación de sustratos | 4,4:1 | 4:1 | 3:1 | a) 6.5:1 b) 10:1 | 3:1 | 4:1 | a) 7,5:1 b) 15,2:1 | 3:1 | 3:1 |
| Agitación | 200 rpm (shaker) | 150 rpm | 200 rpm | | 200 rpm (propela) | 200 rpm | 700 rpm | 80 oscilaciones /min (shaker horizontal) | Dato no reportado |
| Solvente | --- | --- | n-hexano (0% H ₂ O) | a) SCCO ₂ (5% H ₂ O) b) SCCO ₂ (10% H ₂ O) | --- | --- a) 0 % H ₂ O b) 0,5% H ₂ O | --- a) 0,5 g H ₂ O b) 0,3 g H ₂ O | --- | - Hexano - acetona |
| Temperatura | 38,4 °C | 40 °C | a) 40 °C b) 70 °C | a) 40 °C b) 55 °C | 55 °C | 40 °C | 35 °C | 40 °C | 25 °C |
| Cantidad de enzima | 5 (% peso aceite) | 10 (% peso aceite) | a) 5 b) 20 (% peso aceite) | 5 (% peso aceite) | 6 (% peso aceite) | 15 (% peso aceite) | 4,8 (% peso trioleina) | 1,5 (% peso trioleina) | 28,6 (% peso aceite) |
| Tiempo de reacción | 3 horas | 8 horas | 6 horas | 4 horas | 3 horas | 8 horas | 1 hora | 6 horas | 12 horas |
| Rendimiento (Porcentaje de ésteres) | 74,1% | a) 72% b) 35% | a) 77,5 % b) 54,5 % | a) 26,4 % b) 63,2 % | 62 % | a) 71 % b) 92% | a) 67 % b) 65 % | 100 % | a) 45% b) 55% |

¹La Salicornia es una planta de la familia de las acelgas y las espinacas. Sus semillas contienen un aceite de un apreciable contenido en ácido linoleico.

²Jatropha es un genero que comprende 70 especies que crecen en países tropicales y subtropicales. Sus semillas contienen aceite con un alto contenido de ácido oleico y linoleico.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para evaluar el comportamiento de la Lipozyme TL, IM en la obtención de ésteres etílicos a partir del aceite de palmiste, en un sistema en discontinuo, se aplicó un diseño experimental de tipo central compuesto: 2^3 + estrella, a partir del cual, se estableció el efecto de las variables independientes y de sus interacciones. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron las condiciones de reacción que permitieron obtener altos niveles de conversión y bajos índices de acidez.

Para determinar la estabilidad operativa de la enzima en el sistema, se realizaron reacciones sucesivas en condiciones idénticas, utilizando la misma enzima.

Debido a que la enzima se encuentra inmovilizada en un material microporoso, previamente se realizaron experimentos para determinar la presencia o ausencia de restricciones difusionales, en el sistema utilizado y para dar validez a los rangos utilizados en el diseño experimental.

A continuación, se relacionan los métodos de análisis, y la metodología utilizada en el presente trabajo.

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Para el desarrollo del proyecto se emplearon como sustratos aceite de palmiste refinado grado comestible, suministrado por la Empresa Santandereana de Aceites – SACEITES S.A y etanol del 99,9% de pureza; como catalizador se usó la lipasa

estereoespecífica (sn-1) de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada por adsorción en un soporte de sílice (figura 4), la cual se conoce comercialmente como Lipozyme TL,IM y fue suministrada por Novozyme S.A. Las características de la enzima se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Características de la lipasa Lipozyme TL IM

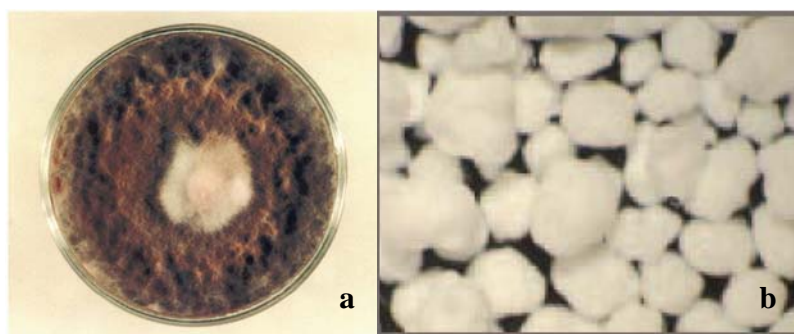
| | |
|---|---|
| Actividad enzimática en base seca | > 250 IUN/g |
| Densidad de carga seca | 450 Kg./m ³ |
| Densidad de carga húmeda | 415 Kg./m ³ |
| Densidad absoluta | 1830 Kg./m ³ |
| % de Humedad | 5.5 % |
| Tamaño de partícula | 300–1000 µm; con la mayor fracción entre 400–600 µm. Las partículas son virtualmente incompresibles |
| <i>*1 IUN (Interesterification Unit Novo) es equivalente a la velocidad inicial de conversión de triestearina en condiciones analíticas estándar.</i> | |

El contenido de agua de equilibrio de la Lipozyme TL IM varía linealmente con la humedad relativa en un rango de 30 – 70 % HR. El cambio en el contenido de agua de equilibrio es del 1% por cada 10% del cambio de la humedad relativa.

En una humedad relativa del 50% la enzima tiene 6% de agua (w/w). Por lo anterior, la enzima se mantuvo almacenada a una humedad relativa por debajo del 70 %.

Para el análisis del aceite y sus productos se utilizaron solventes grado GC.

Figura 4. a) Cultivo de *Thermomyces lanuginosus*
b) Soporte de la lipozyme TL,IM



2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

2.2.1 Índice de acidez (Ia). Se define como los miligramos de KOH necesarios para saturar los ácidos grasos libres contenidos en un gramo de aceite. Su determinación se realizó de acuerdo con el método AOAC 940.20/1990. El índice de acidez se calculó con base en la ecuación 1.

$$Ia = \frac{V \times N \times 56}{pm} \quad (1)$$

2.2.2 Análisis de ácidos grasos en el sustrato PKO. La composición en ácidos grasos del aceite de palmiste fue determinada empleando cromatografía de gases de alta resolución, HRGC. Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de FAMES, analizado bajo las mismas condiciones: *Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1 AMP. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo.

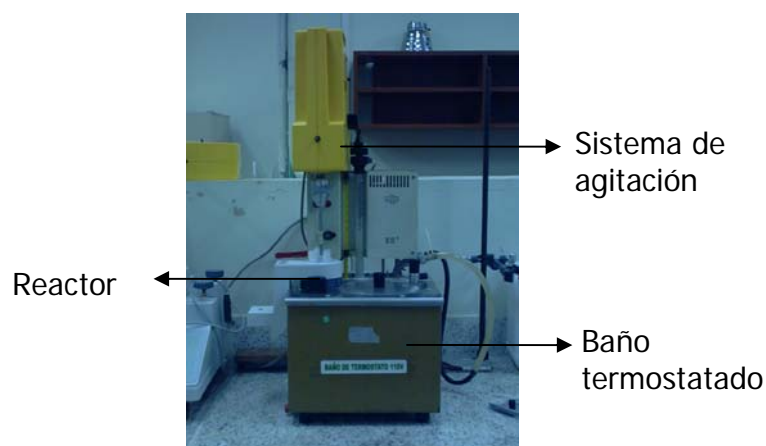
2.2.3 Determinación del peso molecular promedio del PKO. Basados en la composición en ácidos grasos del PKO, que fue establecida por cromatografía de gases como se indicó en 2.2.2, se calculó el peso molecular promedio de los triacilgliceroles que componen el aceite de palmiste.

2.2.4 Análisis de ésteres grasos y acilgliceroles. Los ésteres grasos, mono- di- y triacilgliceroles en los productos de alcoholisis se determinaron simultáneamente empleando cromatografía de gases de alta temperatura, HTGC. Para la identificación de los ésteres se utilizó un patrón de etilésteres preparados con KOH etanólico a partir del aceite de palmiste. Para la cuantificación se utilizó el método del estándar externo.

2.3 REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN

La reacción de transesterificación se llevó a cabo en un reactor batch con capacidad de 100 mL.

Figura 5. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de alcoholisis



Para su calentamiento, se utilizó un baño termostatado que permitió mantener la temperatura constante sobre el total de la masa reaccionante con un margen de error de ± 1 ° C; para su agitación, se utilizó una propela marina con un diámetro de 3 cm, la cual funcionaba por medio de un sistema eléctrico (figura 5). En todas las reacciones se emplearon como sustratos aceite de palmiste y etanol en una relación molar 1:4. Esta relación se escogió teniendo en cuenta que la relación estequiométrica de la reacción es 1:3 (triacilglicerido/alcohol), y que en los estudios realizados por Abigor y col., (2000); Oliveira y Oliveira., (2001); Du y col., (2003); Wu y col., (2003); Castellanos y González., (2004), se recomienda el uso de un ligero exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia la reacción de esterificación.

La enzima fue sometida a un pretratamiento para eliminar el aire y el agua, a fin de prevenir la hidrólisis y asegurar que el aceite penetre los poros del soporte. Para la remoción del aire se aplicó vacío al sistema y para la remoción del agua se realizaron tres lavados con aceite.

Una vez culminado el pretratamiento, la enzima obtenida se mezcló con la cantidad de aceite requerida para la reacción de alcoholólisis y se incubó en un baño termostatado a la temperatura escogida durante 10 minutos, al cabo de los cuales el alcohol fue adicionado, iniciándose el conteo de tiempo de reacción. Una vez finalizada la reacción, se sumergió la mezcla en un baño de hielo para inactivar la enzima, seguidamente se realizó la filtración y el producto de reacción fue almacenado en congelación para su posterior análisis.

Todas las reacciones se llevaron a cabo durante tres horas, sin adición de agua al sistema, teniendo en cuenta que la reacción de alcoholólisis se ve favorecida en

condiciones anhidras como ha sido reportado por Iso y col., 2001; Castellanos y Gonzáles, 2004., Nouredini y col.,2005.

2.3.1. Evaluación de las condiciones de reacción. Para evaluar las condiciones de reacción se empleó como sustrato aceite de palmiste – etanol en relación molar 1:4. Las variables que se analizaron fueron: velocidad de agitación, temperatura de reacción y cantidad de enzima. Los intervalos de ensayo se establecieron con base en los resultados obtenidos por Soumanou y Bornscheuer., 2003; Du y col., 2003; Wu y col., 2003; Castellanos y Gonzáles., 2004. En la tabla 4, se presentan los rangos evaluados.

Tabla 4. Variables independientes y niveles del diseño

| Variable independiente | Símbolo | Código de los niveles | | |
|---|----------------|-----------------------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| Agitación [rpm] | X ₁ | 100 | 150 | 200 |
| Cantidad de enzima [% peso aceite] ¹ | X ₂ | 3 | 6 | 9 |
| Temperatura [°C] | X ₂ | 40 | 50 | 60 |

¹ Porcentaje en peso con respecto al aceite

La variable de respuesta escogida, se definió como el porcentaje de conversión (Y₁). Una segunda variable de respuesta (Y₂), el índice de acidez, permite estimar el contenido de ácidos grasos libres en la reacción.

La influencia de cada una de las variables y su interacción con la conversión y el índice de acidez de la reacción, se estudió utilizando un diseño experimental de tres variables por tres niveles (tabla 4), basado en un diseño central compuesto rotatorio de 2³ + estrella (CCRD), utilizando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS

Centurión XV para Windows. Los puntos del diseño CCRD se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Puntos del diseño experimental

| Experimento | Agitación | Cantidad de enzima [% peso aceite] | Temperatura [°C] |
|-------------|------------------|------------------------------------|------------------|
| 1 | 150 | 6 | 67 ¹ |
| 2 | 150 | 11.04 ¹ | 50 |
| 3 | 200 | 9 | 40 |
| 4 | 150 | 0.95 ¹ | 50 |
| 5 | 200 | 3 | 60 |
| 6 | 100 | 3 | 40 |
| 7 | 234 ¹ | 6 | 50 |
| 8 | 150 | 6 | 33 ¹ |
| 9 | 150 | 6 | 50 |
| 10 | 66 ¹ | 6 | 50 |
| 11 | 100 | 9 | 40 |
| 12 | 100 | 3 | 60 |
| 13 | 150 | 6 | 50 |
| 14 | 200 | 3 | 40 |
| 15 | 100 | 9 | 60 |
| 16 | 150 | 6 | 50 |
| 17 | 200 | 9 | 60 |

¹ Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad.

2.4 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DE DIFUSIÓN EXTERNA

Para evaluar las restricciones de difusión externa, se realizaron tres experimentos variando la velocidad de agitación en un rango de 100 a 200 rpm, a las condiciones operacionales seleccionadas en el diseño experimental: cantidad de enzima, 9%; temperatura, 50 °C. Se realizó el seguimiento de la reacción durante tres horas para construir las curvas que permitieran identificar la presencia de problemas de difusión externa.

2.5 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DE DIFUSIÓN INTERNA

Para evaluar las restricciones de difusión interna, la enzima fue tamizada obteniéndose cuatro rangos de tamaños de partícula diferentes, usando tamices de la serie Tayler número 20, 30, 40 y 50 con aberturas de malla de 850, 600, 425, 370 μm respectivamente. Cada una de las fracciones de enzima obtenidas se utilizó para llevar a cabo las reacciones con las condiciones escogidas en el diseño experimental, durante un periodo de tres horas.

2.6 ESTABILIDAD OPERATIVA

La enzima se utilizó en forma sucesiva en varias reacciones de alcoholisis realizadas bajo los mismos parámetros operacionales, empleando las condiciones de agitación, temperatura y cantidad de enzima seleccionadas con el diseño experimental. Para cada lote se determinó el porcentaje de conversión y el índice de acidez. El proceso se llevó a cabo las veces necesarias para obtener un cambio significativo en la actividad enzimática, lo cual se traduce en la variación del rendimiento de la reacción.

2.7 CINÉTICA DE LA REACCIÓN

Una vez seleccionadas las condiciones de operación adecuadas para la obtención de los ésteres etílicos, se realizó el seguimiento de la reacción en el tiempo, con el fin de evaluar las variaciones de composición en la masa reaccionante. Para esto, se tomaron muestras a los 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos.

3. RESULTADOS

En este apartado se presentan, en primer lugar, los resultados concernientes a la caracterización de los sustratos y de los productos de la reacción, en cuanto a su contenido de ácidos grasos, etil-ésteres, mono-, di- y triacilglicerol respectivamente. En segundo lugar, se evalúan los efectos difusionales internos y externos del sistema en discontinuo. En tercer lugar, se relacionan y analizan los resultados obtenidos al aplicar un diseño experimental para establecer las condiciones de reacción de alcoholólisis en un sistema en discontinuo a escala de laboratorio, que permiten alcanzar altos niveles de conversión. En las condiciones seleccionadas se evalúa la estabilidad operacional de la enzima *Thermomyces lanuginosus* (*Lipozyme TL, IM*), así como la cinética de la reacción. Finalmente, se realiza una comparación de los resultados obtenidos con los reportados por otros autores, para la obtención de ésteres alquílicos.

3.1 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCION

Para establecer la pureza y calidad del aceite de palmiste utilizado como sustrato se analizó su composición en ácidos grasos. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en el anexo A. Con base en la abundancia de cada uno de los ácidos grasos, se calculó el peso molecular promedio de un triacilglicerol en el PKO. Este peso se utilizó como base para encontrar la cantidad de alcohol requerida para tener una relación molar 1:4 (aceite - alcohol).

Otro parámetro evaluado en el aceite de palmiste fue el índice de acidez. Su determinación fue requerida para garantizar que el aceite utilizado no interfiera

con la actividad de la lipasa, pues un exceso de acidez podría inactivarla irreversiblemente. El índice de acidez determinado para el PKO fue de 0,14.

Tanto la composición en ácidos grasos como el índice de acidez del aceite de palmiste empleado, se encuentran dentro de los parámetros dados por la norma NTC 260, para un aceite refinado.

El etanol, segundo sustrato que participa en la reacción de transesterificación, presentó un índice de acidez de 0,013%. Su solubilidad en el rango de temperatura utilizado en este estudio fue de 3,31 g de alcohol/g de aceite. Este efecto, favorece el contacto entre los sustratos y la enzima y, por tanto, una mejor expresión de la actividad catalítica.

Los productos obtenidos en cada una de las reacciones fueron analizados utilizando HTGC, como se especificó en el numeral 2.2.4. Los componentes se clasificaron en tres grupos: ésteres etílicos (ETE's), mono y diacilgliceroles identificados como acilgliceroles parciales (PAG's), y triacilgliceroles (TAG's).

En el anexo B, se muestra el perfil cromatográfico de uno de los productos obtenidos con la diferenciación de las zonas de los grupos identificados.

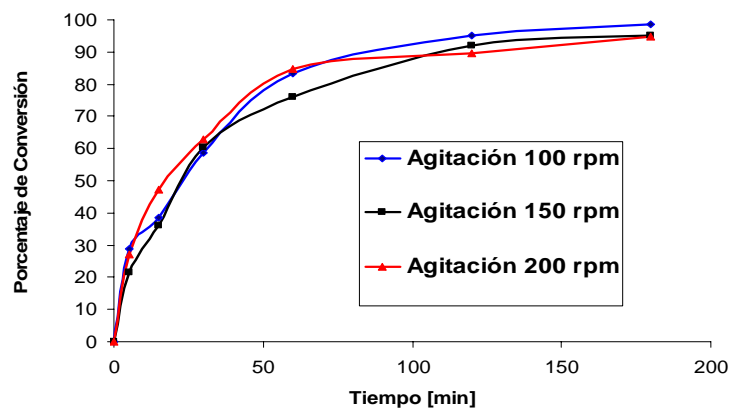
Para la identificación de la zona de ETE's se empleó un patrón de ésteres etílicos preparados a partir del aceite de palmiste y para la de los triacilgliceroles un patrón de aceite de palmiste.

En los anexos C y D, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos.

3.2 EVALUACION DE LAS RESTRICCIONES DIFUSIONALES

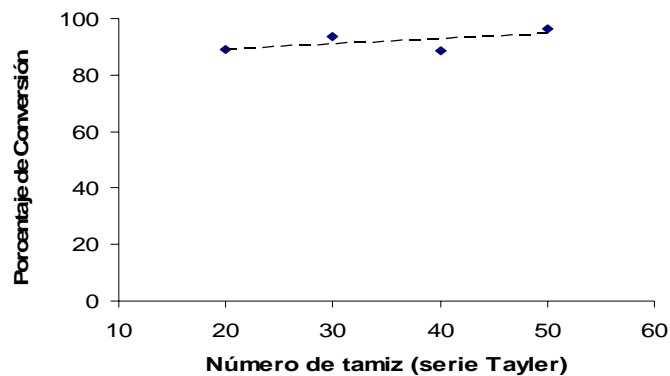
Para indagar la existencia de restricciones difusionales en el sistema en discontinuo, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero se evaluaron las restricciones difusionales externas. Para ello se realizó el seguimiento de la reacción de alcoholísis en el tiempo, en un reactor batch, utilizando tres velocidades de agitación diferentes y manteniendo constantes la cantidad de enzima (9 %) y la temperatura (50 °C). Las curvas construidas a partir de los datos obtenidos (Figura 6) indican que no existen diferencias significativas en la producción de ésteres, al variar la velocidad de agitación en el rango estudiado (100-200 rpm); por lo cual, se puede inferir que no se presentan restricciones difusionales externas.

Figura 6. Conversión versus tiempo para tres diferentes velocidades de agitación



En el caso de las restricciones difusionales internas, como se mencionó en el apartado 2.5, la enzima se tamizó a cuatro rangos de tamaños y se empleó para realizar cuatro reacciones a 50 °C, con una cantidad de enzima de 9 % y una agitación de 100 rpm. En la figura 7 se reflejan los resultados obtenidos.

Figura 7. Efectos de difusión interna para la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas finales



En la gráfica se observa que las reacciones de alcoholisis realizadas presentan como tendencia una línea recta con pendiente cercana a cero, indicando que la reacción está limitada por la capacidad catalítica de la enzima (control cinético) y no por la velocidad de transporte del sustrato desde el seno del líquido a la superficie del catalizador (control por transporte).

Por esta razón, se concluye que no se presentan efectos de restricciones difusionales internas y, por tanto, la enzima puede ser utilizada tal como la provee el fabricante.

3.3 EVALUACION DE VARIABLES DE LA REACCION EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO

Para evaluar las variables de la reacción (agitación, cantidad de enzima y temperatura) sobre el porcentaje de conversión y el índice de acidez, se utilizó un diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta, como se

describió en el numeral 2.3.1. Para el análisis de los valores obtenidos se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurión XV, y se realizó como sigue:

- a) Evaluación del *diagrama de efectos principales* en el cual se destaca la influencia que tiene cada variable en forma individual sobre las variables de respuesta de la reacción de alcoholisis.
- b) *Desarrollo de un modelo matemático* que relaciona cada variable de respuesta con las variables independientes y determinación por medio del método Gauss-Newton de los respectivos coeficientes de regresión.
- c) *Análisis de varianza (ANOVA)* para mostrar los efectos que tienen significancia estadística y utilización del diagrama de Pareto, donde se muestran los efectos en el orden decreciente de importancia.
- d) *Desarrollo gráfico de las superficies de respuesta*, las cuales permiten visualizar los efectos de las interacciones entre las variables.

Con base en los resultados de los anteriores análisis, se determinó la combinación de variables que permite maximizar la cantidad de ésteres etílicos obtenidos en la reacción y minimizar la cantidad de ácidos grasos libres, esto teniendo en cuenta que la remoción de estos últimos resulta costosa y su presencia puede además inactivar la enzima irreversiblemente.

En la tabla 6, se muestran los resultados de la ejecución del diseño experimental.

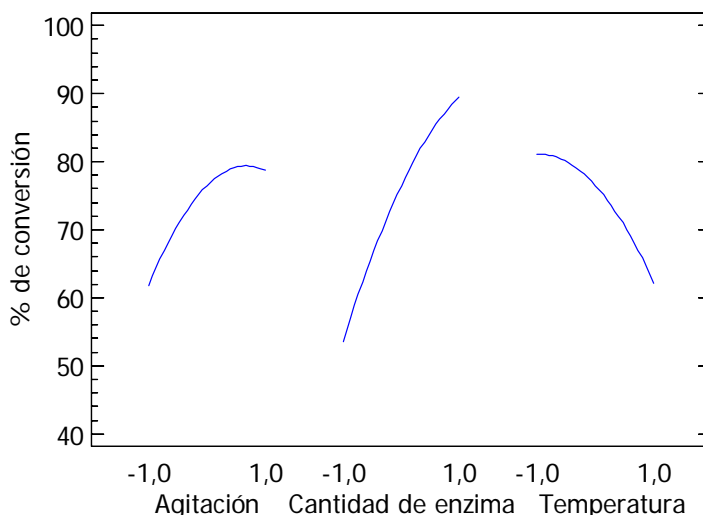
Tabla 6. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto rotatorio de $2^3 +$ estrella (CCRD) aplicado en la reacción de alcoholisis y resultados de conversión e índice de acidez.

| Experimento | Agitación | Cantidad de enzima [%wt aceite] | Temperatura [°C] | Y ₁ Conversión (%) | Y ₂ Índice de acidez |
|-------------|------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 150 | 6 | 67 ¹ | 70,1 | 2,60 |
| 2 | 150 | 11.04 ¹ | 50 | 95,9 | 1,4 |
| 3 | 200 | 9 | 40 | 98,4 | 1,6 |
| 4 | 150 | 0.95 ¹ | 50 | 37,6 | 0,66 |
| 5 | 200 | 3 | 60 | 29,4 | 1,7 |
| 6 | 100 | 3 | 40 | 58,9 | 0,98 |
| 7 | 234 ¹ | 6 | 50 | 95,9 | 3,8 |
| 8 | 150 | 6 | 33 ¹ | 64,5 | 1,6 |
| 9 | 150 | 6 | 50 | 72,1 | 1,4 |
| 10 | 66 ¹ | 6 | 50 | 30,8 | 1,1 |
| 11 | 100 | 9 | 40 | 97,8 | 1,3 |
| 12 | 100 | 3 | 60 | 23,3 | 0,84 |
| 13 | 150 | 6 | 50 | 75,7 | 1,2 |
| 14 | 200 | 3 | 40 | 43,9 | 0,64 |
| 15 | 100 | 9 | 60 | 46,3 | 0,88 |
| 16 | 150 | 6 | 50 | 80,1 | 1,1 |
| 17 | 200 | 9 | 60 | 61,3 | 2,8 |

¹ Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad

3.3.1. Variable de respuesta Y₁ – porcentaje de conversión. En la figura 8 se muestra el diagrama de efectos principales para Y₁. En él, la variable de respuesta se presenta como función de cada variable independiente, desde su nivel más bajo al más alto, mientras que los otros permanecen constantes en sus valores centrales. La tendencia de cada línea refleja la influencia positiva o negativa de cada variable y la pendiente permite establecer la evolución de la conversión en el rango de los niveles evaluados.

Figura 8. Diagrama de efectos principales para Y_1 (% de Conversión)



Se observa que la agitación y la cantidad de enzima tienen un efecto positivo, es decir, la conversión aumenta a medida que estos factores avanzan del nivel más bajo al nivel más alto. Este incremento, sin embargo, en el caso de la agitación, no es lineal, a partir de un valor entre el nivel central (150 rpm) y el nivel superior (200 rpm) la conversión tiende a permanecer constante.

En el caso de la cantidad de enzima, se observa una relación más directa a lo largo de los niveles evaluados. De esta forma, al incrementarse los niveles de enzima aumenta la conversión aún cuando al acercarse a los niveles más altos la pendiente de la curva disminuye. Con la variable temperatura, se observa un efecto negativo. En este caso el porcentaje de ésteres producidos disminuye con el incremento de este parámetro, tal como se puede corroborar con los datos obtenidos en los experimentos 15 y 17 del diseño experimental (anexo K), en donde se utilizó un 9 % de enzima y solo se obtuvieron valores de Y_1 correspondientes al 46,3 y 61,3 respectivamente, para valores de temperatura de 60 °C en ambos casos.

El análisis anterior, sólo permitió establecer el efecto de cada una de las variables independientes manteniendo las otras constantes, por lo cual, para establecer el efecto de las interacciones entre ellas, los valores obtenidos experimentalmente (Tabla 6) fueron analizados utilizando el programa de análisis estadístico *Statgraphics*. En la tabla 7, se indican los coeficientes de regresión obtenidos por el método de Gauss-Newton para el porcentaje de conversión.

Tabla 7. Coeficientes de regresión del modelo polinomial predichos para la respuesta Y_1 (% de conversión)

| Términos | | Coeficientes | | R^2 | Varianza Explicada (%) |
|---|-----------------------|--------------|-------|-------|------------------------|
| Lineal | A: Agitación | β_0 | 76,46 | 0,81 | 64,88 |
| | B: Cantidad de enzima | β_1 | 8,52 | | |
| | C: Temperatura | β_2 | 18,03 | | |
| | | β_3 | -9,49 | | |
| Cuadrático | A*A | β_4 | -6,18 | 0,03 | 6,02 |
| | B*B | β_5 | -4,97 | | |
| | C*C | β_6 | -4,79 | | |
| Interacciones | A*B | β_7 | 3,06 | 0,02 | 4,09 |
| | A*C | β_8 | 4,45 | | |
| | B*C | β_9 | -4,83 | | |
| Coficiente de determinación (R^2) Total | | | | 0,87 | 74,99 |

El modelo predicho corresponde a un polinomio de segundo orden (Ecuación 3), que tiene la siguiente forma general:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

donde β_0 , β_i , β_{ii} , y β_{ij} son los coeficientes de regresión predichos para el intercepto, los términos lineales, los términos cuadráticos y los de interacción, que mejor

ajustan el modelo polinómico a los valores medidos para la respuesta Y_1 . X_n representa las variables independientes.

El modelo predicho para la reacción de alcoholisis es como aparece a continuación:

$$(Y_1) = 76,46 + (8,52)(A) + (18,03)(B) - (9,49)(C) - (6,18)(A^2) + (3,06)(A)(B) + (4,45)(A)(C) - (4,97)(B^2) - (4,83)(B)(C) - (4,79)(C^2) \quad (4)$$

Los términos lineales (A, B y C) presentan la mayor contribución a la variable de respuesta, siendo el más importante de ellos la cantidad de enzima, mientras que los términos cuadráticos y de interacción fueron menos significativos, ya que solo contribuyen a la explicación del modelo en un 10.11 %. El coeficiente de determinación (R^2) para la variable de respuesta fue de 0,87.

Posteriormente, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA), el cual permite establecer la variación debida a los diferentes factores, a la interacción entre ellos, al efecto de cada factor al cuadrado y a la variación aleatoria debida a errores experimentales (error total) con su respectiva significancia.

Para ello, se debe comparar la suma de cuadrado medio (SCM) de dichos efectos con el cuadrado medio del error total (CME), con el fin de obtener el valor F, el cual se utiliza para establecer si los valores estimados para la varianza difieren significativamente (Tabla 8).

En este caso, solo un efecto, la cantidad de enzima, posee un valor de P menor de 0,05, mostrando con ello que es significativamente diferente de cero en un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 8. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y_1 (% de conversión)

| Variable | Suma de cuadrados (SC) | Suma Cuadrado medio (SCM) | Relación F | Valor P |
|------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| A: Agitación | 991,2 | 991,2 | 2,7 | 0,14 |
| B: Cantidad de enzima | 4441,7 | 4441,7 | 12,1 | 0,01 |
| C: Temperatura | 1229,8 | 1229,8 | 3,4 | 0,11 |
| AA | 431,2 | 431,2 | 1,2 | 0,31 |
| AB | 74,9 | 74,9 | 0,2 | 0,67 |
| AC | 158,6 | 158,6 | 0,4 | 0,53 |
| BB | 278,3 | 278,3 | 0,8 | 0,41 |
| BC | 186,4 | 186,4 | 0,5 | 0,50 |
| CC | 258,3 | 258,3 | 0,7 | 0,43 |
| Error total | 2567,4 | 366,8 | | |

F: prueba de significancia

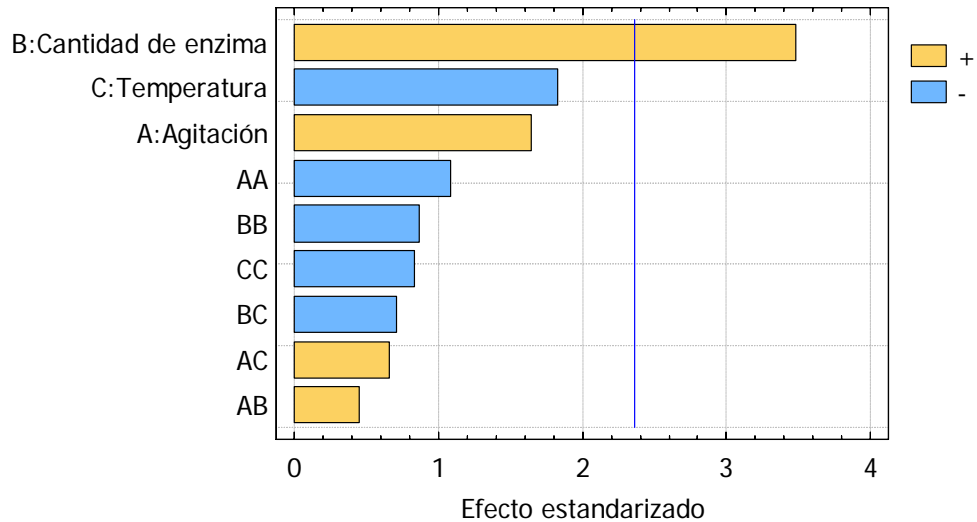
P: probabilidad de error

Los resultados obtenidos se corroboran con el diagrama de Pareto (figura 9), donde se muestra cada efecto en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar).

Las barras que se extienden mas allá de la línea azul corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95 %. Los efectos señalados con amarillo inciden favorablemente sobre el porcentaje de conversión y los que aparecen en azul poseen una incidencia desfavorable sobre el mismo.

En este estudio la cantidad de enzima incide en forma significativa sobre el porcentaje de conversión. Los efectos cruzados de las interacciones entre variables no son significativos.

Figura 9. Diagrama de pareto para Y_1 (% de Conversión)

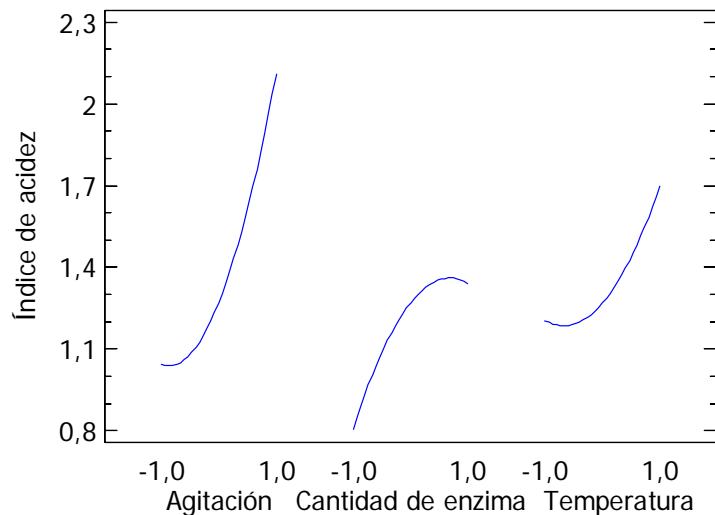


3.3.2 Variable de respuesta Y_2 (índice de acidez). Para evaluar los efectos de las diferentes variables independientes, sobre el índice de acidez se aplicó la misma metodología señalada anteriormente para la conversión. Aquí el diagrama de efectos principales (Figura 10) muestra una fuerte influencia de la agitación. A valores altos de esta variable se obtienen elevados índices de acidez y a medida que se acerca al nivel más bajo (100 rpm) la acidez disminuye hasta un punto a partir del cual tiende a alcanzar un valor constante.

El efecto de la cantidad de enzima y de la temperatura es menos pronunciado. En el primer caso, el efecto es positivo hasta un valor medio, a partir del cual el índice de acidez tiende a ser constante, esto debido probablemente a que la enzima posee actividad esterificante e hidrolizante y, por tanto, al aumentar la disponibilidad de sitios activos se favorecen las dos reacciones aunque en proporciones diferentes, según sean controladas otras variables tales como humedad, temperatura, agitación, etc. En el caso de la temperatura, el índice de

acidez en niveles bajos (menor temperatura), es constante, mientras que a temperaturas más altas se favorece la reacción de hidrólisis.

Figura 10. Efectos principales para Y_2 (Índice de acidez)



En cuanto al modelo matemático predicho para el índice de acidez, se obtuvieron los coeficientes de regresión mostrados en la tabla 10, y la ecuación 5.

$$\begin{aligned}
 (\text{Índice de acidez}) = & 1,27 + (0,53)(A) + (0,27)(B) + (0,25)(C) + (0,31)(A^2) + (0,21)(A)(B) \\
 & + (0,35)(A)(C) - (0,20)(B^2) - (0,02)(B)(C) + (0,18)(C^2)
 \end{aligned} \tag{5}$$

Al igual que con la variable conversión, los términos lineales (A, B y C) presentan la mayor contribución a la variable de respuesta, pero en este caso los términos cuadráticos contribuyen con un valor importante a la explicación del modelo (21.27 %), mientras que los términos de interacción fueron los menos significativos. El coeficiente de determinación (R^2) para la respuesta fue de 0,92 (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficientes de regresión del modelo polinomial predichos para la respuesta Y_2 (Índice de acidez)

| Términos | | Coeficientes | | R^2 | Varianza Explicada (%) |
|---|-----------------------|--------------|-------|-------|------------------------|
| Lineal | A: Agitación | β_0 | 1,27 | 0,71 | 50,67 |
| | B: Cantidad de enzima | β_1 | 0,53 | | |
| | C: Temperatura | β_2 | 0,27 | | |
| | | β_3 | 0,25 | | |
| Cuadrático | A*A | β_4 | 0,31 | 0,14 | 21,27 |
| | B*B | β_5 | -0,20 | | |
| | C*C | β_6 | 0,18 | | |
| Interacciones | A*B | β_7 | 0,21 | 0,07 | 12,06 |
| | A*C | β_8 | 0,35 | | |
| | B*C | β_9 | -0,02 | | |
| Coefficiente de determinación (R^2) Total | | | | 0,92 | 84,00 |

Al aplicar el ANOVA a esta variable de respuesta (tabla 10), se observa que solamente la agitación, posee un valor de P inferior a 0,05 indicando que es significativamente diferente de cero en un nivel de confianza del 95,0 %. Las demás variables no influyen significativamente, al igual que sus interacciones. Este mismo resultado se ve reflejado en el diagrama de Pareto (Figura 11)

Figura 11. Diagrama de pareto para Y_2 (Índice de acidez)

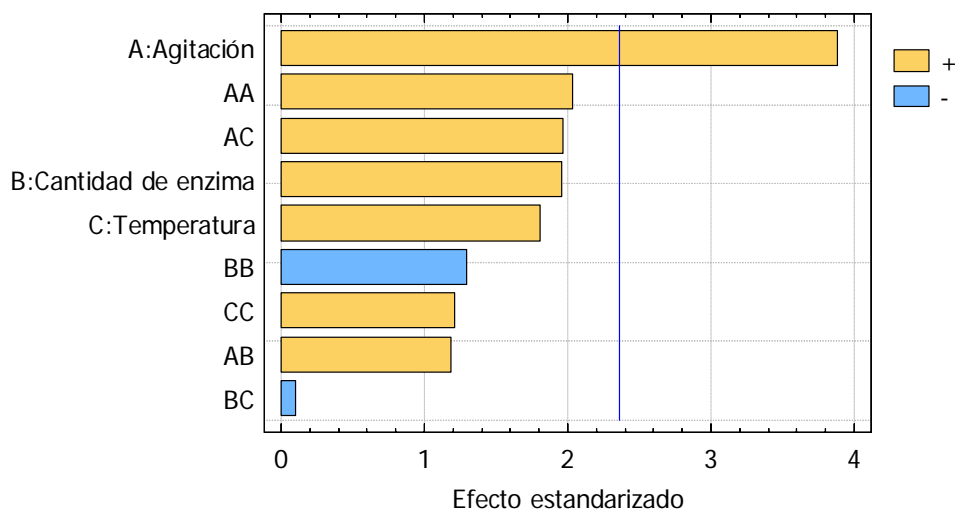


Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y₂ (Índice de acidez)

| Variable | Suma de cuadrados | Cuadrado promedio | Relación F | Valor P |
|-----------------------|-------------------|-------------------|------------|---------|
| A: Agitación | 3,88 | 3,88 | 15,1 | 0,006 |
| B: Cantidad de enzima | 0,98 | 0,98 | 3,8 | 0,092 |
| C: Temperatura | 0,84 | 0,84 | 3,3 | 0,114 |
| AA | 1,06 | 1,06 | 4,1 | 0,082 |
| AB | 0,36 | 0,36 | 1,4 | 0,275 |
| AC | 0,99 | 0,99 | 3,9 | 0,090 |
| BB | 0,43 | 0,43 | 1,7 | 0,237 |
| BC | 0,0024 | 0,002 | 0,01 | 0,925 |
| CC | 0,38 | 0,38 | 1,5 | 0,265 |
| Error total | 1,80 | 0,26 | | |

F = prueba de significancia

P = probabilidad de error

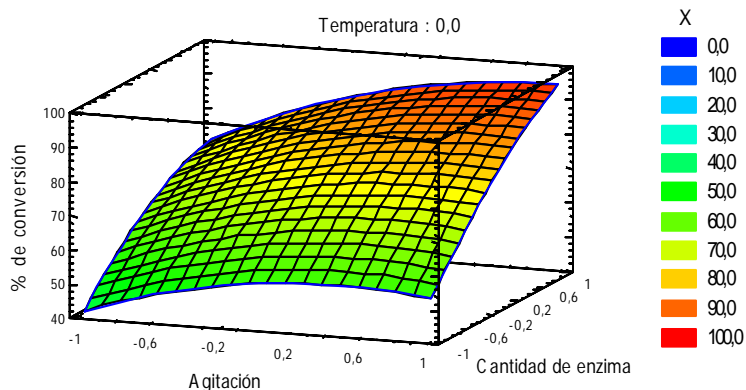
Con base en lo anteriormente presentado en este apartado, se establece que en la reacción de alcoholólisis en un sistema en discontinuo, la cantidad de enzima tiene una incidencia significativa a nivel del 95,0 %, sobre la conversión, mientras que la agitación la tiene sobre el índice de acidez.

3.3.3 Selección de las condiciones de reacción. Para seleccionar las condiciones de reacción que lleven a obtener altos niveles de producción de ésteres y bajos niveles de acidez, a partir de la ecuaciones 4 y 5, se construyeron las graficas de superficie de respuesta que permiten evaluar la interacción entre dos variables manteniendo la otra constante y su efecto sobre la conversión.

En la figura 12, se presenta la superficie de respuesta obtenida al graficar la influencia de la agitación y de la cantidad de enzima manteniendo la temperatura constante en su valor central. Los valores más altos de porcentaje de conversión

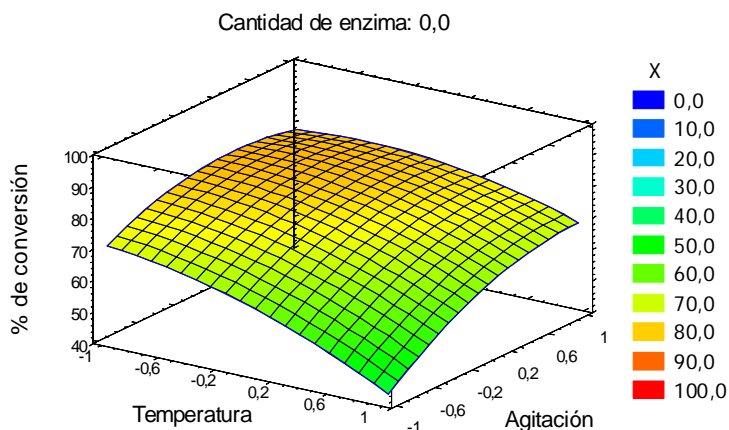
se alcanzan cuando en la reacción se emplea la mayor cantidad de enzima (9 %) y valores de agitación superiores a 150 rpm.

Figura 12. Superficie de respuesta Y_1 con la temperatura constante en su valor central



Adicionalmente, los perfiles de las curvas creadas por la superficie, permiten ver que la pendiente es más pronunciada con los cambios en la cantidad de enzima que con los cambios de agitación, lo cual corrobora que la cantidad de enzima es determinante para alcanzar altos niveles de conversión. En la figura 13 los efectos combinados de agitación y temperatura no son significativos, las pendientes son poco pronunciadas y los cambios en la variable de repuesta para los diferentes niveles de las variables no son apreciables.

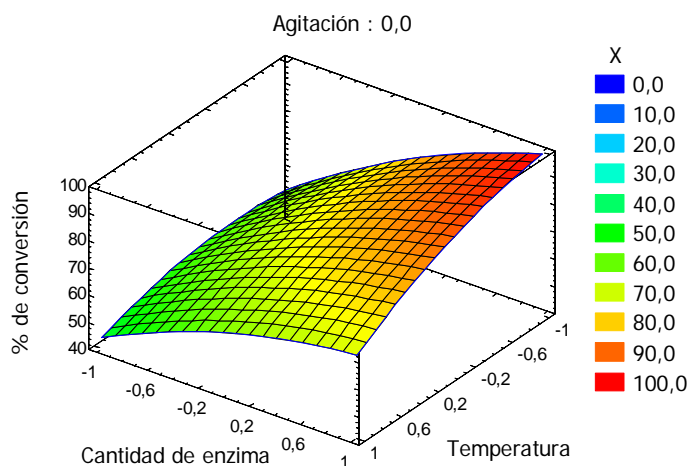
Figura 13. Superficie de respuesta Y_1 con la cantidad de enzima constante en su valor central



Si se analiza la influencia de la cantidad de enzima y la temperatura manteniendo la agitación constante en su valor central, se establece que para lograr valores altos de conversión es necesario utilizar altas cantidades de enzima y rangos de temperatura entre los 40 y 50 °C (figura 14).

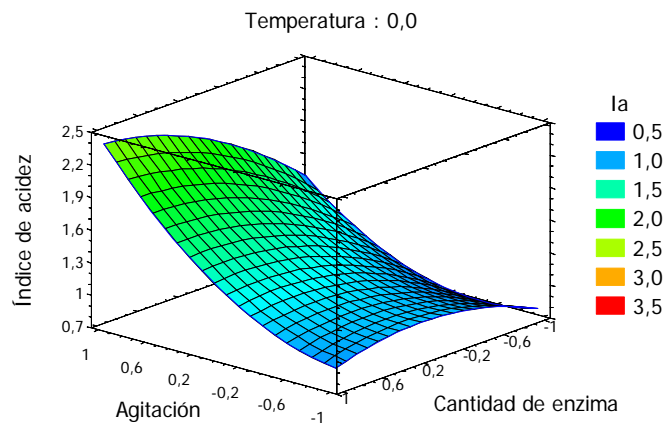
Los valores óptimos de conversión se desplazan a la zona de más baja temperatura (40 °C), mientras que en la zona de mayor temperatura se obtienen bajos niveles de conversión. Esta tendencia probablemente es consecuencia de la inactivación térmica que puede sufrir la enzima.

Figura 14. Superficie de respuesta Y_1 con la agitación constante en su valor central



Este mismo análisis aplicado para ver el efecto de las variables independientes sobre el índice de acidez, muestran una marcada tendencia a bajos índices de acidez al disminuir la agitación, tal como se muestra en la superficie de respuesta obtenida al graficar la influencia de la agitación y la cantidad de enzima, manteniendo la temperatura constante (figura 15).

Figura 15. Superficie de respuesta para Y_2 con la temperatura constante en su valor central



En el caso de la temperatura y la cantidad de enzima, manteniendo la agitación constante, se observa que a bajos valores de temperatura y de cantidad de enzima el índice de acidez disminuye. (Figura 16), mientras que las altas temperaturas combinadas con velocidades de agitación por encima de 150 rpm originan índices de acidez altos en los productos de reacción (Figura 17).

Figura 16. Superficie de respuesta para Y_2 con la agitación constante en su valor central

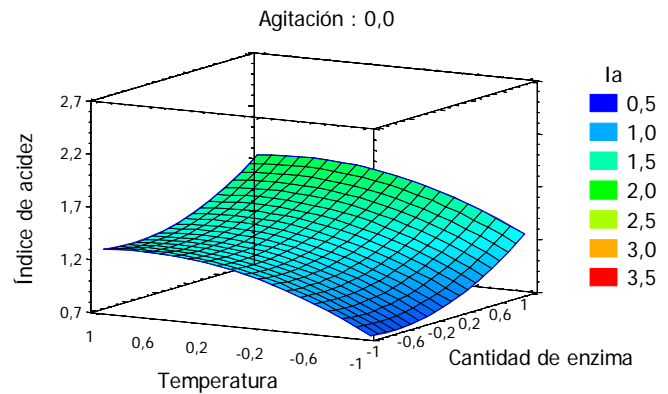
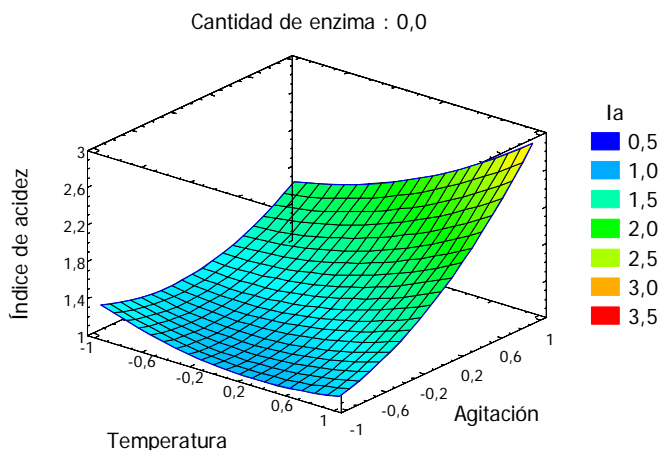


Figura 17. Superficie de respuesta para Y_2 con la cantidad de enzima constante en su valor central



Con base en estos resultados, se aplicó la *metodología de optimización multivariable*, con la cual se analiza de forma simultánea el efecto de la cantidad de enzima, la temperatura y la agitación sobre las dos variables de respuesta Y_1 y Y_2 , con el objetivo de establecer las condiciones de reacción, en las cuales se maximiza la conversión y se minimiza el índice de acidez. Los rangos dentro de los cuales se realizó la optimización de la reacción se muestran en la tabla 11.

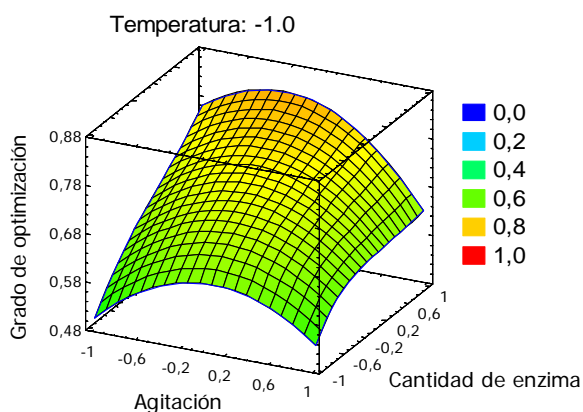
Tabla 11. Rangos entre los cuales se realizó la optimización de las respuestas Y_1 (% de conversión) e Y_2 (Índice de acidez)

| Variables respuestas | Rangos de optimización | |
|----------------------|------------------------|--------|
| | Mínimo | Máximo |
| % de conversión | 20 | 100 |
| Índice de acidez | 0,5 | 3 |

Con estos rangos y usando las ecuaciones 4 y 5 se obtuvo la superficie de respuesta que se presenta en la figura 18. En ella se aprecia claramente una zona muy favorable para la reacción, con condiciones operacionales suaves (temperatura y agitación) que conducen a altos porcentajes de conversión. Estas

condiciones fueron: cantidad de enzima 9% con respecto al peso del aceite, 40 °C de temperatura y una agitación de 100 rpm, alcanzándose un porcentaje de conversión de 97.8 % y un índice de acidez de 1.3.

Figura 18. Superficie de respuesta el grado de optimización



En estas condiciones, y para corroborar los modelos obtenidos se realizó la reacción, tres veces, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 12. Las diferencias entre el valor predicho y el valor obtenido son de 11,7 %, lo que permite concluir que el modelo permite hacer una aproximación para maximizar la conversión y minimizar el índice de acidez.

Tabla 12. Validación del modelo ajustado

| Conversión (% ésteres etílicos) | | Índice de acidez | |
|---------------------------------|----------------|------------------|----------------|
| Valor Obtenido | Valor Predicho | Valor Obtenido | Valor Predicho |
| 96,7 ± 1,6% | 85,8 % | 1,4 | 1,2 |

El análisis de la evolución de la conversión y del índice de acidez de forma simultánea es muy importante, porque a escala industrial en estos procesos el

contenido de ácidos grasos libres es determinante, ya que el costo de la etapa de neutralización puede corresponder al 10% del costo del producto. Las empresas refinadoras de aceite consideran un máximo permitido de 2.5 (Saceites, S.A) para el índice de acidez a fin de que el proceso tenga viabilidad.

A nivel internacional no se encuentran en la bibliografía reportes sobre la evaluación del índice de acidez en este tipo de reacciones. A nivel nacional, los trabajos reportados por Jacome y Perea (2005), Castellanos y col.,2004, Perea y col., 2005, Moreno y col., 2001 y Arango., 2004, señalan la importancia de este parámetro.

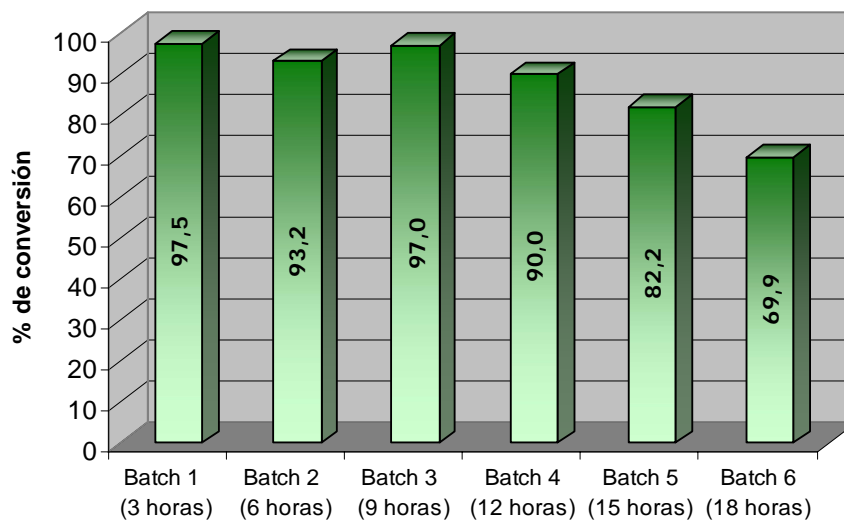
3.4 ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA

En las condiciones de reacción escogidas en el diseño experimental, se realizaron seis reacciones de alcoholisis sucesivas con el fin de determinar la estabilidad operativa de la enzima. La figura 19, muestra el rendimiento de la reacción en función de los reusos aplicados.

En los primeros cuatro (12 horas) se obtienen rendimientos que superan el 90%, en el quinto la conversión se reduce a 82,2 % y, finalmente, con el sexto el rendimiento de la reacción es del 69,9%.

Es decir, después de 6 reusos (18 horas) la disminución del rendimiento de la reacción es de 31,8 % situación que es considerada como normal por los proveedores de la enzima y los que la han utilizado a escala industrial en otros procesos como la obtención de grasas especiales [Perea y col., 2005].

Figura 19. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas finales

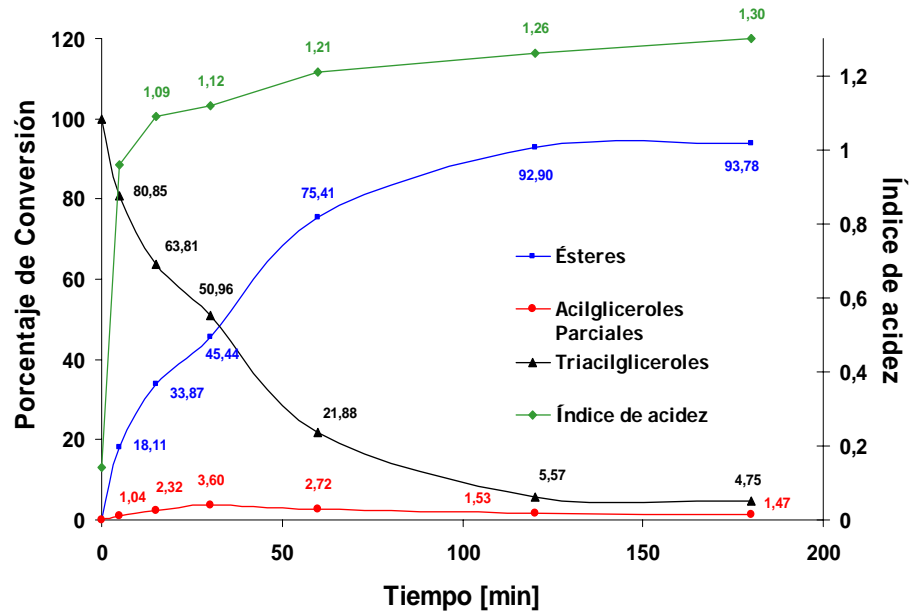


La disminución de la conversión puede ser consecuencia de la inactivación térmica de la enzima y de la desorción de la enzima del soporte, por lo cual, estos parámetros deben ser evaluados más exhaustivamente.

3.5 CINETICA DE LA REACCION

En las condiciones seleccionadas, se evaluó la variación de la conversión y el índice de acidez en el tiempo (figura 20). En ella se observa la disminución en TAG's con el consecuente incremento de ETE's y PAG's (mono y diacilgliceroles). Las velocidades de aparición de los ésteres y de desaparición de los TAG's son muy similares como es de esperar debido a la naturaleza de la reacción. La producción de PAG's (monoacil y diacilgliceroles) es pequeña en relación a la cantidad de ésteres obtenidos.

Figura 20. Cinética de la reacción de alcoholisis en un sistema en discontinuo



La producción de ésteres aumenta rápidamente durante la primera hora de la reacción, al cabo de este tiempo, la velocidad de la conversión va disminuyendo, de forma que entre 120 y 180 minutos solo se registra un aumento del 0,88%. La variación del índice de acidez, presenta una tendencia similar, aunque al inicio de la reacción (10 minutos) alcanza un valor alto (1.0), posteriormente su incremento sólo es muy leve y el valor tiende a hacerse constante. Lo anterior, permite establecer que la reacción podría realizarse adecuadamente en un tiempo de reacción de dos horas.

3.6. DISCUSION DE RESULTADOS

La investigación desarrollada para obtener ésteres alqulicos ha tenido un amplio desarrollo por el papel que estos compuestos pueden desempeñar en el futuro, al ser una alternativa a los problemas del petróleo que se viven actualmente.

En la tabla 13, se presenta un resumen de las investigaciones más representativas desarrolladas en el área en los últimos seis años, usando diferentes enzimas; en la tabla 15 se presentan las investigaciones llevadas a cabo utilizando la Lipozyme TL, IM.

Para poder comparar los resultados obtenidos en este trabajo, con los señalados en las tablas 13 y 14, y teniendo en cuenta que todos presentan condiciones de reacción diferentes, se calculó en todos los casos, la *productividad*, parámetro que relaciona la cantidad de ésteres alquílicos producidos respecto al tiempo de reacción, y la *productividad específica*, la cual, adicionalmente considera la cantidad de catalizador.

En cuanto a la productividad específica, los mayores valores (13.5 y 11,1) se logran en los trabajos de Noureddini (2005) y de Salis (2005), respectivamente, seguida por la alcanzada por Foglia (4.9) y la lograda en este trabajo que fue de 3.6. En los trabajos de Noureddini, llama la atención, la alta relación de sustratos 1:15.2. (aceite de soya-etanol), puesto que como se ha señalado anteriormente, existen evidencias de que a relaciones de sustrato superiores a 4:1 existe inhibición por parte del etanol. Los autores, sin embargo, justifican estas condiciones explicando que la reacción se encuentra limitada por restricciones difusionales y, por tanto, se requiere que el alcohol se encuentre en exceso.

Tabla 13. Transesterificación con enzimas diferentes a la Lipozyme TL,IM

| Variables | Foglia (1999) | Abigor (2000) | Oliveira (2001) | | Castellanos (2004) | Shah (2004) | Noureddini (2005) | Salis (2005) | Desai (2006) |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|---|--------------------|---|---|--|---|
| Enzima | PS30 | PS30 | a) Lipozyme IM b) Novozym 435 | | Lipozyme IM | Chromobacterium viscosum | <i>Pseudomonas cepacia</i> (PS) | <i>Pseudomonas cepacia</i> (PSD) | a) Lipasa pancreática de porcino b) Lipasa pancreática de porcino inmovilizada |
| Alcohol | Etanol | Etanol | Etanol | | Etanol | Etanol | a) Metanol b) Etanol | 1- Butanol | Metanol |
| Fuente de TAG's | Grasa Usada | a) PKO b) CON | PKO | | PKO | Aceite de Jatropha ² | Aceite de soya | Trioleina | Aceite de salicornia ¹ |
| Relación de sustratos | 4,4:1 | 4:1 | 3:1 | a) 6,5:1 b) 10:1 | 3:1 | 4:1 | a) 7,5:1 b) 15,2:1 | 3:1 | 3:1 |
| Agitación | 200 rpm (shaker) | 150 rpm | 200 rpm | | 200 rpm (propela) | 200 rpm | 700 rpm | 80 oscilaciones /min (shaker horizontal) | Dato no reportado |
| Solvente | --- | --- | n-hexano (0% H ₂ O) | a) SCCO ₂ (5% H ₂ O) b) SCCO ₂ (10% H ₂ O) | --- | a) 0 % H ₂ O b) 0,5% H ₂ O | --- c) 0,5 g H ₂ O d) 0,3 g H ₂ O | --- | - Hexano - acetona |
| Temperatura | 38,4 °C | 40 °C | a) 40 °C b) 70 °C | a) 40 °C b) 55 °C | 55 °C | 40 °C | 35 °C | 40 °C | 25 °C |
| Cantidad de enzima | 5 (% peso aceite) | 10 (% peso aceite) | a) 5 b) 20 (% peso aceite) | 5 (% peso aceite) | 6 (% peso aceite) | 15 (% peso aceite) | 4,8 (% peso trioleina) | 1,5 (% peso trioleina) | 28,6 (% peso aceite) |
| Tiempo de reacción | 3 horas | 8 horas | 6 horas | 4 horas | 3 horas | 8 horas | 1 hora | 6 horas | 12 horas |
| Rendimiento (Porcentaje de ésteres) | 74,1% | a) 72% b) 35% | a) 77,5 % b) 54,5 % | a) 26,4 % b) 63,2 % | 62 % | a) 71 % b) 92% | a) 67 % b) 65 % | 100 % | a) 45% b) 55% |
| Productividad ³ | 24,7 | a) 9 b) 4,4 | a) 12,9 b) 5,80 | a) 6,6 b) 15,8 | 20,7 | a) 8,9 b) 11,5 | a) 67 b) 65 | 16,67 | a) 3,75 b) 4,58 |
| Productividad específica ⁴ | 4,94 | a) 0,9 b) 0,44 | a) 2,58 b) 1,16 | a) 1,32 b) 3,16 | 3,45 | a) 0,59 b) 0,76 | a) 14,0 b) 13,5 | 11,1 | a) 0,13 b) 0,16 |

³ [% de ésteres / hora]

⁴ [% de ésteres / hora * cantidad de enzima (% wt aceite)]

De otra parte, en los trabajos realizados con la enzima Lipozyme TL IM (tabla 14) en sistemas discontinuos libres de solvente, hay que resaltar que la mayoría se realizan a temperaturas de 40 °C, en un rango de agitación entre 100-200 rpm, las demás variables difieren en todos los casos. En estas condiciones, los mayores valores de productividad y productividad específica se alcanzan en este trabajo, seguidos por los ejecutados por Castellanos y col., 2004.

Los buenos niveles de productividad alcanzados pueden ser consecuencia de la utilización de etanol en lugar de metanol, el cual, como se ha mencionado, tiene un fuerte efecto de inhibición sobre la enzima, dando lugar a bajas productividades.

El uso de diferentes sustratos puede dar lugar a interacciones diferentes entre la enzima y los TAG's. En el caso de la Lipozyme TL, IM, a nivel internacional se reportan diversos aceites para el desarrollo de la reacción de esterificación, sin embargo, sólo esta investigación y el estudio exploratorio llevado a cabo por Castellanos y col., 2004 abordan el uso del aceite de palmiste que por la composición de sus triacilgliceroles, la mayoría compuestos por ácidos grasos saturados, presenta velocidades de reacción mayores. [Selmi., 1998]

La relación molar de sustratos es otro factor que afecta la reacción. La utilizada en este trabajo (1:4 aceite-alcohol) permite desplazar la dirección de la reacción hacia la obtención de ésteres sin representar problemas de inhibición por parte del etanol. [Nelson y col., 1996; Abigor y col., 2000; Fukuda y col., 2001; Du y col 2003; Castellanos y col., 2004].

Tabla 14. Condiciones óptimas finales y comparación con otros trabajos que utilizan Lipozyme TL IM en sistemas libres de solvente

| Variables | Este trabajo | Du (2003) | Wu (2003) | Soumanou (2003) | Castellanos (2004) | Du (2005) |
|---|---------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Alcohol | Etanol | Metanol | Metanol | Metanol | Etanol | Metanol |
| Aceite | Palmiste | Soya | Aceite usado | Girasol | PKO | Soya |
| Relación de sustratos (alcohol:aceite) | 4:1 | 4:1 | 1:1 (adición en tres etapas) | 1:1 (adición en tres etapas) | 3:1 | 1:1 (adición en tres etapas) |
| Agitación | Propela: 100 rpm | Shaker | 130 rpm | Magnética: 200 rpm | 200 rpm (propela) | 150 rpm |
| Temperatura | 40 °C | 40 °C | 35°C | 40 °C | 55°C | 40 °C |
| Solvente | --- | | | | ---- | |
| Cantidad de enzima | 9 (% peso aceite) | 30 (% peso aceite) | 10 (% peso aceite) | 10 (% peso aceite) | 6 (% peso aceite) | 10 (% peso aceite) |
| Tiempo de reacción | 3 horas | 12 horas | 96 horas | 30 horas | 3 horas | 48 horas |
| Rendimiento (% de ésteres) | 97,8% | 92% | 90,2% | Aprox. 60% | 67 % | Aprox. 92% |
| Productividad (% de ésteres / hora) | 32.6 | 7.7 | 0.94 | 2.0 | 22,3 | 1.92 |
| Productividad específica (% de ésteres / hora * cantidad de enzima) | 3.6 | 0.25 | 0.094 | 0.2 | 3,7 | 0.19 |

Teniendo en cuenta que Lipozyme TL,IM se comercializa como una enzima 1,3 específica, es de esperar que la máxima conversión, en teoría, podría conducir tan solo a un 66%. Sin embargo, al revisar los datos de conversión o rendimientos reportados, se encuentra que salvo en el trabajo de Soumanou (2003) (que usa metanol) y en el de Castellanos (2004) (que emplea una temperatura de 55 °C para la reacción), en los demás casos, los rendimientos son superiores a 90%.

Lo anterior puede deberse al efecto que ejerce el soporte de la enzima, en este caso, la Sílica gel, la cual favorece la migración del grupo acilo ubicado en la posición 2. Esta situación ha sido discutida por Du y col., 2005, para la reacción de alcoholólisis, quienes comprueban esta hipótesis, identificando 1,3-diacilgliceroles

como intermediarios de la reacción, compuestos que no deberían existir en el medio, si sólo actuará la enzima. Este efecto ha sido también discutido por Yang y col., 2006, para una reacción de acidólisis. Estos autores demuestran que la migración del grupo acilo se favorece en medios libres de solvente y ésta además es dependiente de la temperatura, puesto que con su incremento, disminuye la viscosidad, con lo cual, las limitaciones de transferencia de masa se reducen, aumentando así la incorporación del grupo acilo deseado y simultáneamente la migración.

En el presente trabajo, como se muestra en la cinética de reacción, la formación de de PAG´S es baja (1,47 %), por lo cual, es de suponer que se haya presentado el fenómeno de migración de los grupos acilo de la posición 2.

En cuanto a la estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM, el trabajo reportado Soumanou y col., 2003, señala que la enzima pierde cerca del 50% de su actividad inicial a las 48 horas (segundo batch) y posteriormente la conversión decrece levemente hasta llegar al octavo batch, en el cual se registra una pérdida considerable de actividad (70%). Por otra parte, el estudio llevado a cabo por Castellanos y col., 2004, señala que la enzima pierde cerca del 60% de actividad después de 6 horas de reacción (segundo batch).

Finalmente, al comparar la catálisis química con la catálisis enzimática se encuentra que en primer caso se registran valores de conversión en un rango de 60-100 % (tabla 15), pero utilizando condiciones bastante exigentes como: 50 bares de presión sobre atmósfera de nitrógeno [Jaturong y col,2006], velocidades de agitación que van desde 100 a 600 rpm [Zheng y col, 2006; Canoira y col 2006], y altas temperaturas [Jaturong y col,2006]. En este trabajo, en cambio, se emplearon condiciones de reacción suaves: 40 °C, 100 rpm y presión atmosférica, alcanzando rendimientos similares (97,8%).

Otro aspecto importante es que en la mayoría de los trabajos de catálisis química (tabla 16), se manejan relaciones altas de alcohol/aceite a diferencia de este trabajo que solo utiliza una relación de 4:1 (alcohol/aceite). La utilización de relaciones bajas por parte de los sistemas enzimáticos mejora la separación y recuperación de los productos, pues evitan la aparición de interferencias por parte del glicerol ya que el exceso de alcohol solubiliza el glicerol dificultando su separación.

En cuanto al grado de agitación, en la catálisis química ésta es una variable que a nivel operacional resulta ser muy costosa ya que los rangos utilizados exceden en forma sorprendente a los que se usan en la catálisis enzimática (aproximadamente 100 rpm), manifestando una ventaja operacional de este proceso por encima de los convencionales.

En cuanto a la productividad específica, se puede ver en la tabla 16, que salvo los valores obtenidos por Meher y col., 2005 (98), para la transesterificación de aceite de Karanja (*Pongamia pinnata*) y metanol, los demás valores son comparables a los obtenidos por los métodos enzimáticos.

Tabla 15. Transesterificación química de diferentes aceites

| Variab les | Este Trabajo | Meher (2005) | Canoira (2006) | Zhengy (2006) | Jitputti (2006) | Jitputti (2006) |
|---|---------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|---|---|
| Catalizador | Lipozyme TL IM | KOH | Metoxido de sodio MeOH | H ₂ SO ₄ | a) SO ₄ /ZrO ₂ b) SO ₄ /SnO ₂ c) ZnO d) KNO ₃ /ZrO ₂ e) KNO ₃ /KL zeolita f) ZrO ₂ | a) SO ₄ /ZrO ₂ b) SO ₄ /SnO ₂ c) ZnO d) KNO ₃ /ZrO ₂ e) KNO ₃ /KL zeolita f) ZrO ₂ |
| Alcohol | Etanol | Metanol | Metanol | Metanol | Metanol (99.8%) | Metanol (99.8%) |
| Aceite | Aceite de palmiste | Aceite de Karanja | Aceite-cera Joroba | Aceite de fritura gastado | PKO crudo | CON crudo |
| Relación de sustratos (alcohol:aceite) | 4:1 | a) 6:1 b) 12:1 | 7.5:1 | a) 245:1 | 6:1 | 6:1 |
| Agitación | 100 rpm | 200 rpm (shaker) | 600 rpm | 100 – 600 rpm | 350 rpm | 350 rpm |
| Temperatura | 40 °C | 65 °C | 60 °C | 70 °C | 200 °C | 200 °C |
| Cantidad de catalizador | 9 (% peso aceite) | 1% de KOH | 1 (% peso aceite) | 3.8 moles | 3 (% peso aceite) | 3 (% peso aceite) |
| Tiempo de reacción | 3 horas | a) 2 horas b) 1 horas | 4 horas | 4 horas | 4 hora | 4 hora |
| Rendimiento (Porcentaje de esteres) | 97,8% | a) 97 -98 % b) 97 -98 % | 79 % | 99 % | a) 90.3 % b) 90.3 % c) 86.1 % d) 74.4 % e) 71.4 % f) 64.5 % | a) 86.3 % b) 80.6 % c) 77.5 % d) 65.5 % e) 71.4 % f) 64.5 % |
| Productividad¹ | 32.6 | a) 49 b) 98 | 19.75 | 24.75 | a) 22.57 b) 22.57 c) 21.52 d) 18.60 e) 17.85 f) 16.12 | a) 21.57 b) 20.15 c) 19.37 d) 16.37 e) 17.85 f) 16.12 |
| Productividad específica² | 3.6 | a) 49 b) 98 | 19.75 | 6.18 | 5.64-4.03 | |

Con respecto a las propiedades de los ésteres alquílicos obtenidos a partir de aceite de palmiste y etanol, algunos autores [Abigor., 2000; Hsu., 2004] que han reportado sus características, las encuentran dentro de los rangos establecidos por las especificaciones ASTM, lo cual los hace aptos para el uso como biodiesel en clima tropical y templado. En este trabajo desafortunadamente no fue posible medir estas propiedades, pero ésta debe hacerse para garantizar su aplicación.

Puede establecerse que la obtención de ésteres etílicos en un sistema en discontinuo, usando como sustratos aceite de palmiste y etanol en presencia de Lipozyme TL IM, posibilita el desarrollo tecnológico de este proceso. La productividad específica de este trabajo puede aumentarse de 3.6 a 5.2, si el tiempo de reacción se disminuye a 2 horas.

4. CONCLUSIONES

- La transesterificación enzimática del etanol y el aceite de palmiste, utilizando la lipasa inmovilizada Lipozyme TL, IM permite la obtención de ésteres etílicos, con mínima contribución de subproductos y en condiciones suaves de operación.
- Con una cantidad de enzima de 9 % con respecto al peso del aceite, temperatura de 40 °C y una agitación de 100 rpm, se alcanzan rendimientos de 97%, con índices de acidez de 1,2.
- La productividad obtenida en este trabajo es de 32,6 y la productividad específica de 3,6; estos valores se encuentran dentro de los más altos reportados hasta el momento para el sistema aceite de palmiste-etanol-Lipozyme TL IM.
- La enzima Lipozyme TL, IM presenta el mismo porcentaje de conversión hasta un tercer uso sucesivo (9 horas), a partir del cual, la conversión disminuye hasta alcanzar un 70%, al cabo del sexto reuso (18 horas).
- Los altos niveles de conversión, productividad y estabilidad de la enzima, además de las suaves condiciones requeridas para la reacción permiten el desarrollo tecnológico de este proceso a escala industrial como una opción viable.
- En el sistema de reacción en discontinuo evaluado, no se presentan restricciones difusionales en las condiciones utilizadas; esto indica que el catalizador puede ser empleado tal y como lo provee el fabricante y que la reacción se encuentra limitada únicamente por la capacidad catalítica de la enzima.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar los estudios de obtención de ésteres alquílicos, a una escala mayor, para lo cual se debe evaluar la estabilidad térmica de la enzima, y el mecanismo cinético de la reacción.
- Para los estudios cinéticos se recomienda buscar variables de respuesta alternativas para el seguimiento de la reacción de transesterificación puesto que el alto costo de la técnica cromatográfica limita el número de ensayos que pueden ser llevados a cabo.
- Evaluar la magnitud del efecto de desorción que sufre la enzima.
- Evaluar la obtención de ésteres alquílicos en sistemas en continuo.
- Realizar los estudios de costos de los procesos desarrollados, para poder definir su aplicación real, pues por tratarse de una tecnología limpia, su necesidad de aplicación es mayor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIGOR, R. *et al.* Lipase catalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. En: Biochemical Society Transactions. Vol. 28, No. 6 (2000); p. 979-981
2. AL-WIDYAN, I. Mohamad and AL-SHYOUKH, O. Ali. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. En: Bioresource Technology. Vol. 85 (2002); p. 253–256
3. ARANGO, L. Producción a escala de planta piloto de productos equivalentes de la manteca de cacao a partir de la oleína de palma por interesterificación enzimática. (2004) Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Postgrado en Química.
4. BALCÃO, Víctor M.; PAIVA, Ana L. and MALCATA, F. Xavier. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 18 (1996); p. 392-416
5. BARNWAL, B. K. and SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 9 (2005); p. 363–378.
6. BERNAL NIÑO, Fernando. El cultivo de la palma de aceite y su beneficio: Guía para el nuevo Palmicultor. FEDEPALMA – CENIPALMA. (2005)

7. BOOCOCK, G.B. *et al.*. Fast formation of high purity methyl esters from vegetable oils. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 75, No. 9 (1998); p. 1167-1172
8. BRADY, Leo *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. En: Letters to Nature. Vol. 343 (1990); p. 767–770
9. CANOIRA, Laureano *et al.*. Biodiesel from Jojoba oil-wax: Transesterification with methanol and properties as a fuel. En: Biomass and Bioenergy. Vol. 30 (2006) p. 76-81.
10. CASTELLANOS MOLINA, Fabián Enrique y GONZÁLES SANTOS, Rosa Alexandra. Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholólisis del aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de *Mucor miehei*. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
11. CRABBE, Edward *et al.* Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. En: Process Biochemistry. Vol. 37 (2001); p. 65-71
12. DESAI, P.D; DAVE, A.M. and DEVI, Surekha. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. En: Food Chemistry. Vol. 95 (2005) p. 193-199
13. DOSSAT, Valérie; COMBES, Didier and MARTY, Alain. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol 30 (2002); p. 90-94.

14. DU, Wei; XU, Yuan-Yuan and LIU, Dehua. Lipase-catalysed transesterification of soybean oil for biodiesel production during continuous batch operation. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 38 (2003); p. 103-106
15. DU, W. *et al.* Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. En: Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. Vol. 37 (2005); p. 68-71
16. ENCINAR, J. M. *et al.* Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. En: Energy and Fuels. Vol. 16 (2001); p. 443-450
17. ENGASSER, J. and HORVATH, C. Difussion and kinetics with immobilized enzymes. En: Applied Biochemistry and Bioengineering 1. Immobilized Enzyme Principles. Academic Press, New York. 1976
18. FUKUDA, Hideki; KONDO, Akihiko and NODA, Hideo. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. En: Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 92, No. 5 (2001); p. 405 - 416
19. GERPEN, Jon Van. Biodiesel processing and production. En: Fuel Processing Technology. Vol. 86 (2005); p. 1097-1107
20. GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. En: OCL. Vol. 6, No. 5 (1999); p. 365-372

21. HSU, An-Fei *et al.* Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. En: JAOCS, Journal of American Oil Chemistrys' Society. Vol. 81, No. 8 (2004); p. 749-752
22. ISO, Mamoru *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 16 (2001); p. 53-58
23. JACOME, Luis Fernando. Evaluación de la enzima lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimático para obtención de grasas especiales. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química
24. JAEGER, Karl-Erich and EGGERT, Thorsten. Lipases for biotechnology. En: Current Opinion in Biotechnology. Vol. 13, No. 4, (2002); p. 390-397
25. JIMÉNEZ, A. y MUÑOZ, D. Utilización de catalizadores sólidos básicos para la producción de biodiesel a partir de aceite de palma. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
26. JITPUTTI, Jaturong *et al.* Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. En: Chemical Engineering Journal. Vol. 116 (2006); p. 61 – 66.
27. KNOTHE, Gerhard and STEIDLEY Kevin. R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and

comparison to petrodiesel fuel components. En: Fuel. Vol. 84 (2005) p. 1059-1065.

28. KÖSE, Öznur; TÜKER, Melek and AKSOY, Ayse H. *Immobilized Candida Antarctica*_lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. En: Bioresource Technology. Vol. 83 (2002); p. 125-129

29. LARA PIZARRO, Ana V. and PARK, Enoch Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contain in waste activated bleaching earth. En: Process Biochemistry. Vol. 38 (2003); p. 1077-1082.

30. LEPAGE. J. F. *et al.* Applied heterogeneous catalysis design manufacture use of solid catalysts. Institut Francais du Pétrole. (1987); p. 42-44.

31. MA, Fangrui and HANNA, Milford A. Biodiesel production: a review. En: Bioresour. Technol. Vol 70 (1999); p.1-15.

32. MA, Fangrui; CLEMENTS, Davis L. and HANNA, Milford A. The effect of mixing on transesterification of beef tallow. En: Bioresource Technology. Vol 69 (1999); p. 289-293

33. MARCHETTI, J.M; MIGUEL, V.U. and ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. (2006)

34. MEHER, L. C; DHARMAGADDA, Vidya S. S. and NAIK, S. N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil fro production of biodiesel. En: Bioresource Technology. (2005)

35. MORENO, N. Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma: producción de equivalentes de la manteca de cacao por interesterificación enzimática. (2001) Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Postgrado en Química.
36. MOSBACH, K. Methods in enzymology. Vol 44. Academic Press. New York. 1976
37. NELSON, L. *et al.* Lipase-catalyzed production of biodiesel. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 73, No. 8 (1996); p. 1191-1195
38. NOUREDDINI, H; GAO X. and PHILKANA R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. En: Bioresource Technology. Vol. 96 (2005); p. 769-777
39. OLIVEIRA, D. and OLIVEIRA, Vladimir J. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in *n*-hexano and SCCO₂. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol. 19 (2001); p. 141-148
40. OTERA, J. Transesterification. En: Chemical Reviews. Vol. 93, No. 4 (1993); p. 1449-1470
41. Patente US 5525126^a
42. Patente US 6399800B1
43. Patente US 6364917B1
44. PEREA, Janeth. *et al.* Desarrollo de grasas especiales a escala de planta piloto a partir del Aceite de Palma. Proyecto colciencias (2005)

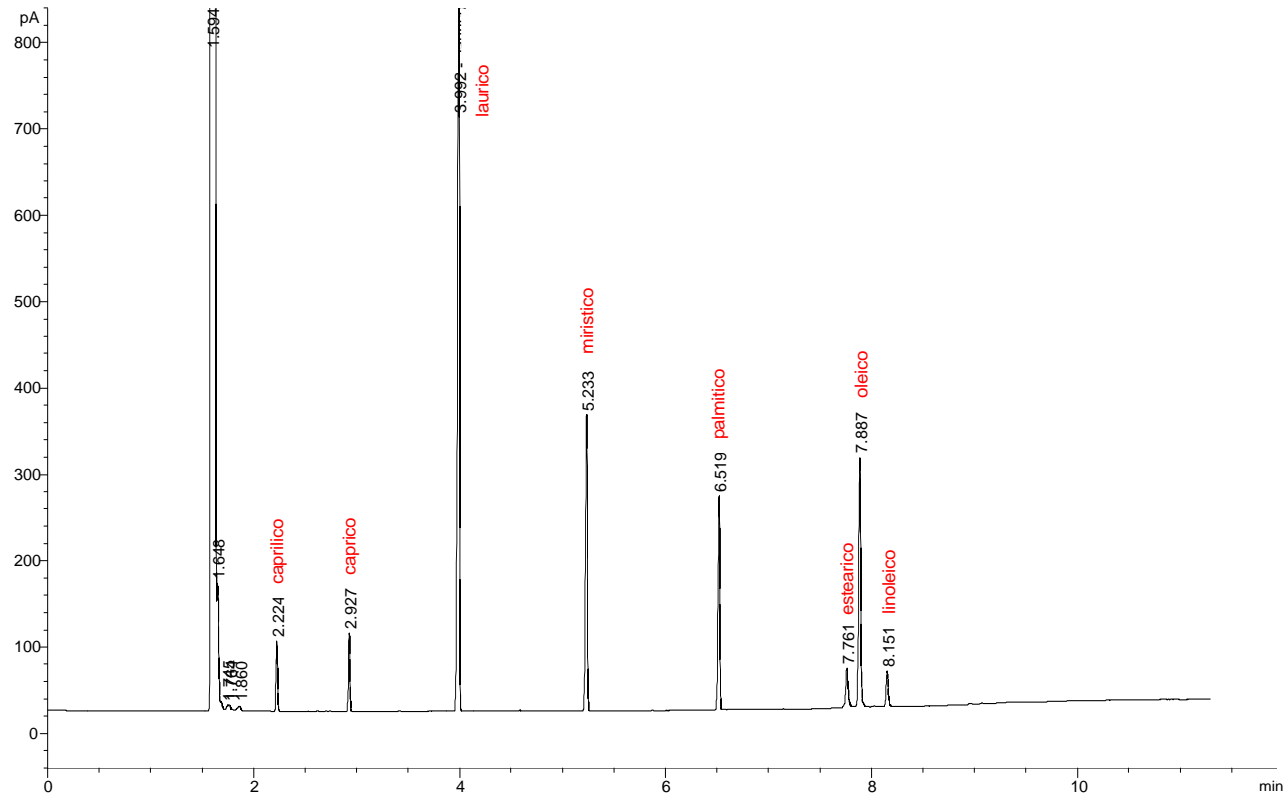
45. SALIS, Andrea *et al.* Characterisation of accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 24, No. 25 (2003); p. 75 – 82
46. SELMI, Boulbaba and THOMAS, Daniel. Immobilized lipase-catalized ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. En: JAOCS, Journal of American Oil Chemistrys' Society. Vol. 75, No. 6 (1998); p. 691- 695
47. SHAH, Shweta; SHARMA, Shweta and GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalized transesterification of *jatropha* oil. En: Energy and Fuels. Vol. 18 (2004) p. 154-159
48. SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf and BANERJEE, Uttam Chand. Production, purification, characterization, and applications of lipases. En: Biotechnology Advances. Vol 19 (2001); p. 627–662.
49. SCHUCHARDT, U and SERCHELI, R. Transesterification of vegetable oils: a review. En: J. Braz.Chem. Soc. Vol. 9, No. 1 (1998); p. 199-210
50. SHIMADA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. En: Journal of molecular catalysis. Vol 17. (2002); p. 133-142
51. SOUMANOU, Mohamed M. and BORNSCHEUER, Uwe T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol 33, No. 1 (2003); p. 97-103

52. TORRES, Carlos F; HILL Jr, G. and OTERO, Cristina. Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Borage Oil: A Kinetic Study. En: Biotechnol. Prog. Vol 20 (2004); p. 756-763
53. URRESTA, A. Julián D; RAMIREZ, Alfonso y MARTÍNEZ, Carolina. Alcoholisis del aceite de palma para la obtención de ésteres. XIV Conferencia Internacional sobre palma de Aceite. En: Palmas. Vol. 25, No. Especial Tomo I (2004); p. 365 – 369
54. WEBER, Nikolaus AND MUKHERJEE, Kumar D. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. En: J. Agric. Food Chem. Vol. 52 (2004); p. 5347-5353
55. WINKLER, F. K., D'ARCY, A. and HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase En: Nature, Vol. 343 (1990); p. 771–774
56. WU, W. H *et al.* Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 76, No. 4 (1999); p. 517-521
57. WU, Hong *et al.* Enzymatic conversión of waste oil to biodiesel in a solvent-free system. En: Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem. Vol. 48, No. 2 (2003); p. 533-534
58. YANG, Tiankui; FRUEKILDE, Maj-Britt and XU, Xuebing. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. En: Food Chemistry. Vol. 92 (2005); p. 101 – 107

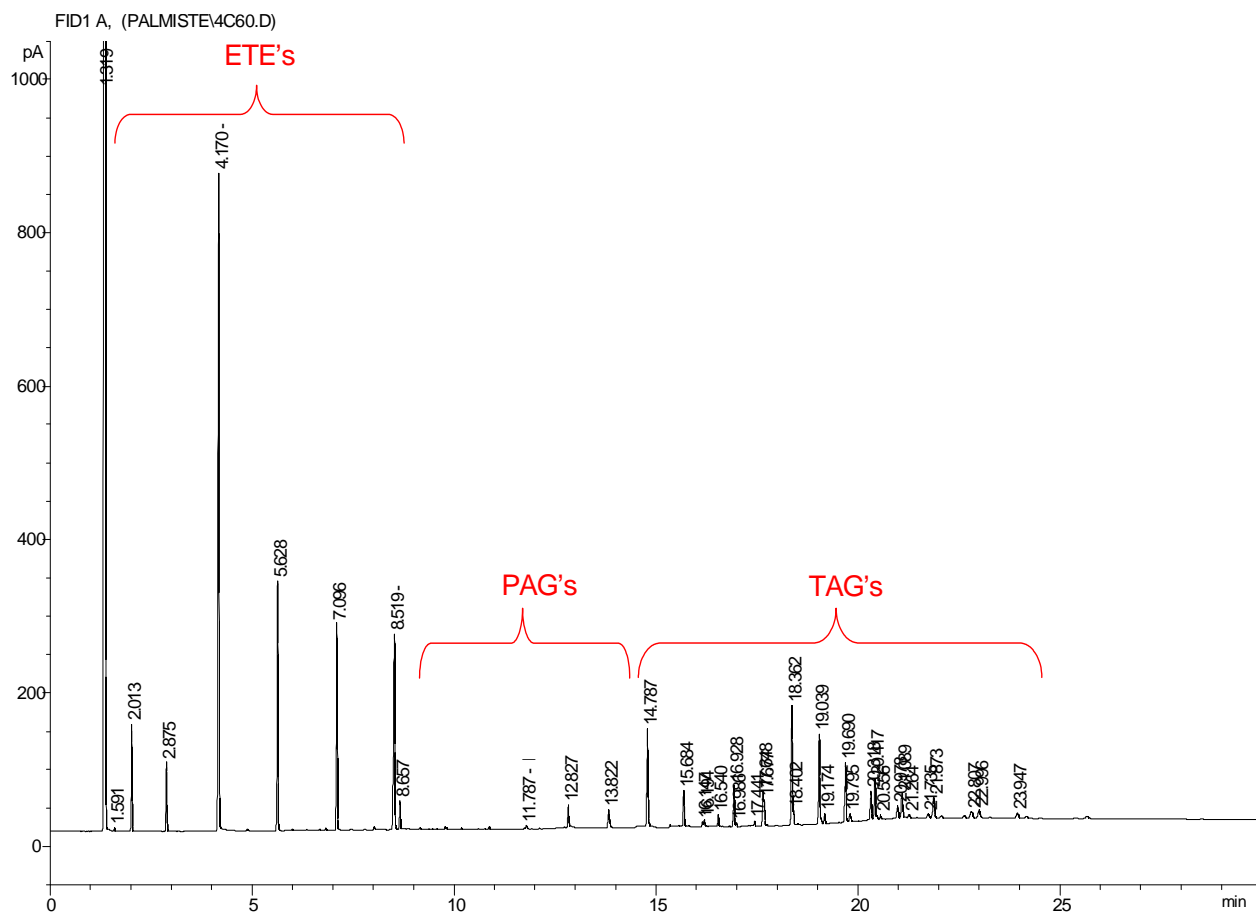
59. ZHENG, S. *et al.* Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil.
En: Biomass and Bioenergy. (2006)

ANEXOS

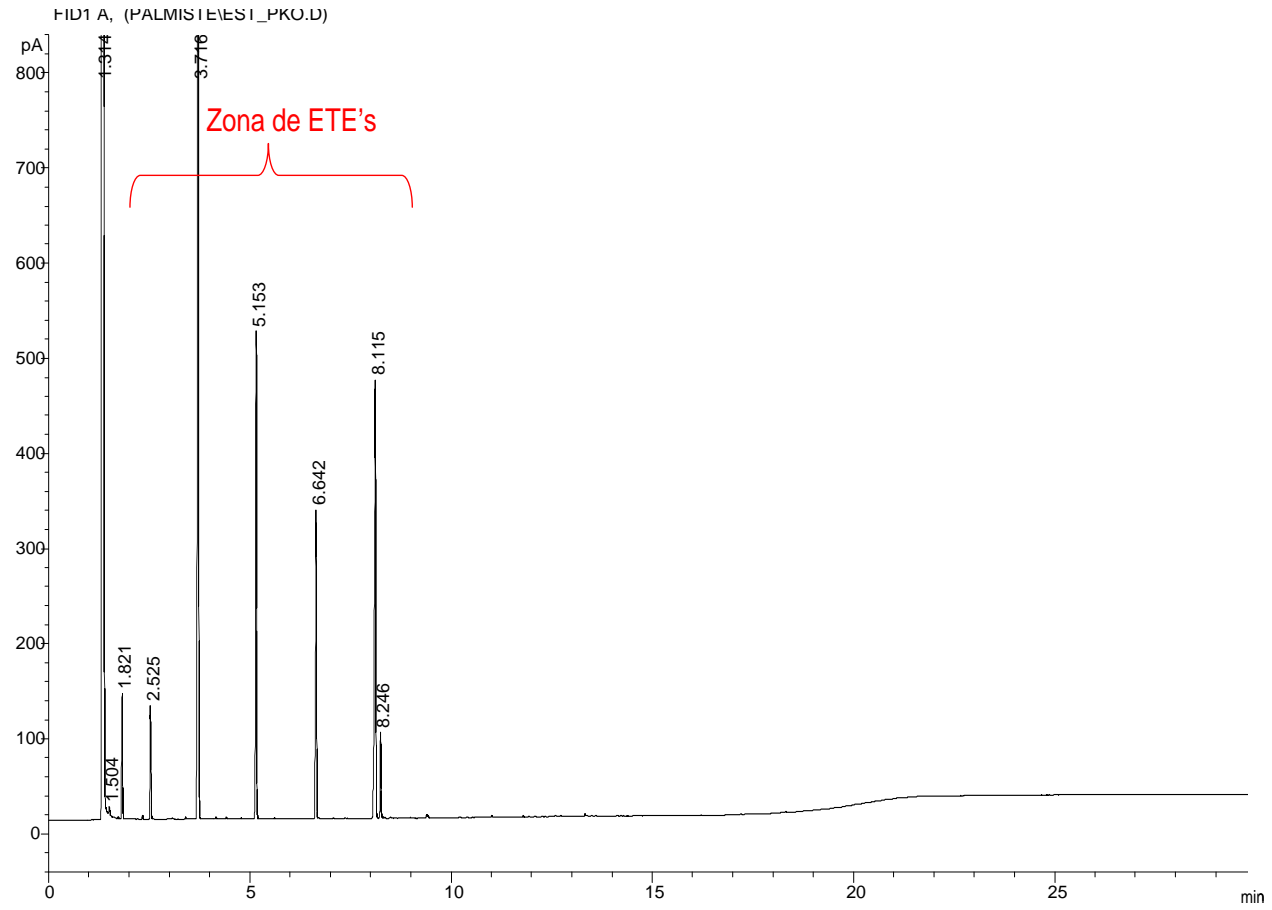
ANEXO A. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en el PKO



ANEXO B. Perfil cromatográfico de un producto de la reacción de alcoholisis (62,11 % de ETE's)



ANEXO C. Perfil cromatográfico de ETE's preparados a partir del PKO



ANEXO D. Perfil cromatográfico de TAG's en el PKO

