



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis cinético en la producción de biodiesel catalizada con *Candida Antarctica* Lipasa B y *Rhizomucor miehei*, a partir de dos fuentes de aceites vegetales.

T E S I S M A N C O M U N A D A

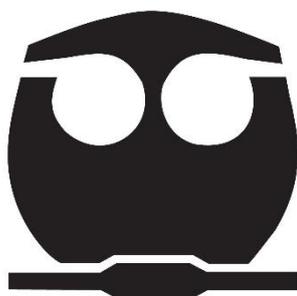
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero Químico

P R E S E N T A N:

Erick Luis Eduardo Juárez Moctezuma

Gerardo Vergara Balmori



Ciudad de México.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO.

Presidente: Jorge Fernando Ramírez Solís

Vocal: Rogelio Cuevas García

Secretario: Aida Gutiérrez Alejandre

1er. Suplente: Rodolfo Zanella Specia

2do. Suplente: Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación en Catálisis (UNICAT). Laboratorio 225, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Rogelio Cuevas García

SUSTENTANTES:

Erick Luis Eduardo Juárez Moctezuma

Gerardo Vergara Balmori

Agradecimientos.

“Acuérdate de tu Creador en los días de tu juventud...” Gracias a Dios, por absolutamente todo.

Gracias a mi familia, por la paciencia que tuvieron y por todo su apoyo, sobre todo por su motivación para continuar y terminar.

Gracias también a mis amigos, por su sincero apoyo y por ayudarme a despejar la mente cuando así era necesario (y aun cuando no lo era).

Gracias a la Dra. Carmina Montiel, porque amable y desinteresadamente nos proporcionó todas las enzimas que utilizamos, por sus asesorías, sus preguntas desafiantes, todo el material bibliográfico y también todas esas palabras de ánimo.

Gracias al Dr. José Luis Godínez del Instituto de Biología de la UNAM, por proporcionarnos las algas, bibliografía y apoyo para la experimentación.

Gracias al Dr. Rogelio Cuevas, porque siempre ha estado dispuesto a corregirnos y apoyarnos, pero sobre todo por saber guiar este trabajo en la dirección correcta. Por todas sus enseñanzas, técnicas y no técnicas.

Gracias al Dr. Jorge Ramírez, por creer en este proyecto y abrirnos las puertas de la UNICAT.

Y finalmente gracias a la UNAM, por ser nuestras alma máter, por alimentar nuestro conocimiento y nuestras almas con su pluralidad.

“Por mi raza hablará el espíritu”

ÍNDICE

Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	9
2.1. Biocombustibles.....	9
2.2. Producción de biodiesel.....	10
2.3. Principales actores dentro de la bioenergía en América.....	11
2.3.1. Biodiesel en México.....	12
2.4. Catálisis enzimática.....	12
2.4.1. Proteínas y enzimas.....	13
2.5. Cinética enzimática.....	16
2.6. Lipasas.....	18
2.7. Mecanismo de reacción enzimática.....	19
2.7.1. Suposición del estado pseudo-estacionario.....	21
2.8. Aceite de microalgas.....	21
2.8.1. <i>Botryococcus Braunii</i>	22
3. Objetivos.....	23
4. Desarrollo experimental.....	24
4.1. Caracterización del aceite.....	24
4.1.1. Identificación por cromatografía de gases-espectroscopia de masas (CG-MS).....	24
4.1.2. Derivatización de los aceites utilizados.....	24
4.2. Reacción.....	24
4.2.1. Análisis de reactivos y productos.....	24
4.2.2. Reacción.....	24
4.3. Reactor.....	27
4.4. Actividad enzimática.....	28
4.5. Extracción de aceite de microalgas.....	32
5. Resultados.....	34
5.1 Caracterización del aceite.....	34
5.1.1. Cromatografía de gases-espectroscopía de masas.....	34
5.1.1 A. Ácidos grasos en aceite de cocina.....	34
5.1.1 B. Ácidos grasos presentes en el aceite de ajonjolí.....	38
5.1.2. Análisis de las muestras.....	40
5.1.2. A Cromatografía de gases de aceite de cocina... ..	40
5.1.2.B. Cromatografía de gases de aceite ajonjolí con métoxido de sodio.....	40
5.2 Determinación de la composición por componente.....	43
5.2.1. Productos obtenidos en catálisis enzimática por CG-FID	43

5.3. Análisis cinético por ácido graso.....	46
5.3.1. Conversiones obtenidas.....	46
5.3.2. Obtención de parámetros cinéticos.....	46
5.3.2.1 Resultados de reacción con aceite de cocina..	48
5.3.2.1 A. Ajuste de datos: aceite de cocina con CalB en <i>t</i> -butanol.....	48
5.3.2.1. B Ajuste de datos: aceite de cocina con R.M. en <i>t</i> -butanol.....	50
5.3.2.1. C Ajuste de datos: aceite de cocina con CalB en <i>n</i> -hexano.....	52
5.3.2.1. D Ajuste de datos: aceite de cocina con R.M. en <i>n</i> -hexano.....	54
5.3.2.1. 1. Tabla de conversiones.....	56
5.3.2.2 Resultados de reacción con aceite de ajonjolí .	57
5.3.2.2 A. Ajuste aceite de ajonjolí con CalB en <i>t</i> - butanol.....	57
5.3.2.2. B Ajuste aceite de ajonjolí con R.M. en <i>t</i> - butanol.....	59
5.3.2.2. 1. Tabla de resultados para aceite de ajonjolí..	61
6. Discusión de resultados.....	61
6. 1 Reacción con aceite de cocina.....	62
6. 2 Reacción con aceite de ajonjolí.....	64
7. Conclusiones.....	65
8. Apéndices.....	67
9. Referencias.....	68

RESUMEN.

Este trabajo tiene como objetivo encontrar la mejor mezcla de catalizadores enzimáticos para sustratos (aceites) de diferentes cadenas, de 16 y 18 carbonos; para lo cual, se realizó el estudio cinético de la producción de biodiesel a través de reacción de transesterificación catalizada con enzimas:

- *Candida Anctartica* Lipasa B (CaLB)
- *Rhizomucor Miehei* (R.M.)

En el estudio, se utilizaron dos diferentes aceites como sustratos para dicha reacción:

- Aceite comercial de cocina 1.2.3®
- Aceite de ajonjolí.

Previamente a la transesterificación, se realizó la caracterización los sustratos con una reacción de derivatización; la transesterificación con metóxido de sodio.

El modelo al cual se ajusta la cinética de reacción es al modelo de cinética enzimático propuesto por Michaelis y Menten, donde el sustrato [S], se une a una enzima [E] para formar el complejo enzima-sustrato [ES] para posteriormente liberar la enzima [E] y dando como resultado el producto [P].



Para realizar el ajuste se utiliza la linearización de la ecuación de Michaelis-Menten; pero, el procedimiento presupone que se utiliza una concentración baja y constante del complejo ES, agrupa las constantes k_1 , k_2 , y k_{-1} como un cociente llamado K_m y define al producto de la concentración total del enzima (enzima libre más la enzima en el complejo ES) por la constante k_2 como V_{max} , quedando una ecuación con la siguiente forma:

$$\frac{dP}{dt} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Entonces, los parámetros de la cinética enzimática determinados fueron:

- **K_m**: Constante de afinidad del sustrato con la enzima.
- **V_{max}**: Velocidad máxima de la reacción. Es el punto donde todos los sitios activos de la enzima están ocupados por moléculas de sustrato.

1. Introducción:

El decremento en reservas petrolíferas, la escasez de crudo, el incremento en el precio de los combustibles y la preocupación por el medio ambiente han provocado el interés en la producción de combustibles provenientes de materias primas distintas a las fósiles. Este complemento o sustitución en el uso de combustibles ha requerido un esfuerzo en la búsqueda y desarrollo de alternativas viables provenientes de recursos renovables. Aunado a esto, actualmente en todo el mundo se ha buscado combatir el cambio climático y la reducción de contaminantes derivados de las combustiones de diferentes formas. En las últimas décadas se están desarrollando tecnologías para cubrir estas necesidades con biocombustibles que, por su origen, mantienen un ciclo de carbono que no presenta impacto neto en la cantidad de dióxido de carbono emitido a la atmósfera.

Una ventaja de los biocombustibles, como el etanol y el biodiesel, es que pueden ser usados en automóviles y el transporte público sin necesidad de realizar inversiones que modifiquen al motor. Uno de los biocombustibles con grandes avances en investigación y su aplicación en el mundo es el biodiesel. Este se produce a través de la transesterificación de mono, di, triglicéridos y ácidos grasos libres, a metil ésteres de sus respectivos ácidos grasos. Hoy en día en México existe poco interés por desarrollar la producción del biodiesel o incrementar su importación, reduciendo las opciones para que automovilistas y transportistas nacionales reduzcan el impacto en el medio ambiente causado por combustibles fósiles.¹

Existen diferentes métodos para la transesterificación: catálisis homogénea ácida, homogénea básica, heterogénea ácida y, por último, la más novedosa, catálisis enzimática.

Para este proyecto se decidió utilizar una catálisis enzimática por las diferentes ventajas (Una de las ventajas es la selectividad de la enzima, ya que son muy específicas en la reacción que sintetizan y en los sustratos de la reacción, lo que implica la eliminación de reacciones secundarias, entre ellas la saponificación). que tiene sobre los otros métodos. La catálisis enzimática consiste en utilizar una lipasa para favorecer la formación de ésteres a partir de un alcohol primario y un lípido transesterificable. Estos lípidos transesterificables se encuentran en los aceites o grasas provenientes de seres vivos como plantas y animales, respectivamente. Por razones éticas se prefiere la selección de lípidos que cubran las necesidades de una demanda industrial, que no provengan de una fuente comestible y que no utilicen campos de cultivo que pueden ser destinados a la industria alimenticia². El aceite de microalgas (tópico que se encuentra en auge) parece cumplir con todas estas especificaciones o restricciones para la

¹ **Biocombustibles, ¿una respuesta al Hoy no Circula?** 05 de abril de 2016. De <http://www.forbes.com.mx/biocombustibles-una-respuesta-al-hoy-no-circula/#gs.Hse=XD4>

² ****Legislación en México y el mundo para biocombustibles.**

producción de biocombustibles, ya que varias especies no necesitan grandes espacios para ser cultivadas ni son una fuente alimenticia, además de que crecen prácticamente con nutrientes que se encuentran en el agua, dióxido de carbono y luz.

2. Antecedentes.

2.1 Biocombustibles.

Biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa de organismos recientemente vivos o sus desechos metabólicos. Los combustibles de origen biológico pueden sustituir parte del consumo en combustibles fósiles tradicionales como el petróleo o el carbón. Los biocombustibles más usados y desarrollados son el bioetanol y el biodiesel³.

De manera rigurosa, tanto los combustibles fósiles como los biocombustibles tienen origen biológico. El petróleo es energía concentrada proveniente de fotosíntesis realizada hace millones de años. Pero, al provenir de plantas de hace millones de años, su cantidad es limitada. En el caso de los biocombustibles, la sustancia a ser quemada proviene de fotosíntesis reciente; las plantas originan los ácidos orgánicos a partir del CO₂ atmosférico, por eso se afirma que la utilización de biocombustibles no tiene impacto neto en la cantidad de dióxido de carbono que hay en la atmósfera. Algunos la consideran energía renovable en el sentido que el ciclo de plantación y cosecha se podría repetir indefinidamente, teniendo en cuenta que no se agoten los suelos ni se contaminen los campos de cultivo.⁴

Existe controversia con las tecnologías establecidas actualmente para la fabricación de biocombustibles (también llamadas "de primera generación"), implican el uso de alimentos o tierras e insumos (agua, fertilizantes, etc.), que eventualmente pudieran dedicarse a cultivos alimenticios o que, en muchos casos, no producen ganancias significativas por ahorro de petróleo o mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero. Por ello, se ha propuesto el uso

³ Página en Internet de la organización Greenpeace 05 de abril de 2016:
<http://www.greenpeace.org/espana/about/faq/preguntas-sobrelas-campa-as-d/en-que-consisten-los-biocombu>

⁴ **Biocombustibles. Estudio Teórico Conceptual, Iniciativas Presentadas en la LX Legislatura, Derecho Comparado y Opiniones especializadas.** Junio 2009. Mtra Claudia Gamboa Montejano

de "biocombustibles avanzados" (término actualmente preferido al de "biocombustibles de segunda generación"), los cuales utilizan materias primas que no compiten con los alimentos y que pueden tener mejores indicadores ambientales.⁵ Dentro de los biocombustibles líquidos más utilizados están el bioetanol y el biodiesel.

2.2 Producción de Biodiesel.

Para la producción de biodiesel, triglicéridos reaccionan con metanol en una reacción conocida como transesterificación. En ésta se producen metil ésteres de ácido graso también conocidos como FAME's por sus siglas en inglés (Fatty Acid Metil Ester)

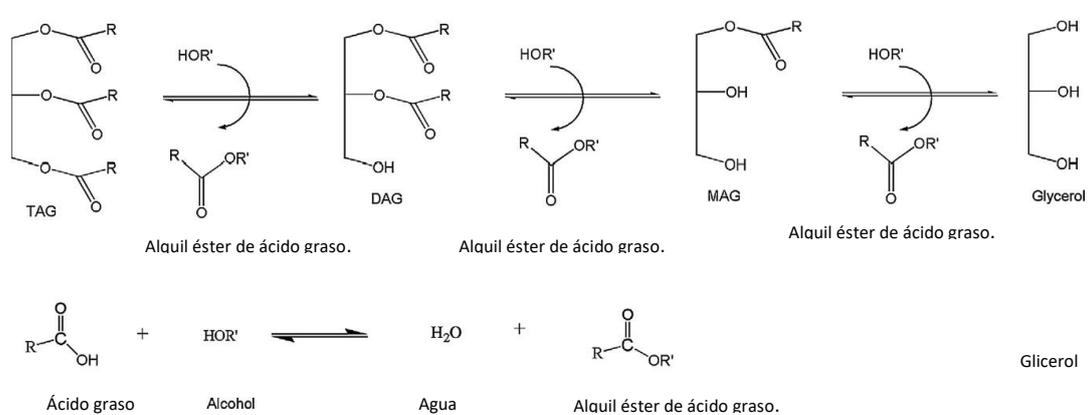


Figura 1. Esquema de la transesterificación. M.Y. Firdaus et al. / Biochemical Engineering Journal 105 (2016) 52–61.

En general, se utiliza hidróxido de sodio como catalizador con fuerza álcali; sin embargo, la principal complicación de este método es que se lleva a cabo la reacción secundaria de saponificación. La metilación con metóxido de sodio, como fuerza álcali, desfavorece la saponificación, lo que la hace una reacción más conveniente que la de hidróxido de sodio. En ambos casos la reacción se lleva a cabo mediante catálisis homogénea, lo que implica que los catalizadores sean disueltos en la reacción complicando su separación de los productos, porque estos catalizadores siguen siendo solubles en el producto.

⁵ **Biocombustibles líquidos** de http://rembio.org.mx/?page_id=623

2.3 Principales actores dentro de la bioenergía en América.

Los principales productores de bioenergía en América son: Brasil, E.U.A., Argentina, Ecuador y Costa Rica⁶. Para Brasil, se estima que el precio del bioetanol de caña de azúcar es ya \$ 30 USD más barato por barril de crudo. En el caso de Costa Rica, desde mayo de 2016, el 100% de la energía es producida por fuentes renovables, siendo las principales la geotérmica, eólica y solar.⁷

A pesar de que en las últimas décadas los biocombustibles han tenido una gran aceptación y un gran desarrollo, existen aún cuatro discusiones centrales acerca de su producción, los cuales son:

- Incentivos económicos. Aunque en países como Brasil el precio de algunos biocombustibles líquidos es más barato, aún existen retos en cuanto a la viabilidad económica de otros biocombustibles. En el caso concreto de biodiesel sigue representando el desafío de lograr que los costos de producción sean menores para que se obtenga una ganancia para sus productores.
- Fundamentos ecológicos. En este aspecto existen varias controversias, pues, aun cuando los biocombustibles contribuyen a la disminución de problemas ambientales como: la lluvia ácida por su bajo o nulo contenido de compuestos azufrados y fosforados; disminución de gases de efecto invernadero en la producción de dichos biocombustibles y una contribución positiva al mejoramiento del ciclo del carbono que es benéfico para el planeta; existe también un grupo de ambientalistas y ecologistas preocupados por la alteración de los ecosistemas derivados de la sobrepoblación de alguna especie o la erosión del suelo por el exceso de cultivos destinados a los biocombustibles.
- Factores políticos. Otra gran tendencia, relacionada con el campo de los biocombustibles son los agro-negocios o agrobussines, que se encargan de gestionar cada uno de los eslabones de la cadena de valor de la industria agrícola, sea alimenticia o no. Derivado de este ejercicio, surgen cientos de políticas, tanto a nivel local como internacional, que buscan regular el uso del suelo, la producción y los precios de los insumos del ejercicio agrícola. Esto representa también un reto para los biocombustibles pues gran parte del precio de los insumos depende de lo dictaminado por este sector. A esto añadimos también las políticas que, alrededor de todo el mundo, han surgido para regular las emisiones de gases de efecto invernadero, que deben ser menores cada vez. Esto es una tendencia positiva que apoya la producción de biocombustibles y estimula la disminución de combustibles fósiles permitiendo que éstos

⁶ ZIRKL, Frank. **Bioenergie aus Lateinamerika: Nachhaltiger Kraftstoff oder ökosozialer Zündstoff?** GIGA Focus. [En línea]. Septiembre, 2008 No. 9. [Fecha de consulta: 18 de octubre de 2016]. Disponible en: https://www.giga-hamburg.de/de/system/files/publications/gf_lateinamerika_0809.pdf

⁷ **Desde mayo, el 100% de la energía en Costa Rica es de fuentes renovables.** 03 de agosto de 2016. Recuperado el 18 de octubre de 2016, de <http://www.elespectador.com/noticias/medio-ambiente/mayo-el-100-de-energia-costa-rica-de-fuentes-renovables-articulo-647158>

sean utilizados con fines distintos a los combustibles, como lo podrían ser medicamentos y materiales.

Materias primas para bioetanol (caña de azúcar, maíz, remolacha azucarera) y para biodiesel aceite de palma, soja, de colza. En la actualidad estos dos biocombustibles cubren cerca del 1% de la demanda global de combustible [Zirkel, 2008].

2.3.1. Biodiesel en México.

La producción de biodiesel a partir de aceites vegetales es la mejor opción como materia prima debido a los precios bajos de compra y por un mayor potencial a diferencia de las grasas animales, sin embargo, la cantidad es reducida y se calcula entre 120 y 360 m³ por año. En conjunto, plantas comerciales en operación y en proceso de construcción, que constituyen la capacidad instalada en el país destinada a la producción de biodiesel en 2016, tienen una oferta de 4,182,000 L al año según un estudio realizado por el Programa de Gestión de Conocimiento de Energías Renovables, llamado Diagnóstico de la Situación Actual del Biodiesel en México, el cual también señala que el país cuenta con una capacidad instalada de al menos 1,268 m³ al año de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales usados y la instalación en 2016 de seis nuevas plantas con capacidad instalada de 4,182 m³ al año, siendo tres de ellas productores a partir de grasa animal, una de aceite vegetal usado y dos más a partir de higuera con catálisis heterogénea.⁸

2.3.2 Microalgas.

Debido a su alta producción de lípidos celulares, las microalgas han sido estudiadas como posibles fuentes de lípidos para transesterificación en la producción de biodiesel (Hu, et. Al, 2009). En la actualidad, existe en México una inversión de aproximadamente 25 mmdp que la Secretaría de Energía (SENER) y la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que será destinada a la formación de recursos humanos especializados, investigación y desarrollo tecnológico. Uno de los proyectos más importantes dentro de esta iniciativa es la construcción de una planta piloto en el Parque Industrial Tabasco Business Center, con una inversión por parte de SENER de 79 mdp y una metodología de cultivo acelerado de algas de la empresa mexicana Aspero Ecología con capacidades técnicas del Centro de Tecnología Avanzada (CIATEQ). Con la biomasa resultante se producirán diversos biocombustibles, entre ellos biodiesel y turbosina.

⁸ **Biocombustibles, ¿una respuesta al Hoy no Circula?** 05 de abril de 2016. De <http://www.forbes.com.mx/biocombustibles-una-respuesta-al-hoy-no-circula/#gs.Hse=XD4>

⁸ **Legislación en México y el mundo para biocombustibles.

2.4 Catálisis enzimática.

En los últimos años el estudio de síntesis de biodiesel usando enzimas ha mostrado un avance significativo, fomentado por la contaminación y por los problemas en la separación de los procesos que utilizan un catalizador químico homogéneo. El problema principal de la catálisis enzimática es el alto costo de las lipasas. Sin embargo, la estabilidad, la conversión y la durabilidad en sistemas batch de las enzimas reportada en diferentes estudios reduce el costo estimado del catalizador (D. Royon et al., 2007)⁹.

Las enzimas comúnmente usadas para las transesterificaciones de ácidos grasos son: *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, entre otras.

Para la transesterificación con enzimas generalmente se usan alcoholes de cadenas cortas como reactivos, por ejemplo, metanol. Aunque existe un problema, estos alcoholes presentan una solubilidad pequeña en los aceites. Por esto, a una concentración moderada, se presenta una separación en dos fases líquidas en el sistema. Los alcoholes son inhibidores de la reacción en altas concentraciones (superficiales), inhibiendo la actividad de la enzima. Por eso, si la enzima pasa a la fase alcohol disminuye la conversión global. La solución de este problema es la adición de cantidades pequeñas de metanol cada cierto tiempo. Otra alternativa es la adición de un medio soluble entre el aceite y el metanol. Similarmente, la baja solubilidad de glicerol en el biodiesel representa otra amenaza para la actividad enzimática. Esto obliga a que, el medio a utilizarse también debe ser miscible o parcialmente miscible con el glicerol.

⁹ **Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent.** D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Bioresource Technology* 98 (2007) 648-653.

2.4.1. Proteínas y enzimas.

Las enzimas son proteínas, formadas por aminoácidos que están unidos a través de enlaces covalentes y su función es catalizar reacciones químicas, originalmente aquellas que se llevan a cabo dentro de los seres vivos, es por eso que también son conocidas como biocatalizadores (Ramírez Ramírez, 2014)

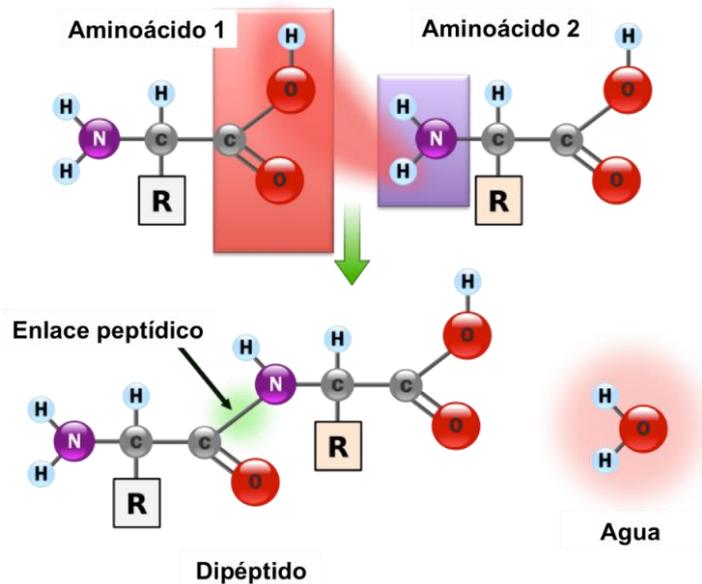


Figura 2. Reacción de condensación para la formación del enlace peptídico.

Hay veinte diferentes aminoácidos distintos, de los cuales, los primeros diez son esenciales para el ser humano (Marcos, 2011).

1. Fenilalanina-PHE
2. Isoleucina-ILE
3. Lisina-LYS
4. Metionina-MET
5. Treonina-THR
6. Triptófano-TRP
7. Valina-VAL
8. Arginina-ARG
9. Histidina-HIS
10. Leucina-LEU
11. Alanina-ALA
12. Prolina-PRO
13. Glicina-GLY
14. Serina-SER
15. Cisteína-CYS
16. Asparragina-ASN
17. Glutamina-GLN
18. Tirosina-TYR
19. Ácido aspártico-ASP
20. Ácido glutámico-GLU

Al igual que todas las proteínas, las enzimas cuentan con tres estructuras, a pesar de que la estructura química central es la misma, la secuencia de aminoácidos es distinta y específica, esto las hace diferentes. A esta secuencia de aminoácidos se le conoce como estructura primaria, la cual determinará la

función de la proteína y es una estructura no ramificada, por lo tanto, todas las proteínas poseen dicha estructura. Esta conformación lineal, puede adoptar varias formas en el espacio dependiendo de las interacciones entre los aminoácidos de la cadena formando plegamientos, los cuales constituyen la estructura secundaria de una proteína. Esta estructura pueden ser α -hélices ó β -láminas, que están constituidas a través de puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino de un aminoácido y el hidrógeno de la amina de otro aminoácido, dependiendo de la cadena de aminoácidos se verá más favorecida una α -hélice o una β -lámina a causa de la restricción del enlace peptídico (Marcos, 2011).

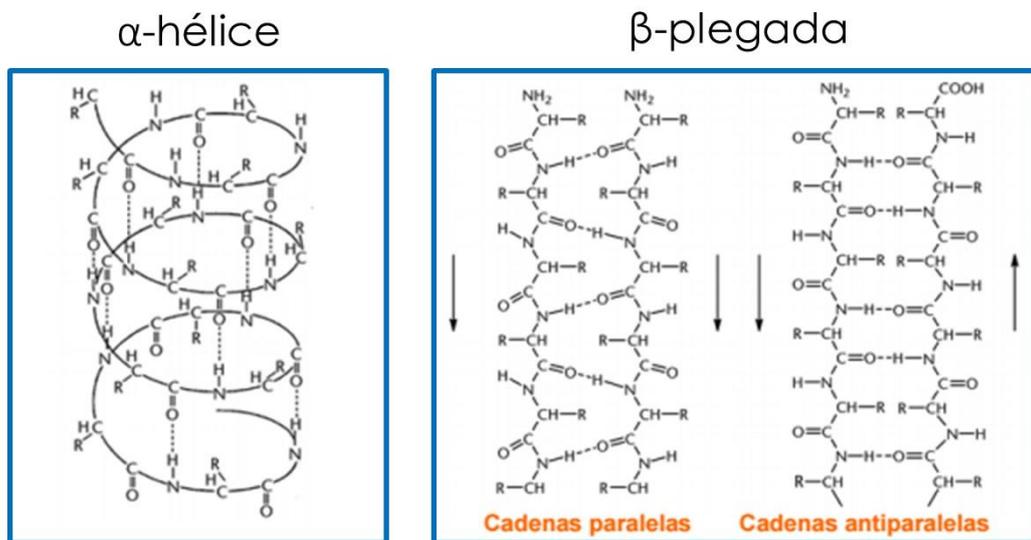


Figura 3 Alfa hélice / Beta plegada.

La estructura terciaria de las proteínas es la disposición espacial de todas las moléculas que conforman la proteína, que la hace responsable de sus propiedades biológicas porque esta disposición espacial determina su interacción con diferentes ligandos.

Las estructuras terciarias se caracterizan en dos diferentes tipos:

- Fibrosa. Cuando el ordenamiento dentro de la estructura únicamente tiene ligeras torsiones longitudinales.
- Globular. No existe una dimensión predominante y su forma es casi regular, esto es a causa de las interacciones entre las alfa hélices y betas plegadas, acodamientos y estructuras supersecundarias.

Existen distintos tipos de fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de las proteínas, generando así enlaces propios de esta estructura (Marcos, 2011), que pueden ser:

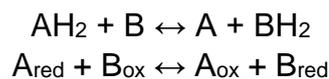
- Covalente, que pueden deberse a:

- Formación de un puente disulfuro entre dos cadenas laterales de Cys
- Formación de un enlace amida (-CO-NH-) entre cadenas laterales de la Lys y un aminoácido dicarboxílico (Glu o Asp)
- No covalente, que puede ser de 4 tipos:
 - Fuerzas electrostáticas entre cadenas laterales ionizadas, con cargas de signo opuesto.
 - Puentes de hidrógeno entre cadenas de aminoácidos.
 - Interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales apolares.
 - Interacciones dipolo-dipolo.

Existen miles de tipos de enzimas, que catalizan un sinnúmero de distintas reacciones, por lo que se les clasifica de distintas formas dependiendo de varios factores, pero la clasificación más importante es la que se hace dependiendo de su acción catalítica específica, para lo cual existen 6 tipos de enzimas¹⁰:

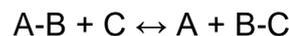
1. EC1. Oxidorreductasas.

Catalizan reacciones de óxido-reducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H⁺) o electrones (e⁻) de un sustrato a otro, según la reacción general:



2. EC2. Transferasas

Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, según la reacción.



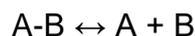
3. EC3. Hidrolasas

Catalizan reacciones de hidrólisis, según la reacción general:



4. EC4. Liasas

Catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos, según la reacción.



5. EC5. Isomerasas

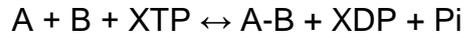
Catalizan la interconversión de isómeros.



¹⁰ Clasificación de las enzimas. (s.f.). consultado el 12 de octubre de 2016, de <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz13.htm>

6. EC6. Ligasas

Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.)



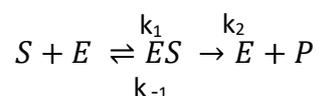
Existe también otra forma de nombrar las enzimas, que consiste en agregar el sufijo “-asa” al nombre del sustrato que catalizan, por ejemplo, lactasa que cataliza la conversión de lactosa en sus componentes fructosa y galactosa. También se agrega ese sustrato a la descripción de la reacción que cataliza, por ejemplo, la fosfofructocinasa-1 (PFK-1), que es una enzima reguladora de la glucólisis, cataliza la fosforilación de fructosa-6-fosfato para formar fructosa-1,6-bifosfato.

2.5. Cinética enzimática.

Una de las definiciones más aceptadas de catálisis es, la sustancia química que modifica el mecanismo de reacción provocando que la energía de activación de todo el sistema de reacción disminuya para que ésta pueda llevarse a cabo con una energía menor (Franco Vera, 2007).

Existen dos principales tipos de catálisis; la heterogénea, donde el catalizador adsorbe los reactivos y la homogénea donde los reactivos y el catalizador se encuentran en la misma fase (mezcla de reacción homogénea). Se puede considerar a la catálisis enzimática en la frontera de la clasificación, puede ser homogénea o heterogénea, lo que dependerá de la fase en la que se encuentre la enzima, si ésta última está disuelta en la mezcla de reacción, se considera homogénea; empero cuando está soportada, el sistema de reacción se convierte en un sistema catalítico heterogéneo. Con este procedimiento se tiene la ventaja adicional de que nos permite recuperar la enzima para reutilizarla. Una catálisis enzimática heterogénea representa grandes ventajas como abaratar gastos de producción al recuperar la enzima, sobre todo para aquellas que son muy costosas.

Leonor Micheallis (1875-1949) y Maud Menten (1879-1960), describieron el modelo mediante el cual ocurre la catálisis enzimática, dando lugar al modelo conocido como *Michaellis-Menten* (MM) (Fersht, 1999), el cual describe la siguiente reacción:



Esta reacción se supone irreversible y el producto (P) no se une nuevamente a la enzima (E) después de la reacción. El sustrato o reactivo (S) se une a la enzima (E), según el modelo "llave-cerradura" para formar un complejo enzima-sustrato (ES), cuya concentración se supone pequeña y constante según la aproximación del estado estacionario (Fersht, 1999). Con esto, la desaparición del complejo queda definida como:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad \dots (1)$$

Entonces:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad \dots (2)$$

Ellos hablaron de la constante Km, que corresponde a una relación de coeficientes cinéticos cuando la concentración de sustrato a la cual la enzima alcanza su velocidad media (Franco Vera, 2007), y se define como:

$$Km = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \dots (3)$$

Sustituyendo 3 en 2.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{Km} \quad \dots (4)$$

La velocidad de reacción se define según la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad \dots (5)$$

Donde la concentración total de enzima es:

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

de donde,

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad \dots (6)$$

Sustituyendo 6 en 4:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) * [S]}{Km} \quad \dots (7)$$

Reordenando:

$$Km[ES] + [S][ES] = [E_T][S] \quad \dots (8)$$

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{Km + [S]} \quad \dots (9)$$

Sustituyendo 9 en 5 se obtiene:

$$\frac{dP}{dt} = k_2[E_T] \frac{[S]}{Km + [S]} \quad \dots (10)$$

Otro parámetro, llamado $V_{m\acute{a}x}$, es la velocidad cuando, todos los sitios activos de la enzima están ocupados por moléculas de sustrato, y es por tanto, la velocidad a la cual se alcanza una conversión máxima. $V_{m\acute{a}x}$ es el producto de k_2 llamada también k_{cat} por la concentración total de enzima $[E_T]$. Usando esta definición en 10 tenemos:

$$\frac{dP}{dt} = V_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \dots \dots (11)$$

Todos estos ajustes fueron propuestos por Haldane para simplificar el modelo de la reacción propuesta por Michaelis y Menten (Fersht, 1999).

2.6 Lipasas.

Por la naturaleza de la reacción que catalizan, las lipasas han sido utilizadas en innumerables aplicaciones industriales y fueron propuestas en la síntesis de biocombustibles (Fukuda, Kondo, & Noda, 2001).

En la producción del biodiesel, la lipasa cataliza la formación de alquil ésteres de un ácido graso con un alcohol, dando como subproducto una molécula de glicerol, tal como se describe anteriormente la transesterificación (página 10.) Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles y su nomenclatura oficial es glicerol-éster hidrolasas (EC 3.1.1.3) (Bornscheuer *et al.* 1994). Una de las mayores ventajas de las lipasas es que son solubles en agua y catalizan sustratos insolubles en agua como lo son los lípidos. Sin embargo, por la inmiscibilidad de los lípidos en agua, numerosas investigaciones han procurado llevar a cabo las reacciones de hidrólisis de enlaces glicerol-éster en diferentes disolventes orgánicos, arrojando resultados positivos de la actividad enzimática de las lipasas en dichos disolventes, siendo los más comunes de éstos últimos *n*-hexano, ciclohexano y *t*-butanol.

Como todos los biocatalizadores, las lipasas tienen un sitio activo que es especialmente atractivo para las aplicaciones industriales por su regioselectividad, como es de esperarse, no todas las lipasas catalizan el mismo sustrato (ácido graso) ni con el mismo alcohol (que puede ser primario, secundario o hasta terciario) como es el caso de la lipasa *Candida antarctica* lipasa B (CalB) que muestra una enantioselectividad para alcoholes secundarios (Raza, Fransson, & Hult, 2001). **En este estudio se utilizaron las enzimas CalB y *Rhizomucor Miehei*. Para analizar los posibles cambios en la selectividad causados por la presencia de diferentes sustratos.**

Como fuente para producir biodiesel se utilizan diferentes ácidos grasos. Es bien sabido que los aceites son ricos en tri, di y monoglicéridos, así como en ácidos grasos libres, **para este proyecto se utilizan dos diferentes aceites: aceite comercial de cocina 123®, y aceite de ajonjolí.**

2.7 Mecanismo de reacción enzimática.

El mecanismo de transesterificación catalizado con lipasa CalB (serin hidrolasa), ya está descrito (Raza et al., 2001). Donde la triada catalítica (sitio activo de la enzima) está formada por tres aminoácidos: ácido aspártico-histidina-serina. Dicho sitio forma un intermediario con un alcohol en el sitio His-Ser para formar después una acil-enzima. A su vez, la acil-enzima forma un intermedio tetraédrico con agua para catalizar el paso reversible a la enzima libre y liberar el alcohol del intermedio.

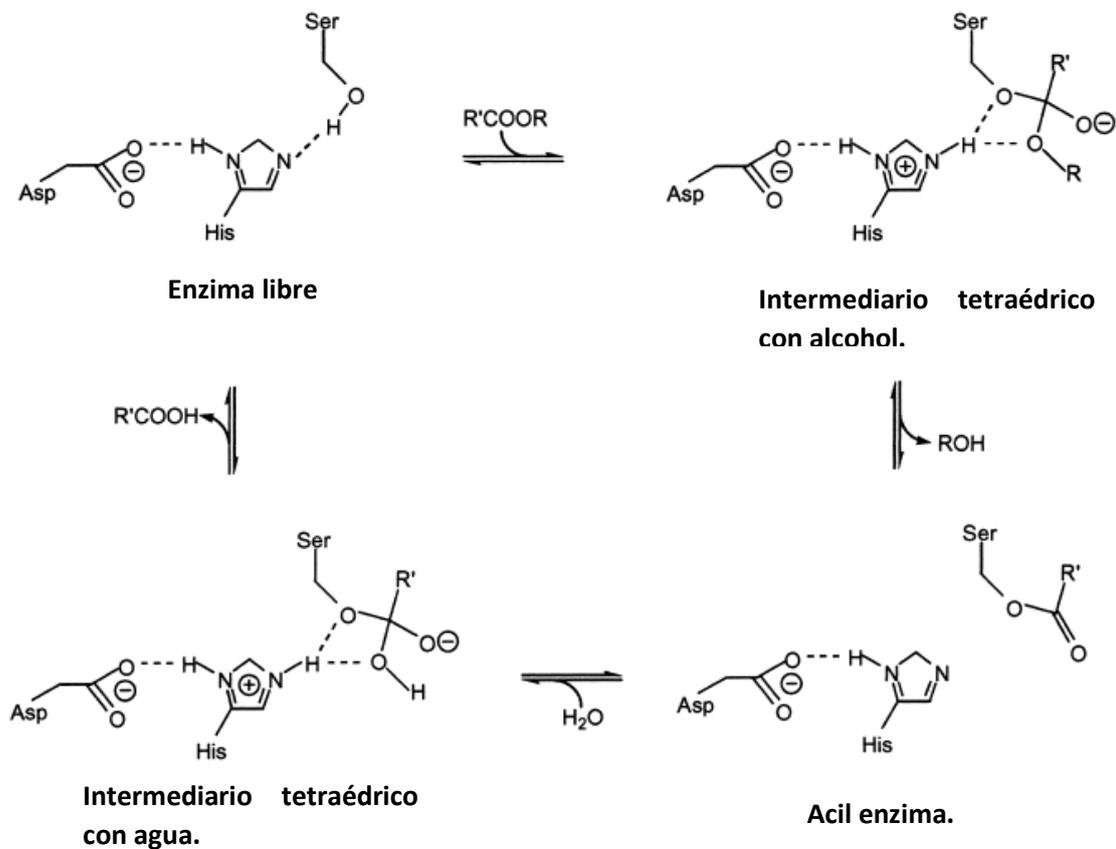
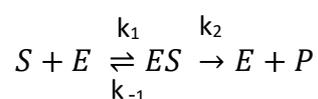


Figura 4. Mecanismo de catálisis de CalB (Raza et al., 2001).

El modelo cinético al cual se ajustará la reacción es al modelo de Michaelis-Menten. El cual está descrito por la siguiente reacción:



Derivadas de este modelo podemos obtener las siguientes ecuaciones cinéticas (Raza et al., 2001):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad \dots (12)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \dots (13)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \quad \dots (14)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] - k_{-1}[E][S] \quad \dots (15)$$

2.7.1 Suposición del estado pseudo-estacionario.

Según el modelo MM, se supone que a lo largo de la reacción, la concentración del complejo enzima-sustrato [ES] es constante y que además tiene una concentración muy pequeña, con lo que la ecuación 12 puede igualarse con cero, y reordenarse para introducir la constante Km.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad \dots (16)$$

Utilizando la ecuación 3, y la definición de Vmáx como el producto de la enzima total por k₂ tenemos la ecuación 11.

$$\frac{dP}{dt} = Vmáx \frac{[S]}{Km + [S]} \quad \dots (11)$$

Sustituyendo 9 en 14 tenemos:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}E_T \frac{[S]}{Km + [S]} - k_1[E][S] \quad \dots (17)$$

Reagrupando términos tenemos:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_a \frac{[S]}{Km + [S]} - k_e[S] \quad \dots (17a)$$

Donde k_a es el producto de la constante k₋₁ por [E_T] y k_e es el producto de la constante k₁ por [E].

De esta manera, la desaparición del sustrato dependerá de cuanto sustrato pueda verdaderamente unirse a la enzima para formar el complejo enzima-sustrato y qué parte de este último no logre convertirse en producto sino que, a través de una reacción reversible, vuelva a su forma de sustrato.

2.8 Aceite de microalgas.

Las microalgas son un grupo de microorganismos que viven en diversos hábitats ecológicos, que junto con las cianobacterias pertenecen a un grupo de seres vivos mejor conocidos como algas (Hu et al., 2008), y cuya habilidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales es muy amplia. Las microalgas suelen tener una producción elevada de lípidos celulares en condiciones de estrés metabólico. De entre los lípidos que producen están los tri, di y monoglicéridos, y ácidos grasos libres. En condiciones óptimas, la producción de ácidos grasos suele ser del 5 al 20% de la biomasa seca de algas, e incluyen ácidos grasos de cadenas desde 10 hasta más de 20 carbonos (Samantray, Guruprasad, & Ramachandra, 2010).

2.8.1. Botryococcus Braunii.

Botryococcus Braunii es un alga verde que puede crecer en agua dulce, lagos salobres, embalses y estanques, y que, como muchas algas se caracteriza por acumular altos niveles de lípidos (Metzger, 2005). Algunos géneros de *Botryococcus* pueden llegar a producir hasta un 14% de su masa total en lípidos, repartidos en aproximadamente el 40% de luteína, otro 40% de β -carotenos y el 20% restante en ácidos grasos libres, de los cuales, los principales son ácido hexadecadienoico (16:2), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3) (Dayananda, Kumudha, Sarada, & Ravishankar, 2010). Esta producción elevada de lípidos es favorable para extraer los lípidos para una transesterificación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis.

Establecer las condiciones cinéticas enzimáticas para la producción de biodiesel a partir de diferentes sustratos y disolventes.

3.2. Objetivo.

Producir biodiesel mediante la transesterificación enzimática usando distintos disolventes y sustratos.

3.2.1. Objetivos particulares.

- Estudiar el efecto de dos diferentes disolventes en la reacción de transesterificación catalizada con las enzimas *Candida Anctartica B* y *Rhizomucor Miehei*,
- Analizar la producción de biodiesel utilizando diferentes aceites: aceite comercial de cocina 123® y aceite de ajonjolí. Analizar la posibilidad de utilizar aceite de microalgas de la especie *Botryococcus Braunii*.
- Determinar la afinidad de las enzimas por el tamaño de la cadena de ácidos grasos.

Los resultados de este estudio aportarán información útil para establecer un sistema de enzimas que optimice la producción de biodiesel.

4. Desarrollo experimental:

4.1 Caracterización del aceite.

A la identificación y cuantificación de los componentes del aceite vegetal, se le conoce como caracterización del aceite. Uno de los problemas que se presentan para este cometido es la presencia de triglicéridos y que, en general, los ácidos grasos se adsorben fuertemente en la columna de análisis. Para evitar estos problemas se utilizó la técnica conocida como derivatización. En este caso particular se eligió la transesterificación con metanol.

4.1.1 Identificación por Cromatografía de gases-espectroscopia de masas. (GC-MS)

La caracterización de los aceites originales e identificación de los productos de reacción se realizó con cromatografía de gases-acoplada con un espectrómetro de masas (GC-MS) con columna capilar HP-1 de 105m, acoplado a detector de masas 7890B Agilent Technologies, detector de cuádruplo 5977A MSD (Cromatógrafo 2).

4.1.2 Derivatización de los aceites utilizados

Para la obtención de los componentes de un aceite, la reacción de derivatización utilizada fue la transesterificación con metóxido de sodio (CH_3ONa), este es un catalizador químico homogéneo, que se ha reportado, alcanza 98% (Kang-Shin, 2012) de conversión. Valores suficientes para conseguir una identificación confiable.

En resumen, se utilizaron 0.15g de CH_3ONa , 10 g de aceite, y 13 mL de MeOH en un reactor intermitente a una temperatura de 60 °C durante 2 horas, con agitación constante.

4.2 Reacción

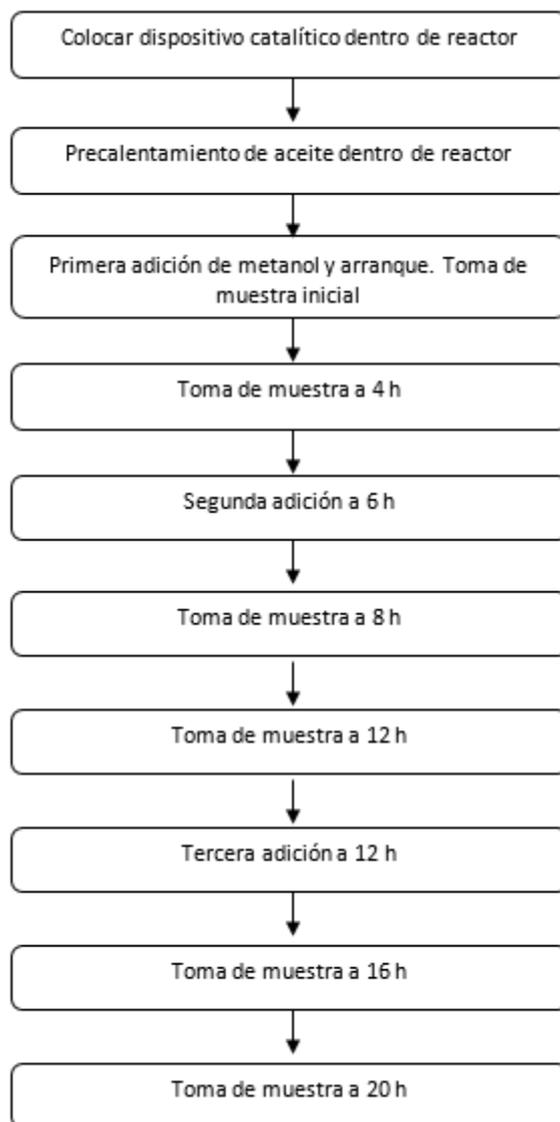
4.2.1 Análisis de reactivos y productos

El análisis cuantitativo para la cinética de las reacciones enzimáticas realizadas se hizo con cromatografía de gases con columna capilar DB-23 de 60m, en un equipo 7890A Agilent Technologies con detector de ionización de flama (FID).

4.2.2 Reacción

En el procedimiento experimental se utilizaron enzimas soportadas en Lewatitt C, Candida Antarctica (CaLB) y Rhizomuchor Miehei (RM) con 3 g de enzima por experimento, en pruebas distintas se usó t-butanol y hexano como disolventes con 53 g en cada reacción y metanol como uno de los reactivos. Los sustratos fueron aceite comercial de cocina 123® y aceite de ajonjolí en un reactor intermitente. La adición de metanol se realizó escalonadamente a las 0, 6 y 12

horas de reacción, con cantidades iguales a 10 mL en cada adición. Para seguir la velocidad de la reacción se tomaron muestras cada 4 horas. Las relaciones másicas utilizadas fueron las siguientes: 32.5% de solvente, 13.5% de metanol, 54% de aceite, y 0.34 g de enzima por cada gramo de aceite. (Royon, D., et al. 2007) A continuación, se muestran dos esquemas de las reacciones realizadas:



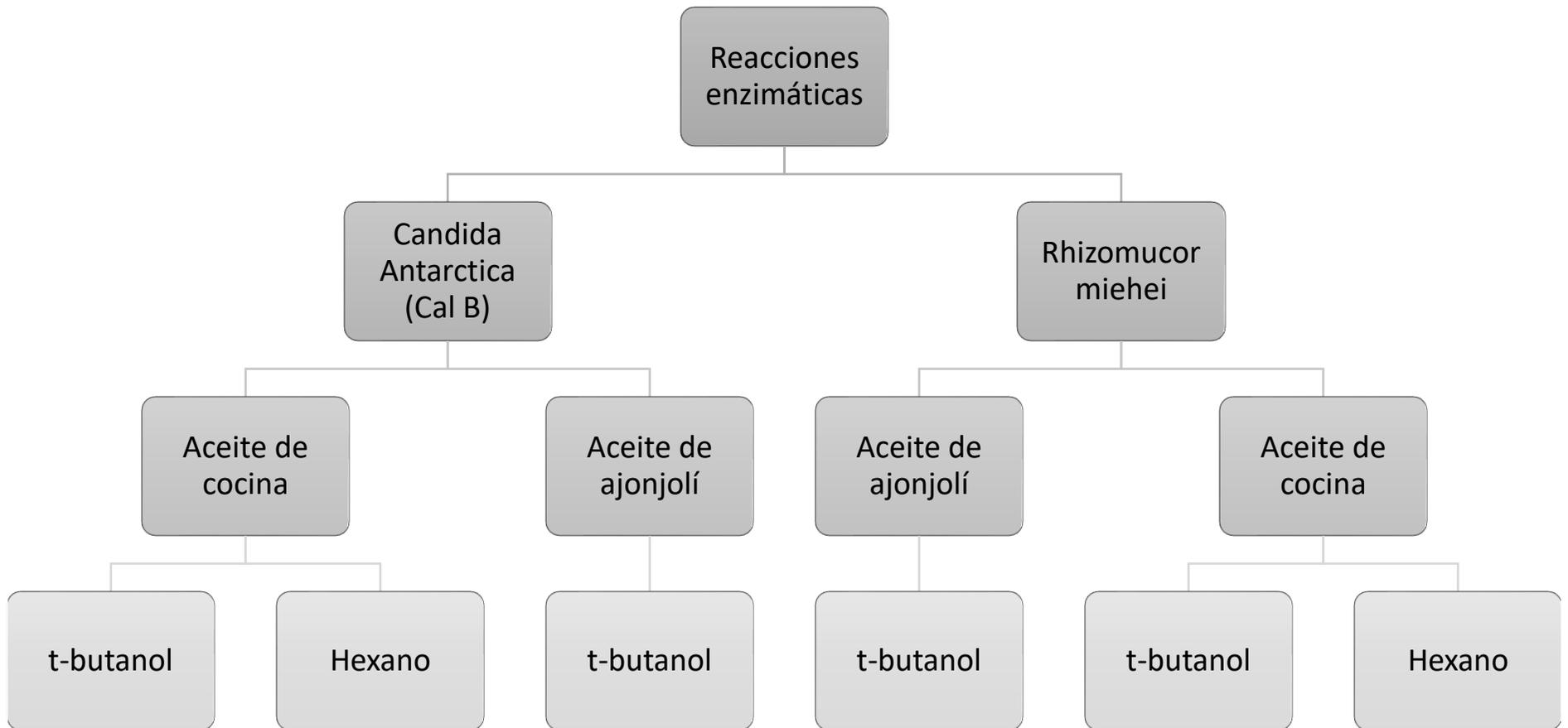


Figura 5. Esquema de reacciones realizadas

4.3 Reactor catalítico:

Con las primeras pruebas se realizaron dos observaciones: a) ocurría la pulverización del soporte de la enzima por el agitador magnético, b) las partículas del soporte se movían con el flujo. Esto último provoca un número de Reynolds bajo entre la superficie del soporte y el fluido. Para solucionar ambos problemas decidimos crear un dispositivo para mantener la enzima estática y permitir un libre flujo de la mezcla de reacción que aumente el número de Reynolds en la superficie del soporte, minimizando problemas de transferencia de masa. A continuación, se muestran imágenes del dispositivo creado:



Ilustración 1. Dispositivo catalítico CalB



Ilustración 2. Dispositivo catalítico RM

Es importante mencionar que para cuidar la actividad de las enzimas, es necesario almacenarlas después de realizar la reacción a una temperatura baja (10°C).

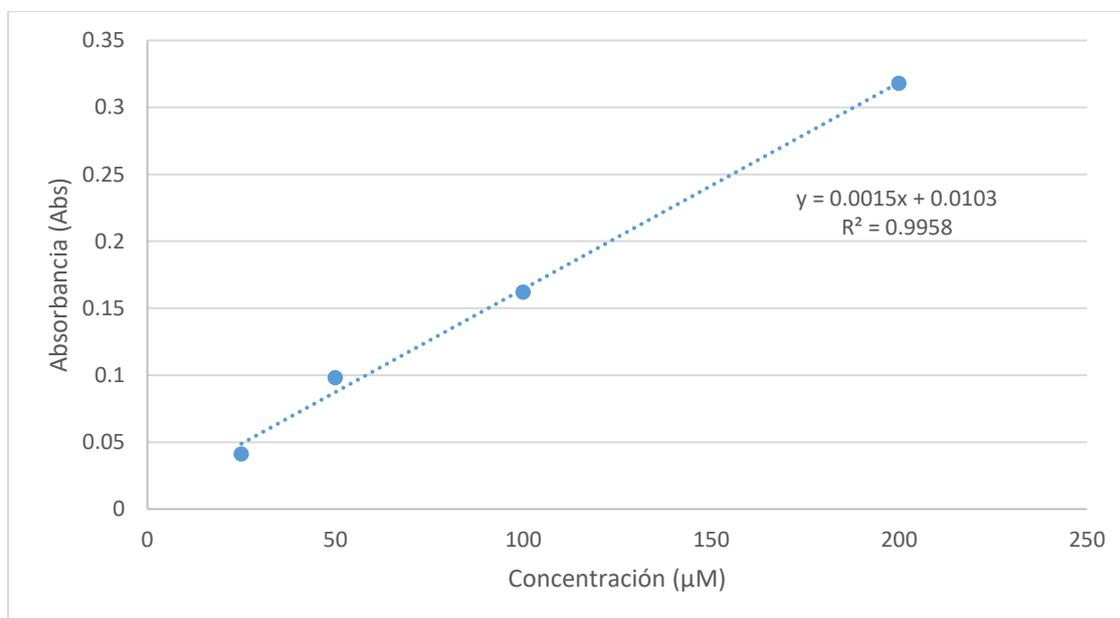
4.4 Actividad enzimática.

Para determinar la actividad enzimática de CalB, se empleó un método colorimétrico (Abd-elhakeem, Elsayed, & Alkhulaqi, 2013), donde para la obtención del coeficiente de extinción molar se debe construir una curva de calibración. Se utiliza la reacción de la enzima con acetato de fenilo para producir paranitrofenilo, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 1. Curva patrón para actividad enzimática de CalB

CURVA PATRÓN		
	Abs	C (μM)
1	0.041	25
2	0.098	50
3	0.162	100
4	0.318	200
5	0.82	250

La graficar los datos se obtiene la siguiente curva:



Gráfica 1. Absorbancia vs. Concentración

Donde el valor de la pendiente es el producto del coeficiente de extinción molar por el paso óptico. De la pendiente del gráfico 1, se obtuvo el siguiente resultado:

$$\epsilon = 0.03/\mu\text{M} \cdot \text{cm}$$

Una vez determinado el coeficiente de extinción molar, se realizaron las determinaciones de la actividad por enzima. Para ello, se hace reaccionar 0.018 g de paranitrofenilacetato para obtener acetónitrilo. Se disolvieron 0.615 mg de

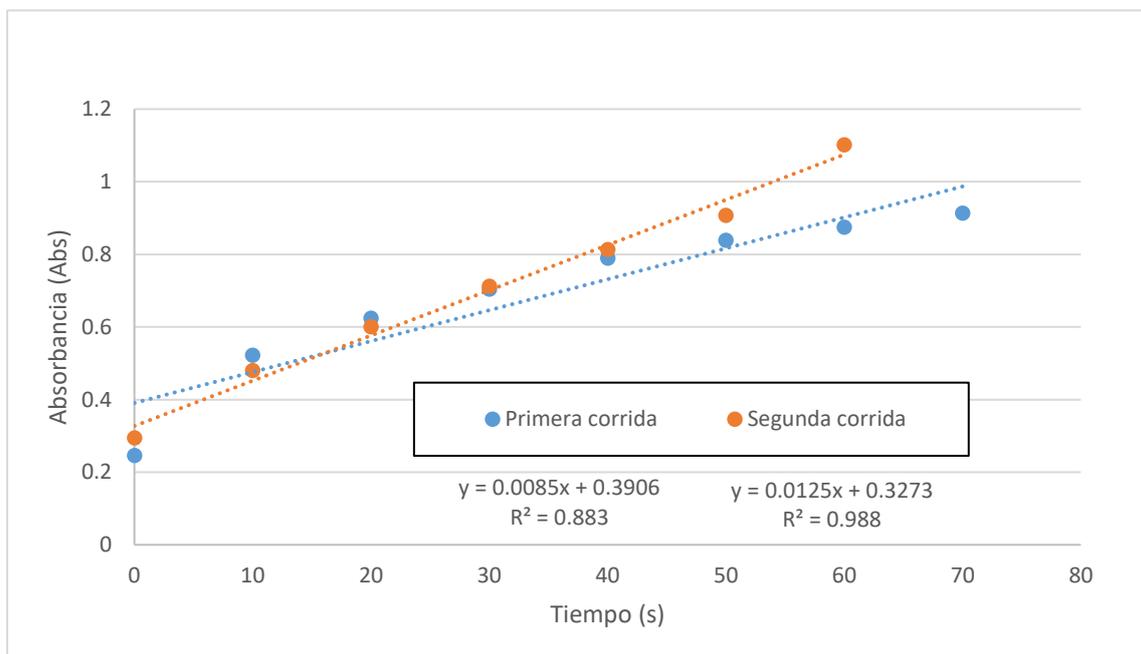
nitrofenilo en 100 mL de solución buffer de fosfatos y pH=7 para evitar cambios bruscos en el pH y con esto la desnaturalización de la enzima, y se pesaron 4.88g de CalB con soporte. El experimento se realizó por duplicado.

Finalmente, para determinar una posible desactivación del catalizador también se midió la actividad por enzima antes de la reacción de transesterificación enzimática y después de la misma.

Los valores iniciales de actividad enzimática fueron los siguientes:

Tabla 2. Valores para determinar la actividad enzimática.

REACCIÓN (abs)		
t	Exp.	Exp 2.
0	0.246	0.294
10	0.522	0.48
20	0.624	0.6
30	0.704	0.712
40	0.789	0.813
50	0.838	0.907
60	0.874	1.101
70	0.913	1.903



Gráfica 2. Absorbancia vs. Tiempo para CalB

Solo se evaluó la actividad enzimática para CalB, ya que es un método diseñado para dicha enzima. Por otra parte, el método no funcionaba con R.M.

Donde la pendiente del gráfico 2 entre el coeficiente de extinción molar y todo multiplicado por el factor de conversión de minutos a segundos, es la actividad enzimática (U) expresada en unidades internacionales.

Tabla 3. Actividad enzimática para CalB.

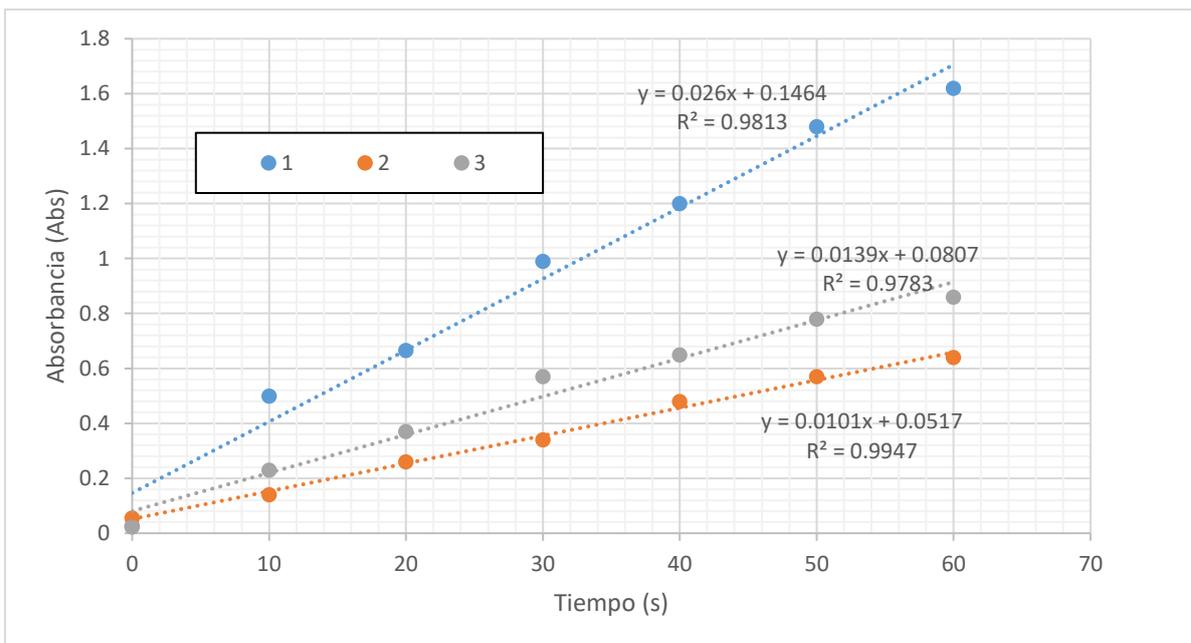
m	0.0125
	0.0085
U	500
	340

Entonces el valor promedio de la actividad enzimática antes de la reacción de transesterificación enzimática es: $U = 420$.

Se utilizó el mismo procedimiento para la actividad después de la reacción enzimática. La medición fue hecha después de 3 ciclos de reacción enzimática con aceite comercial de cocina 123® y metanol, utilizando t-butanol como medio de reacción. Cada ciclo de reacción duró 8 horas y al final de toda la reacción pudieron observarse dos fases. Una vez que terminaron tres ciclos de reacción, se tomaron las mismas proporciones de enzima que los utilizados antes de la transesterificación enzimática y se observaron los siguientes resultados:

Tabla 4. Absorbancia para CalB después de 3 ciclos de reacción.

Cal B			
t (s)	Abs		
	1	2	3
0	0.026	0.056	0.023
10	0.5	0.14	0.23
20	0.666	0.26	0.37
30	0.99	0.34	0.57
40	1.2	0.48	0.65
50	1.48	0.57	0.78
60	1.62	0.64	0.86



Gráfica 3. Actividad enzimática para CalB después de tres ciclos de reacción.

Donde, nuevamente, la pendiente del gráfico 3 entre el coeficiente de extinción molar (que es el mismo obtenido anteriormente), y todo multiplicado por el factor de conversión de minutos a segundos, es la actividad enzimática (U) expresada en unidades internacionales.

Los valores de las pendientes obtenidas fueron los siguientes:

Tabla 5. Actividad enzimática de CalB después de tres ciclos de reacción.

1	0.026	m
2	0.0139	
3	0.0101	

Entonces, la actividad enzimática obtenida después de varios ciclos es:

Tabla 6a. Actividad enzimática de CalB después de tres ciclos de reacción.

0	1112	U
1	1112	
2	556	
3	404	

Podemos decir varias cosas. Lo primero que observamos es que existe una discrepancia entre la enzima medida para la calibración de método contra la que se utilizó en los experimentos finales. Posiblemente se cambió el lote que nos proporcionaron por otro más reciente. Pero, se observa claramente una desactivación por cada uso de la enzima soportada. Entonces, según los

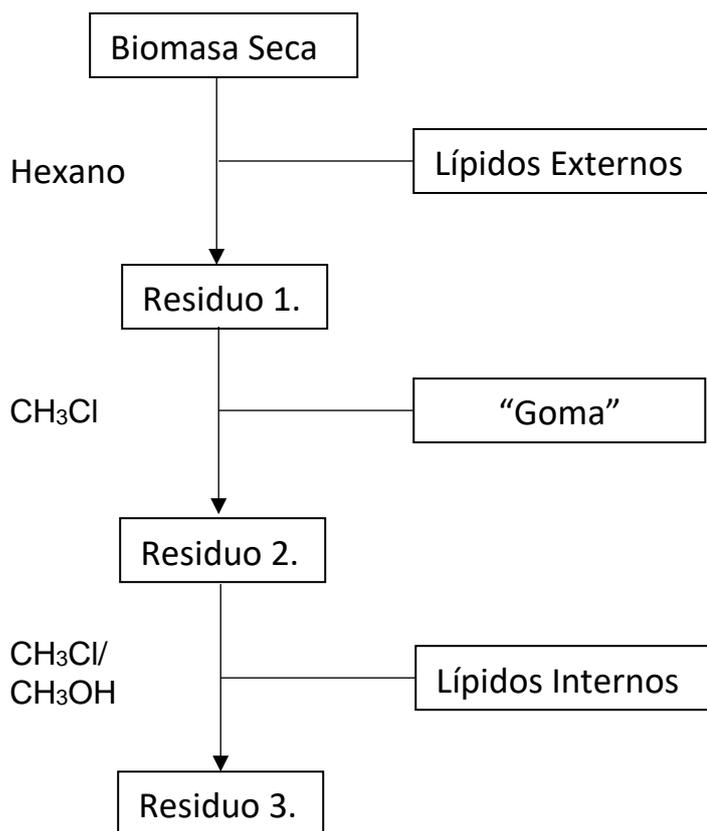
resultados obtenidos en las mediciones, después de 3 ciclos de 8 horas de reacción, la actividad lipasa se mantiene relativamente alta por lo que es posible utilizar la misma enzima después de al menos tres ciclos y conservar una actividad razonable.

4.5 Extracción de aceite de microalgas.

Para obtener aceite de *Botryococcus B.* se hicieron tres extracciones sucesivas. Como disolventes se utilizaron hexano, cloroformo y una mezcla CH₃Cl/CH₃OH 1:2.

En la primera extracción se obtienen los lípidos externos y los carotenoides (HaCohen, Zvi; Metzger P, 1999), una segunda extracción de la biomasa restante con cloroformo nos ayuda a separar parte de los constituyentes externos del alga, dando un producto elástico como una goma y finalmente, tras una extracción de la biomasa remanente con una mezcla CH₃Cl/CH₃OH (1:2) obtenemos los lípidos internos ricos en ácidos grasos transesterificables.

La extracción fue hecha tal como se muestra en el diagrama:



Sin embargo, la cantidad obtenida de lípidos transesterificables, debido a la pequeña cantidad de biomasa seca de micro alga, no fue suficiente para hacer la transesterificación enzimática. Por lo que no fue posible realizar la reacción enzimática con este reactivo.

5. Resultados.

5.1 Caracterización del aceite.

Se utilizaron dos cromatógrafos de gases GC-Masas y GC-FID ambos en columna capilar.

5.1.1.1 Cromatografía-Masas

Se realizó el análisis de cromatografía de gases acoplada a detector de masas de las dos materias primas utilizadas en las reacciones enzimáticas que fueron aceite de cocina convencional 123® y aceite de ajonjolí proveniente de un productor independiente.

5.1.1.1A Ácidos grasos presentes en el aceite de cocina

La figura 6 presenta el cromatograma de reacción de derivatización, en el cual podemos observar ocho picos importantes en la muestra inyectada. Para la identificación se utilizó la base de datos NIST 14 que tiene 250,000 compuestos. De los resultados de cualidad (coincidencias entre espectro experimental y espectros en la base de datos de detector) de estos ocho picos se seleccionaron los compuestos. En la tabla 7 se presentan compuestos identificados y sus respectivos tiempos de retención:

Tabla 7. Tiempos de retención y compuestos de CG-M.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Cualidad
8.479	Metanol	0.99
11.951	Glicerina	0.83
44.066	Metil éster de ácido Hexadecanoico	0.98
52.253	Metil éster de ácido 9,12-Octadecadienoico	0.99
52.605	Metil éster de ácido 9-Octadecenoico	0.99
53.756	Metil éster de ácido Octadecanoico	0.99
64.745	Metil éster de ácido 11-Eicosanoico	0.99
66.623	Metil éster de ácido Eicosanoico	0.99

Adicionalmente, se encontraron en pequeñas cantidades en la mezcla; Metil éster (ME) de ácido 7,10-Hexadecadienoico, ME de ácido 7,10,13-Hexadecatrienoico, ME de ácido 9-Hexadecenoico, ME de ácido 14-metil

Pentadecanoico, ME de ácido cis-10 Heptadecenoico, ME de ácido Heptadecanoico, ME de ácido trans-13 Octadecenoico.

Descontando el glicerol, el alcohol metílico y el disolvente, los ácidos grasos determinados en el aceite de cocina (1.2.3®) son:

Tabla 8. Proporciones de los ácidos grasos presentes en el aceite de cocina según análisis de CG-M.

Compuesto	Formula	%
ácido Hexadecanoico (ácido palmítico)	$C_{16}H_{32}O_2$	7.1
ácido 9,12- octadecadienoico (ácido linoleico)	$C_{18}H_{30}O_2$	30.9
ácido 9-Octadecenoico (ácido oleico)	$C_{18}H_{32}O_2$	55.4
ácido Octadecanoico (ácido linoleico)	$C_{18}H_{32}O_2$	2.4
ácido 11-Eicosanoico	$C_{20}H_{32}O_2$	1.4
ácido Eicosanoico	$C_{20}H_{32}O_2$	0.6

Adicionalmente, se tiene en la figura 7 la comparación de los espectros de masa donde se puede observar la paridad entre ellos corroborada por la cualidad, mostrada en la misma figura.

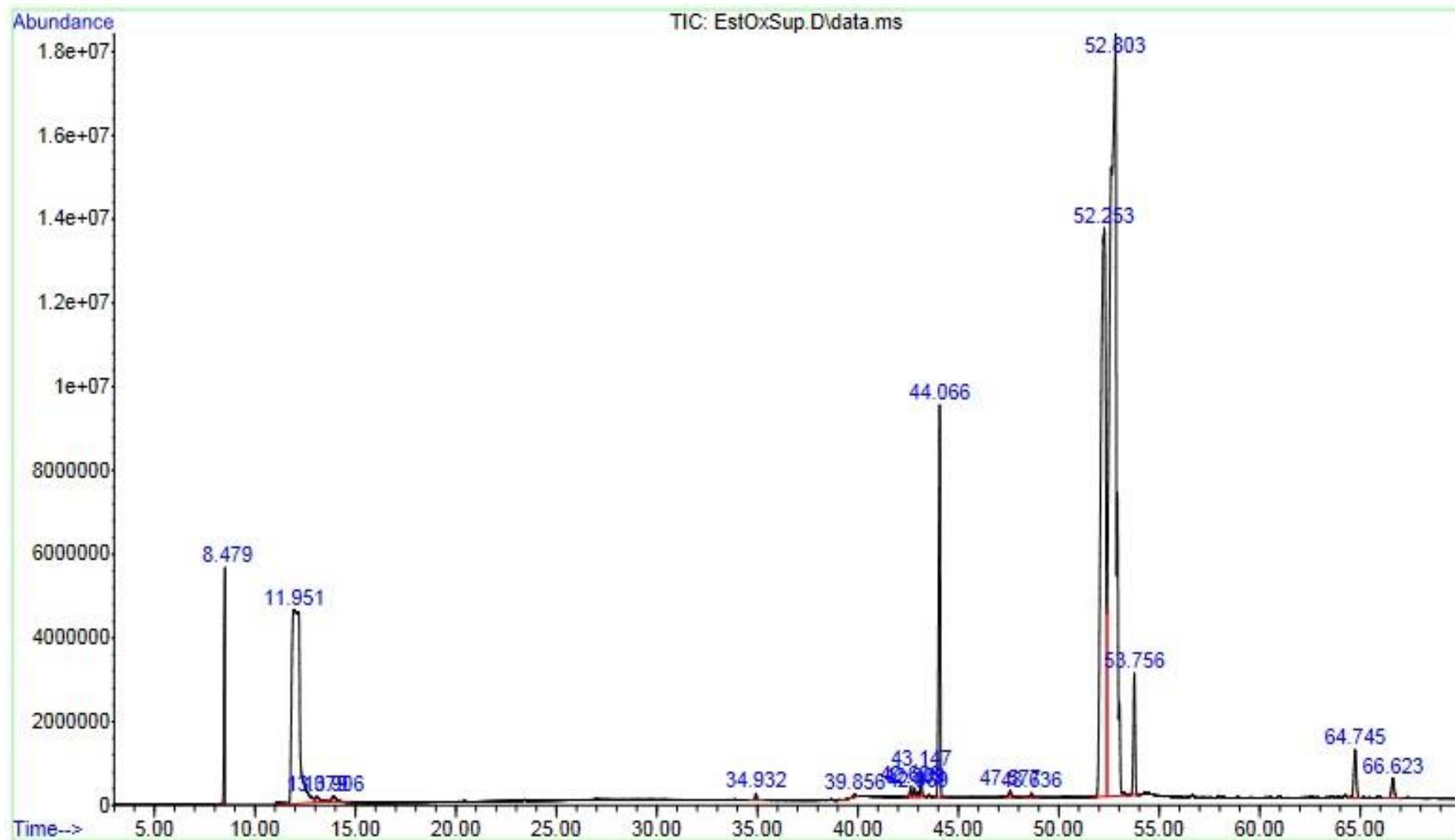


Figura 6. Cromatograma gases acoplado a masas de aceite de cocina

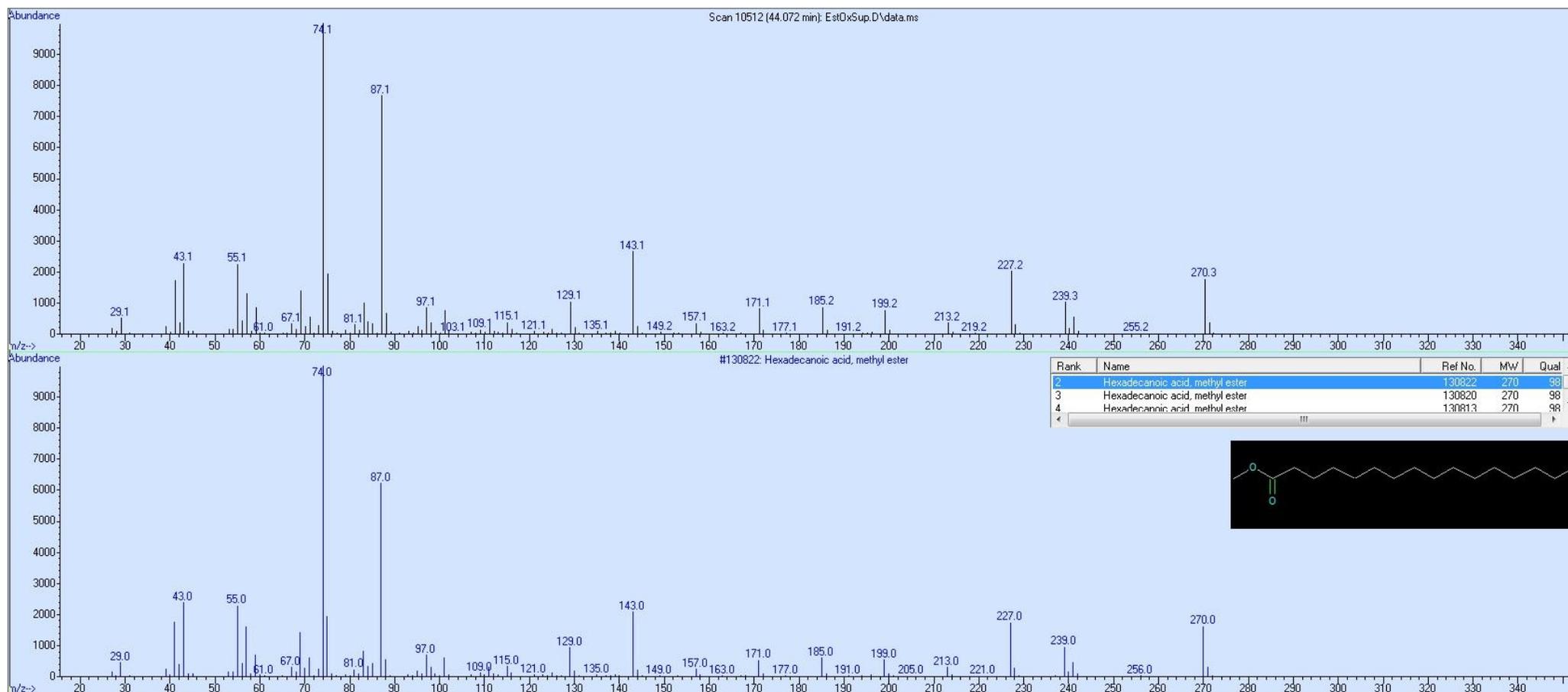


Figura 7. Comparación de espectros. Arriba: espectro del producto de reacción (metil éster de ácido hexadecanoico). Abajo: espectro de metil éster de ácido hexadecanoico de base de datos.

5.1.1.1B Ácidos grasos presentes en el aceite de ajonjolí (sésamo)

La Figura 8 es el cromatograma GC-MS de reacción con metóxido de sodio de aceite de ajonjolí, en el cual se pueden observar seis picos importantes por su contenido en masa de la muestra inyectada, sin tomar en cuenta metanol.

De la base de datos del cromatógrafo obtenemos resultados de calidad (coincidencias entre espectro experimental y espectros en la base de datos de detector) de estos siete picos, de los cuales, entre varios compuestos, seleccionamos los que concuerdan con la experimentación. Los compuestos seleccionados con respecto a tiempo de retención son:

Tabla 9. Tiempos de retención y compuestos en el aceite de ajonjolí según análisis de CG-M

Tiempo de retención (min.)	Compuesto	Cualidad
8.49	metanol	99
11.94	Glicerina	83
44.00	metil éster de ácido hexadecanoico	99
52.01	metil éster de ácido 9,12-Octadecadienoico (8,11)	99
52.47	metil éster de ácido 9-Octadecenoico	99
53.64	metil éster de ácido octadecanoico	99
67.48	metil éster de ácido 11-Eicosenoico	60

Tabla 10. Composición del aceite de ajonjolí según análisis de CG-M

Compuesto	Formula	%
ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	7.2
ácido 9,12 octadecadienoico	$C_{18}H_{30}O_2$	25.6
ácido 9 octadecenoico	$C_{18}H_{32}O_2$	24.4
ácido octadecanoico	$C_{18}H_{32}O_2$	3.1
ácido 11 eicosanoico	$C_{20}H_{32}O_2$	26.0

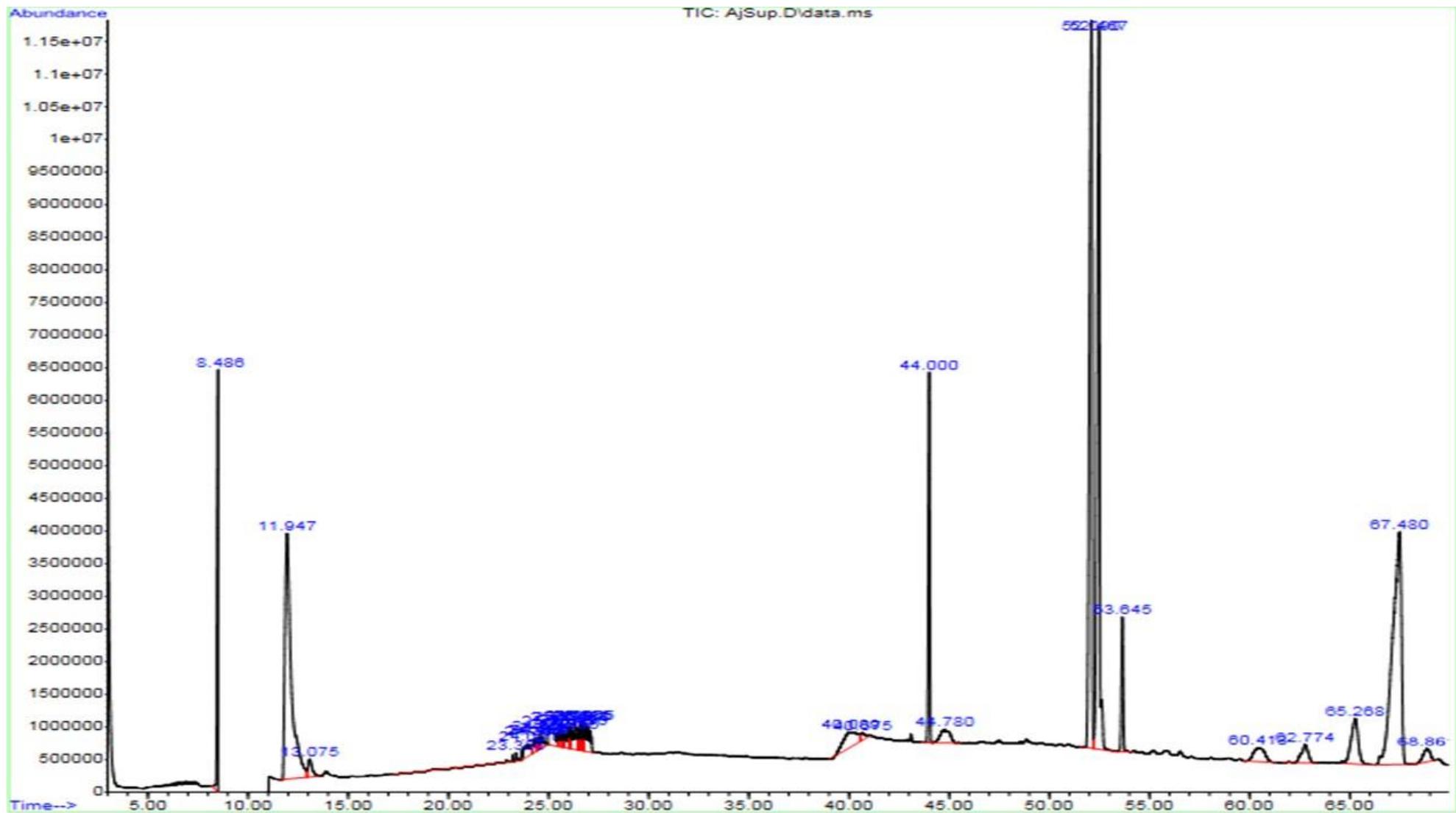


Figura 8. Cromatograma gases acoplado a masas de aceite de ajonjolí

5.1.2 Análisis de las muestras

Después de conocer los componentes principales de los aceites que se utilizan en la reacción, se puede trasladar la identificación al GC-FID y para de ahí calcular las conversiones. El análisis se realizó con un cromatógrafo 7890A Agilent Technologies. En el GC-FID se llevó el seguimiento a las reacciones enzimáticas, para obtener los conteos de área necesarios en los cálculos de conversiones. Para establecer la cantidad inicial por ácido graso se realizó la cromatografía y se cuantificó el contenido de ácido graso para las muestras derivatizadas con metóxido de sodio. Del cromatograma obtenido se tomaron en cuenta las áreas de cada componente como el 100% del ácido graso respectivo presente en el aceite original.

5.1.2. A Cromatografía de aceite de cocina con metóxido de sodio.

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con base en los resultados obtenidos por la cromatografía de masas-gases. Aunque se usaron columnas distintas se puede constatar, ver figura 6 y 8, que existe similitud en el orden de elución de los compuestos reportados en el GC-MS. Una diferencia de este cromatograma con el cromatograma resultante de espectroscopia de masas es que los metil ésteres más pesados de ácidos eicosanoicos e insaturados aparecen juntos.

5.1.2. B Cromatografía de aceite de ajonjolí con metóxido de sodio

La figura 10 muestra el cromatograma resultante del análisis. Se observa un pico pequeño al tiempo 9.56 minutos, que corresponde a la cantidad máxima de C16 en composición en la materia prima. Al minuto 13.83 se observa un pico mucho más grande, que corresponde a la composición de C18.

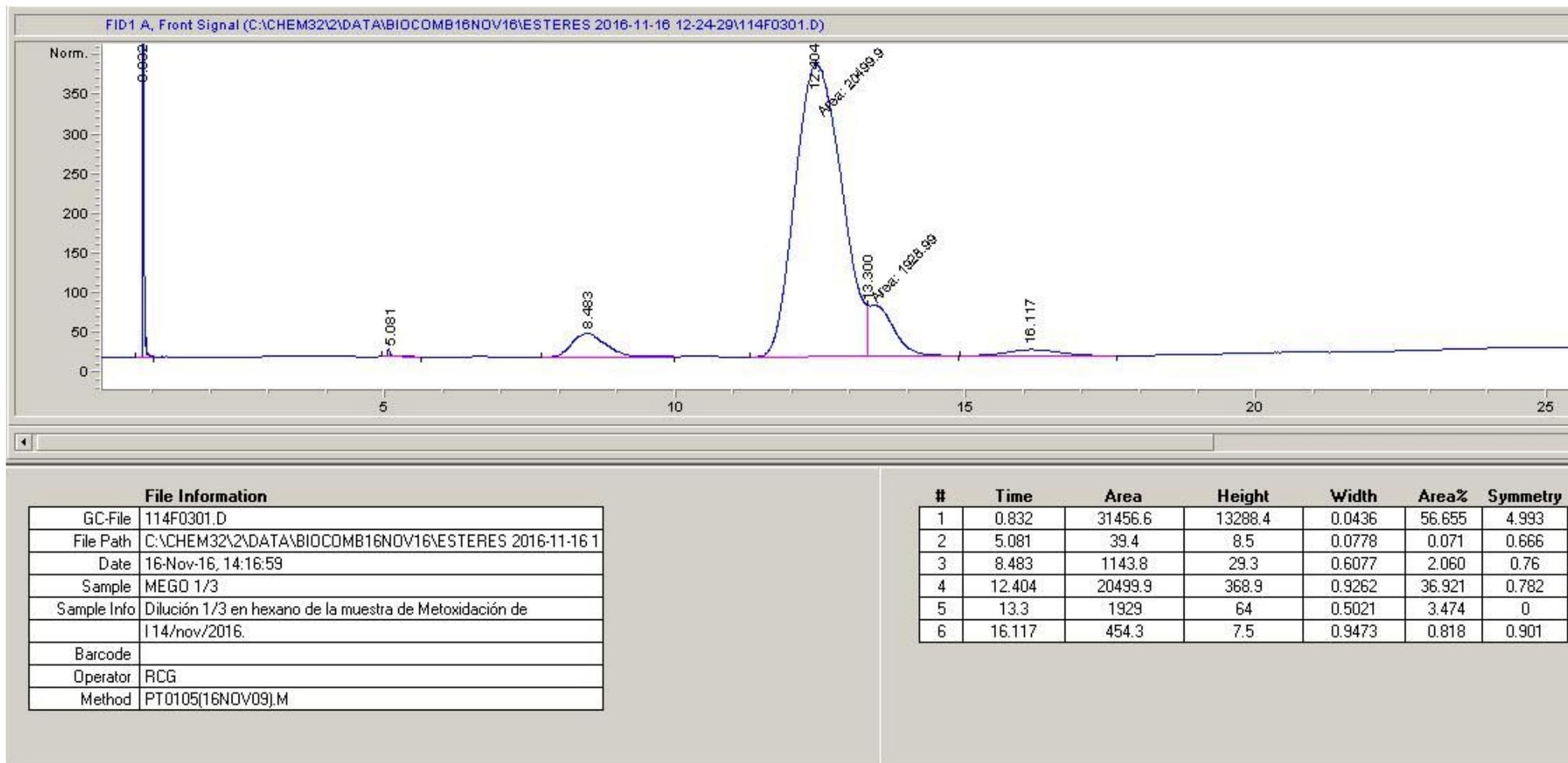


Figura 9. Cromatograma de reacción de aceite de cocina con Metóxido de Sodio

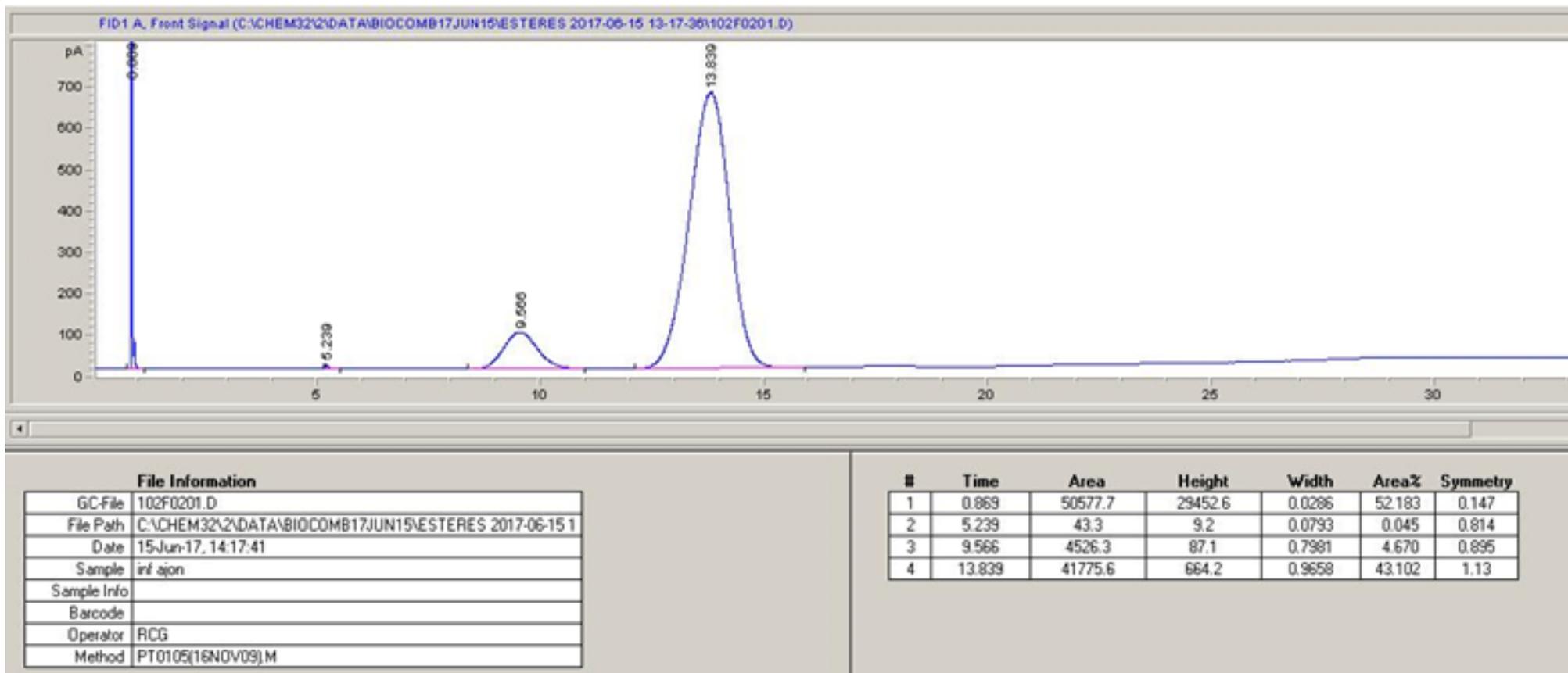


Figura 10. Cromatograma de reacción de aceite de ajonjolí con Metóxido de Sodio

5.2 Determinación de la composición por componentes.

Es necesario reportar el comportamiento de la conversión para seguir la cinética a distintos tiempos de reacción. La conversión se obtiene después de tener los conteos por componente en los análisis cromatográficos, de la forma:

$$\frac{\text{Cantidad original del ácido graso} - \text{Cantidad del ácido al tiempo} = t}{\text{Cantidad original del ácido graso}} = \text{conversión (X)}$$

Donde se recordará que la cantidad original del ácido graso fue cuantificada con la reacción de transesterificación con metóxido de sodio, reacción que se ha reportado casi completa (99% en 0.5 h.), en nuestro caso trabajamos hasta 2 h para garantizar una alta conversión del ácido graso original.

5.2.1 Productos obtenidos en la catálisis enzimática por GC-FID.

La figura 11 es uno de los cromatogramas obtenidos de la reacción enzimática de 20 horas con *Rhizomucor miehei* como catalizador y hexano como medio de reacción, del cual se muestra su análisis como ejemplo. De acuerdo con el análisis cualitativo por GC-MS de la materia prima, y considerando los tiempos de retención y tamaño respectivo de los picos. El pico de 5 min corresponde a glicerol, este tiempo de retención puede asignarse a que tiene un tamaño molecular menor que los demás compuestos.

De análisis GC-MS se sabe que los siguientes compuestos: 16 carbonos (metil éster del ácido hexadecenoico) e inmediatamente después de 18 carbonos (Metil éster de ácido 9,12-Octadecadienóico (8,11), Metil éster de ácido 9-Octadecenoico, Metil éster de ácido octadecanoico) corresponden a concentraciones altas. Los picos son anchos porque se presentan compuestos ramificados y/o hidrogenados. De manera similar los picos entre 16-20 min, corresponden a los compuestos con un número de carbono mayor a 20 carbonos, lineales, ramificados e hidrogenados (metil éster de ácido 11-Eicosenoico).

Una diferencia entre los cromatogramas de las muestras de reacción y el cromatograma de reacción de derivatización, es que en las condiciones de reacción se observan otros picos a los 20, 33, 35 y 36 minutos, El hecho de que salgan a tiempos más altos implica que son compuestos más pesados que los productos de reacción. Por lo que podemos asignarlos a tri, di y monoglicéridos. Con respecto al pico al minuto 20 no conocemos con certeza la identidad del compuesto, pueden ser monoglicéridos debido al peso molecular y, por lo tanto, las detecciones de los minutos de retención 33, 35, 36 corresponderían a 1, 2 diglicérido, 1, 3 diglicérido y triglicérido, respectivamente.

Otra diferencia es que no aparece un hombro separado del pico principal a lo que se supone que estos compuestos del hombro diferenciado se encuentran dentro del pico principal.

Para el ajuste de las constantes de Michaelis-Menten, se siguió la reacción a través del tiempo y se realizó el análisis cromatográfico de los compuestos de 16 y 18 carbonos identificados en la composición de la mezcla, al ser los únicos detectados con certeza en el cromatógrafo GC-FID.

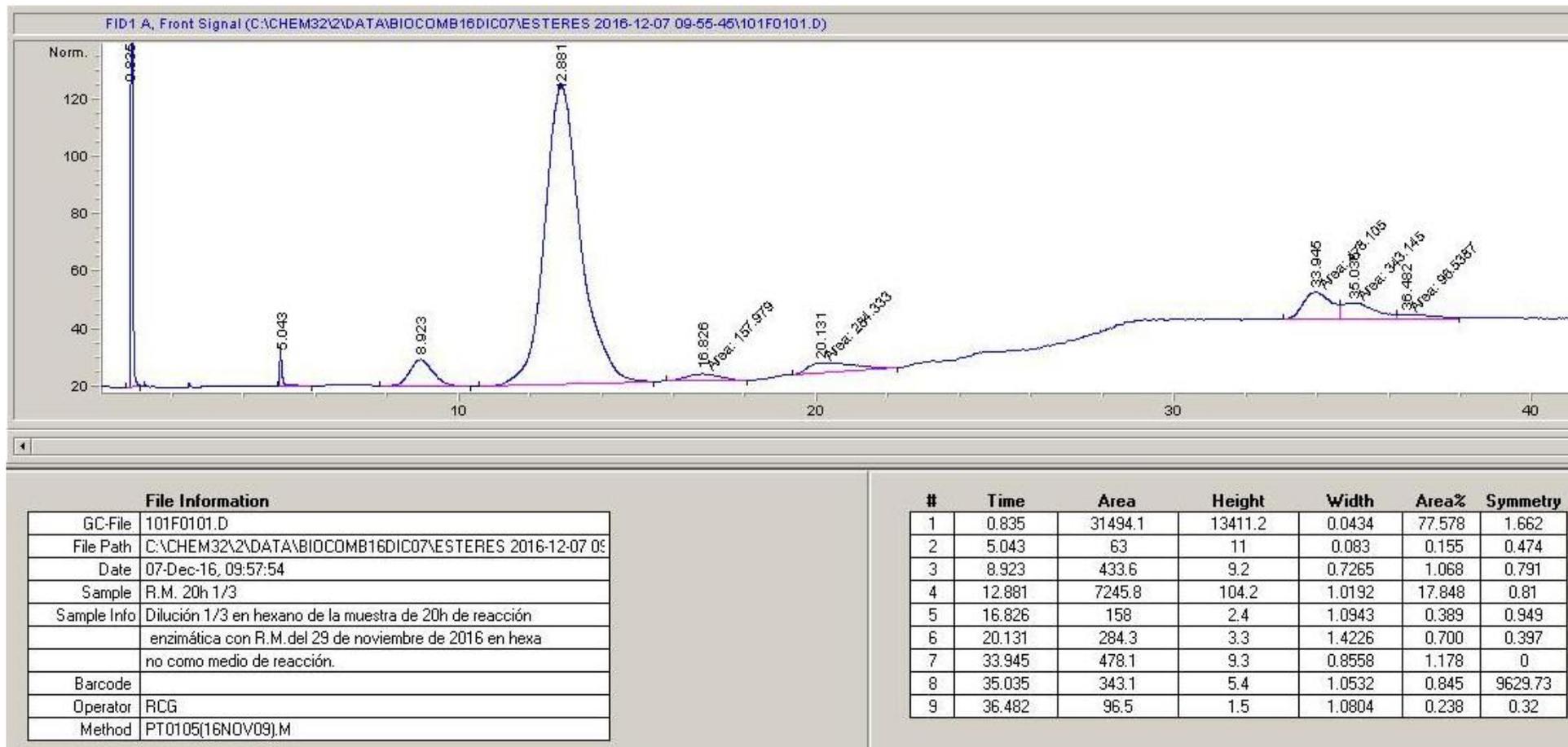


Figura 11. Cromatograma de reacción enzimática con RM a 20 horas

5.3 Análisis cinético por ácido graso.

Una vez identificados los componentes en el cromatograma, se hacen los cálculos de la conversión de acuerdo con la definición implementada (ver apéndice)

$$\text{conversión (X)} = \frac{\text{Cantidad original del ácido graso} - \text{Cantidad del ácido graso al tiempo=t}}{\text{Cantidad original del ácido graso}} = \frac{\text{Cantidad del éster respectivo presente a t=t}}{\text{Cantidad original del ácido graso}}$$

5.3.1 Conversiones obtenidas.

En la tabla 11 se presentan las conversiones obtenidas para el caso del aceite de cocina; así como los resultados del ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten. Los mismos resultados para el caso del aceite de ajonjolí se presentan en la tabla 12.

Tabla 11. Conversiones obtenidas para el aceite de cocina.

Aceite de cocina								
Disolvente	t-butanol				nHexano			
Enzima	Cal B		R.M.		Cal B		R.M.	
Sustrato	C ₁₆	C ₁₈						
Km	10.153	174.580	7.011	173.420	12.693	154.260	10.499	169.750
V _{máx}	0.594	7.367	0.351	5.925	0.739	6.492	0.375	4.821
Conv. Total	0.58	0.51	0.70	0.53	0.68	0.57	0.42	0.39

Tabla 12. Conversiones obtenidas para el aceite de ajonjolí.

Aceite de ajonjolí en t-butanol.				
Enzima	Cal B		R.M.	
Sustrato	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₆	C ₁₈
Km	6.635	96.634	1.0056	23.753
V _{máx}	0.04286	0.4867	0.001696	0.04476
Conv. Total	0.1216	0.0930	0.0266	0.0215

5.3.2 Obtención de parámetros cinéticos.

Usualmente para la obtención de los parámetros cinéticos se utiliza la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten (Diagrama Hanes-Woolf) que define los parámetros característicos empleando la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima. pero, esto obliga a que si se va a calcular los parámetros se debe trabajar a conversiones bajas.

En cambio, utilizaremos para la obtención de los parámetros cinéticos, un ajuste a la cinética de Michaelis-Menten, con el software Scientist® de Micromath. Los datos se ajustarán a la ecuación diferencial (11), se realizará una integración numérica con el método Runge-Kutta de cuarto orden y una minimización con el método simplex.

$$\frac{dP}{dt} = V_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \dots (11)$$

Esto fue porque en nuestro caso se decidió considerar todo el intervalo de tiempo de reacción para obtener datos más reales.

Una vez realizados los ajustes, la linealización y la resolución numérica de la EDO, se encontró que el ajuste lineal, a pesar de ser una buena aproximación al comportamiento cinético de las enzimas, no ajusta a los datos experimentales tan bien como el ajuste hecho en Scientist ® tal como se muestra en las secciones 5.3.2.1 *Resultados de la reacción con aceite de cocina* y subsecciones y en 5.3.2.2. *Resultados de la reacción con aceite de ajonjolí* y subsecciones (páginas 46 a 57).

Tal ajuste fue hecho en Scientist y se realizó de la siguiente manera:

De la ecuación diferencial (11), descrita en la sección **2.5 Cinética enzimática**.

$$\frac{dP}{dt} = V_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \dots \dots (11)$$

Se utilizó despejando dP :

$$dP = V_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{K_m + [S]} dt$$

De la ecuación anterior, se tiene una concentración inicial de sustrato para cada cadena del sustrato.

Para los subsecuentes valores de sustrato comenzada la reacción, se expresa la concentración de sustrato al tiempo t como:

$$[S]_t = [S]_0 - [P]$$

Que describe el aumento de la concentración del producto, según la desaparición del sustrato.

Así los valores independientes son el tiempo al cual se tomaron las muestras, las variables dependientes y ajustadas son las concentraciones de sustrato para cada cadena dentro de los triglicéridos. Los valores calculados por el programa son los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$.

Adicional al ajuste hecho con Scientist®, se hizo también el ajuste lineal utilizando con Excel™, el cual muestra que el ajuste de los datos no es lineal.

5.3.2.1. Resultados de la reacción con aceite de cocina.

5.3.2.1.A Ajuste aceite de cocina con CalB en terbutanol

a) Compuestos C16

Los resultados obtenidos se muestran a continuación. Primero se presentan los datos obtenidos con la reacción de T.E. en *t*-butanol como medio de reacción.

Tabla 13. Conversiones experimentales y valores predichos por el ajuste del ácido graso C16 con CalB en *t*-butanol

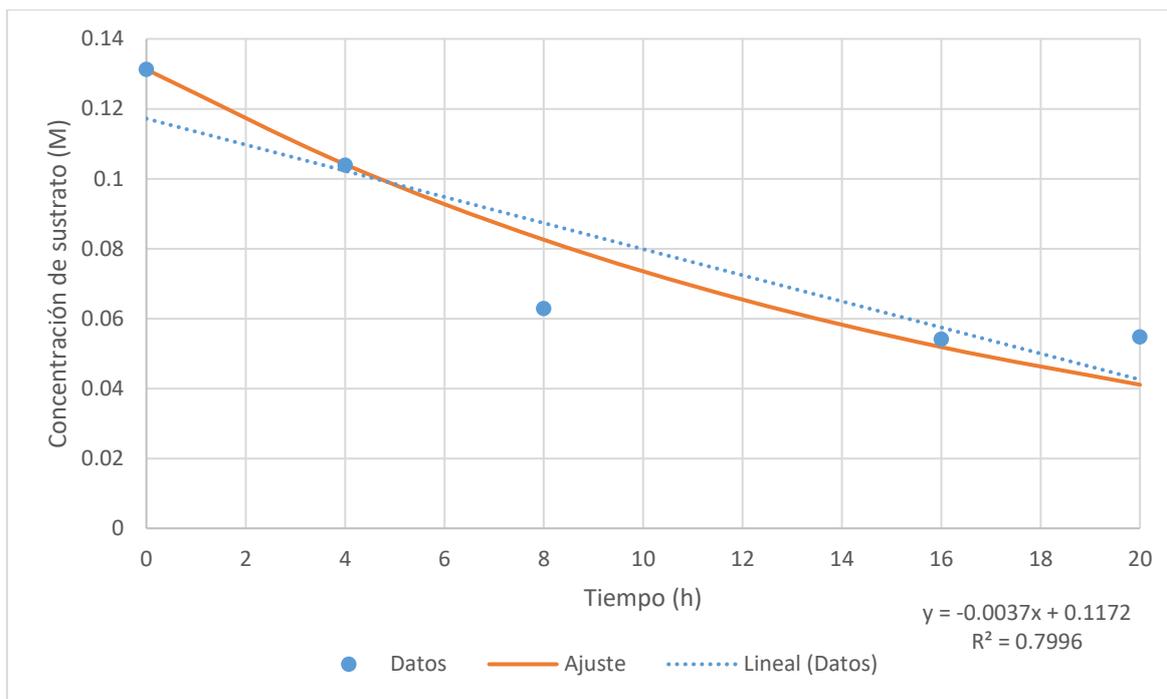
C ₁₆ catalizado con CalB		
t (h)	C ₁₆	Ajuste
0	0.13125162	0.13125
4	0.10389629	0.10411
8	0.06283799	0.082551
12	-	0.065435
16	0.05406979	0.051855
20	0.05473455	0.041084

Para tal ajuste, los parámetros cinéticos son:

Todos los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del ajuste hecho con Scientist®, sin embargo, se muestra también el ajuste lineal hecho por Excel®. Podemos observar que el ajuste lineal, aunque nos da una buena aproximación, no es el que mejor ajusta a los datos experimentales obtenidos

K_m : 10.153 M h⁻¹

$V_{máx}$: 0.59395 M



Gráfica 4. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C16 con CalB en t-butanol

b) Compuestos C18

Se presenta la tabla 13, que representa el comportamiento experimental de la concentración para compuestos con una cadena 18 carbonos catalizada con CalB, también se presenta el resultado de la predicción en la concentración por el ajuste alcanzado observamos el siguiente comportamiento:

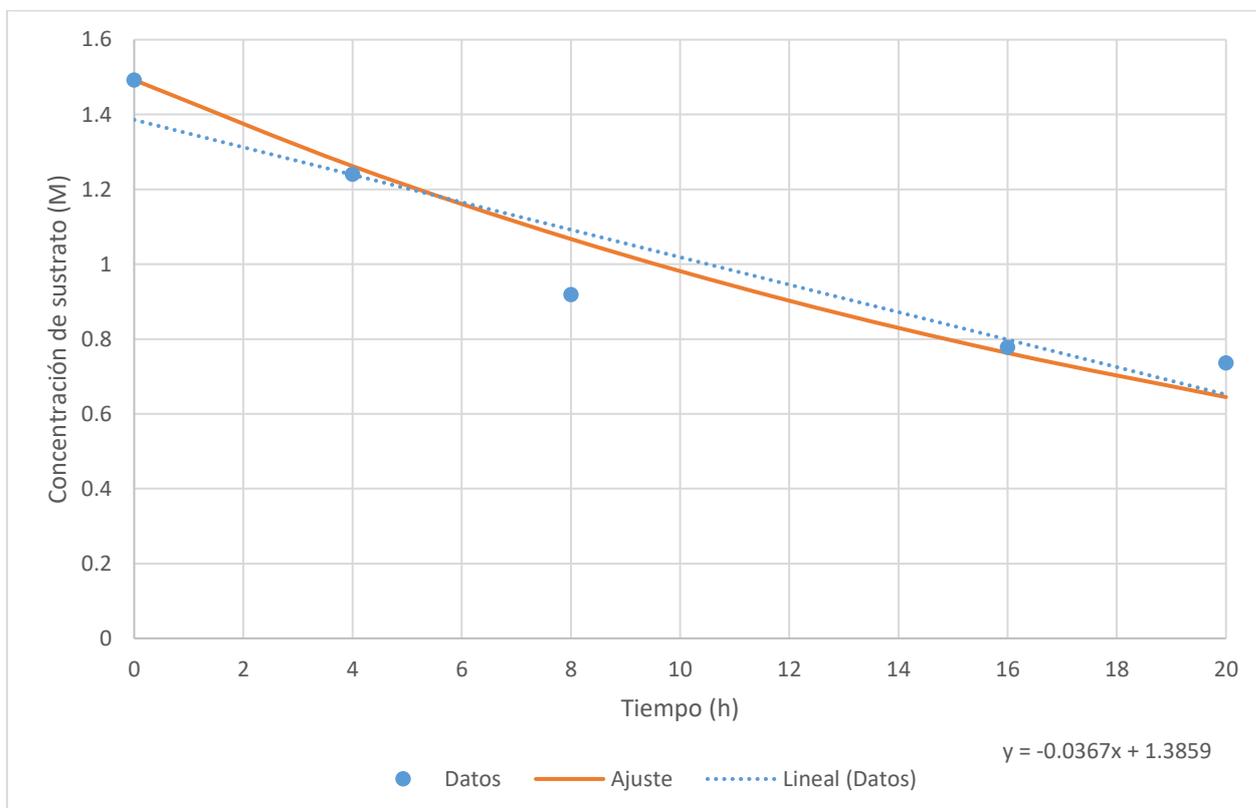
Tabla 14. Concentraciones experimentales y valores predichos con ajuste para el del ácido graso C18 con CalB

C ₁₈ catalizado con CalB		
t (h)	C ₁₈	Ajuste
0	1.49238248	1.492382
4	1.24064772	1.2622
8	0.91931083	1.0674
12	-	0.90243
16	0.77834576	0.76287
20	0.7364723	0.64481

Se puede observar que los resultados del ajuste son buenos. Los resultados de los parámetros por Scientist fueron:

K_m: 174.58 M h⁻¹

V_{máx}: 7.3673 M



Gráfica 5. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C18 con CalB en t-butanol

5.3.2.1.B Ajuste aceite de cocina con R:M en terbutanol

a) Compuestos C16

Los siguientes resultados, corresponden también a la reacción en t-butanol como medio de reacción, pero esta vez catalizada con R.M.

Para la cadena de 16 carbonos observamos el siguiente comportamiento:

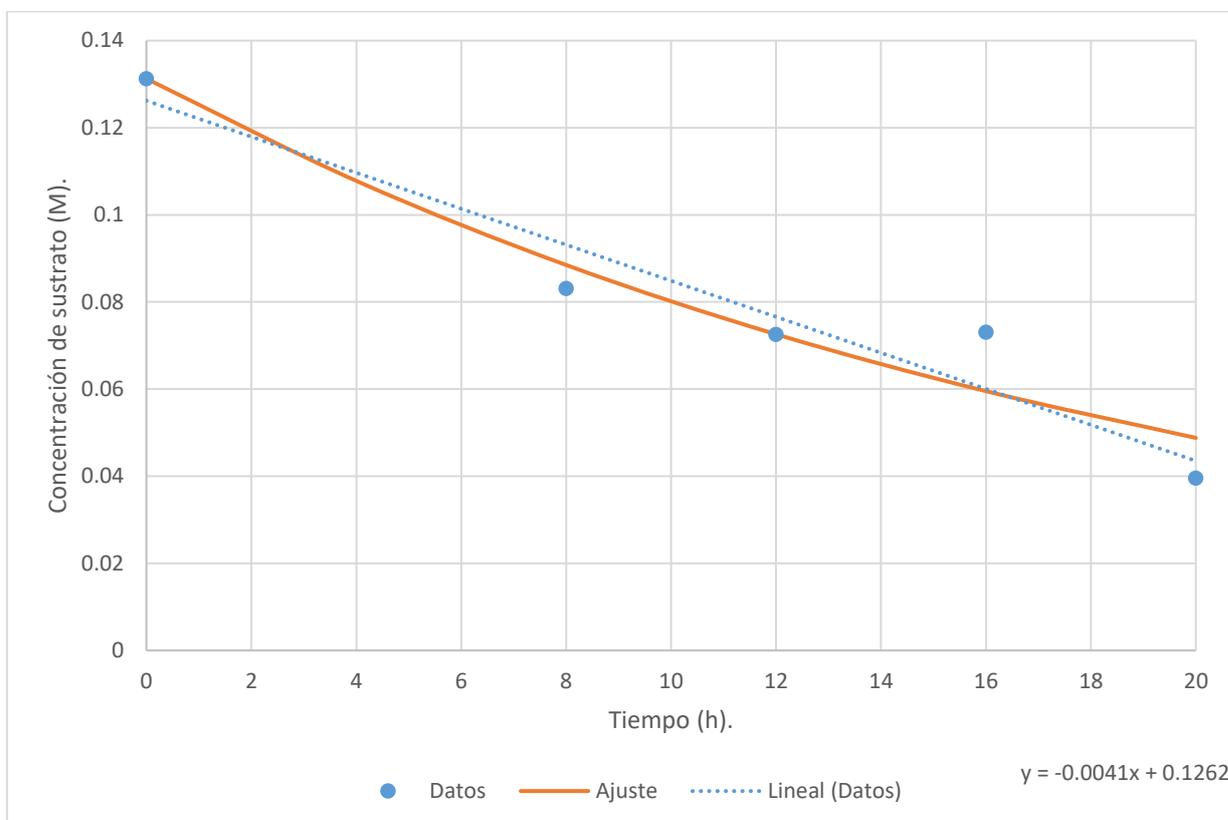
Tabla 15. Conversiones experimentales y valores de concentración predichos con ajuste para ácidos grasos C16 con RM en t-butanol

C₁₆ catalizado con R.M.		
t (h)	C₁₆	Ajuste
0	0.131252	0.131252
4	-	0.1078
8	0.083079	0.088482
12	0.07253	0.072593
16	0.073041	0.059533
20	0.039588	0.048806

Los parámetros cinéticos de esta reacción son:

Km: 7.0108 M h⁻¹

Vmáx: 0.35089 M



Gráfica 6. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C16 con RM en t-butanol

b) Compuestos C18

Los resultados de la cadena de 18 carbonos son los siguientes:

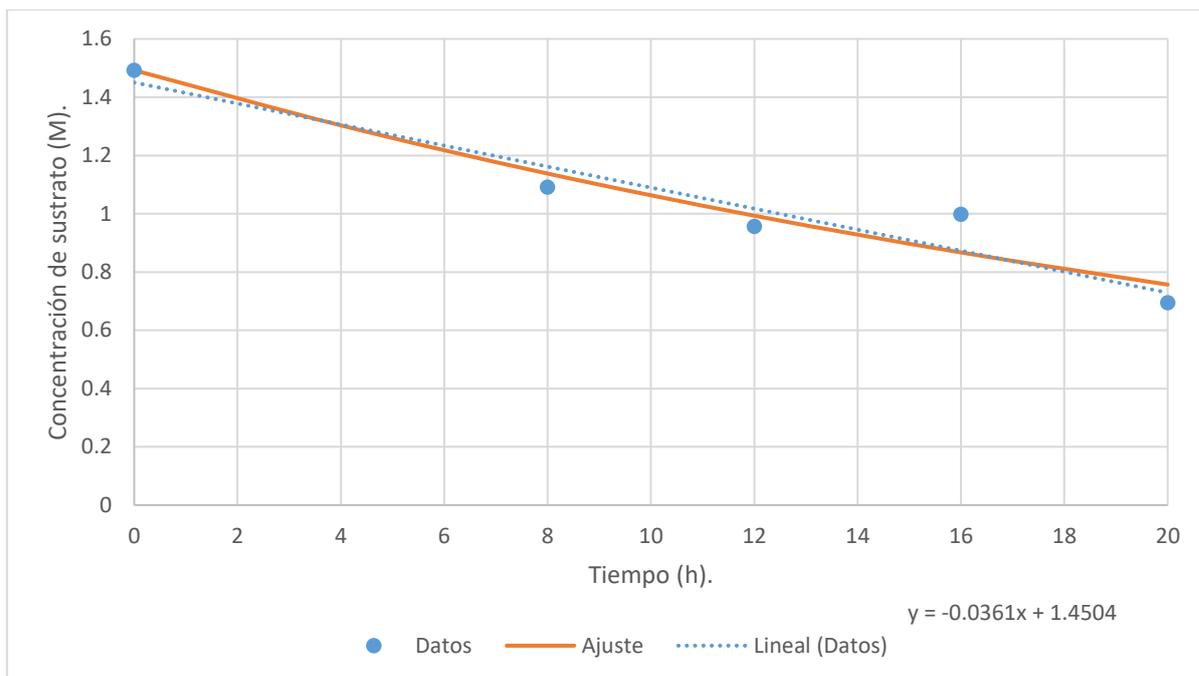
Tabla 16. Concentraciones experimentales y predichas con el ajuste de C18 con RM en t-butanol

t (h)	C ₁₈	Ajuste
0	1.492382	1.4924
4	-	1.3032
8	1.090902	1.1378
12	0.956252	0.99325
16	0.997868	0.867
20	0.694058	0.75672

Y sus respectivos parámetros enzimáticos son:

Km: 173.42 M h⁻¹

Vmáx: 5.9254



Gráfica 7. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C18 con RM en t-butanol.

5.3.2.1.C Ajuste aceite de cocina con CalB en n-hexano

a) Compuestos C16

A continuación, se muestran los resultados de la reacción utilizando aceite comercial de cocina 1.2.3® como sustrato y *n*-Hexano como disolvente, para ambas enzimas como catalizadores.

Para la cadena de 16 carbonos catalizada con CalB podemos apreciar los siguientes resultados:

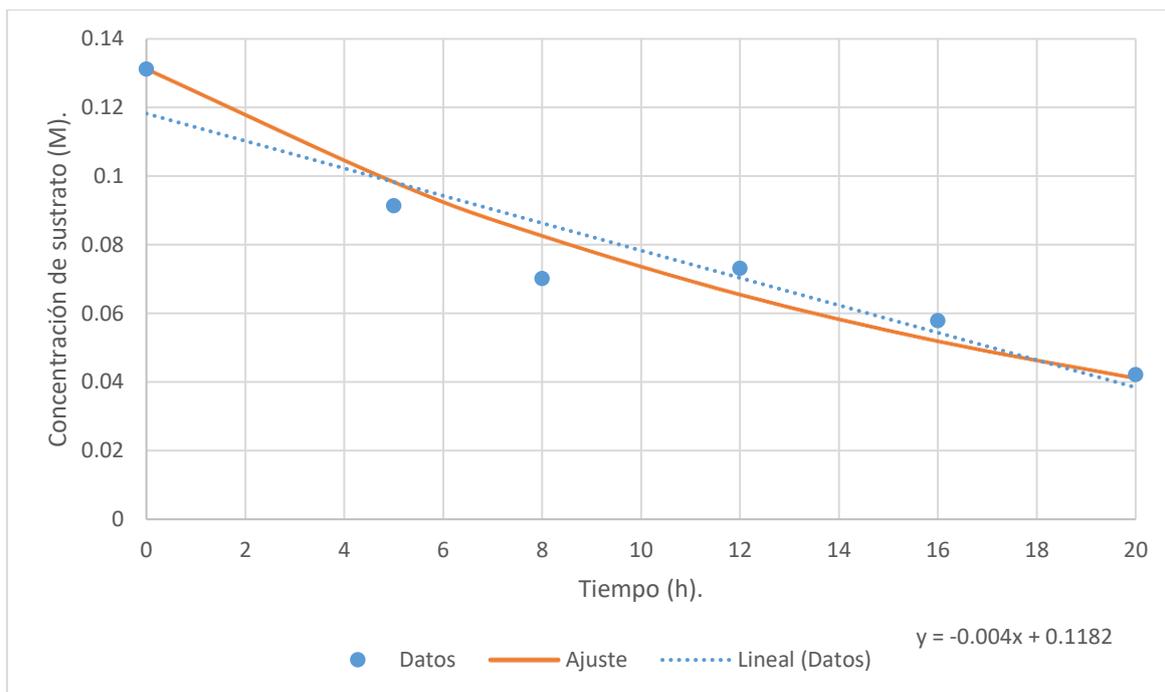
Tabla 17. Conversiones y ajuste de C16 con CalB en hexano

C₁₆ catalizado con CalB		
t (h)	C₁₆	Ajuste
0	0.131252	0.13125
5	0.091416	0.098337
8	0.070206	0.08267
12	0.073111	0.065573
16	0.057889	0.051998
20	0.042145	0.041224

Los parámetros cinéticos son:

K_m: 12.693 M h⁻¹

V_{máx}: 0.74



Gráfica 8. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C16 con CalB en n-hexano.

b) Compuestos C18

Enseguida se muestran los resultados para las cadenas de 18 carbonos con CalB como catalizador.

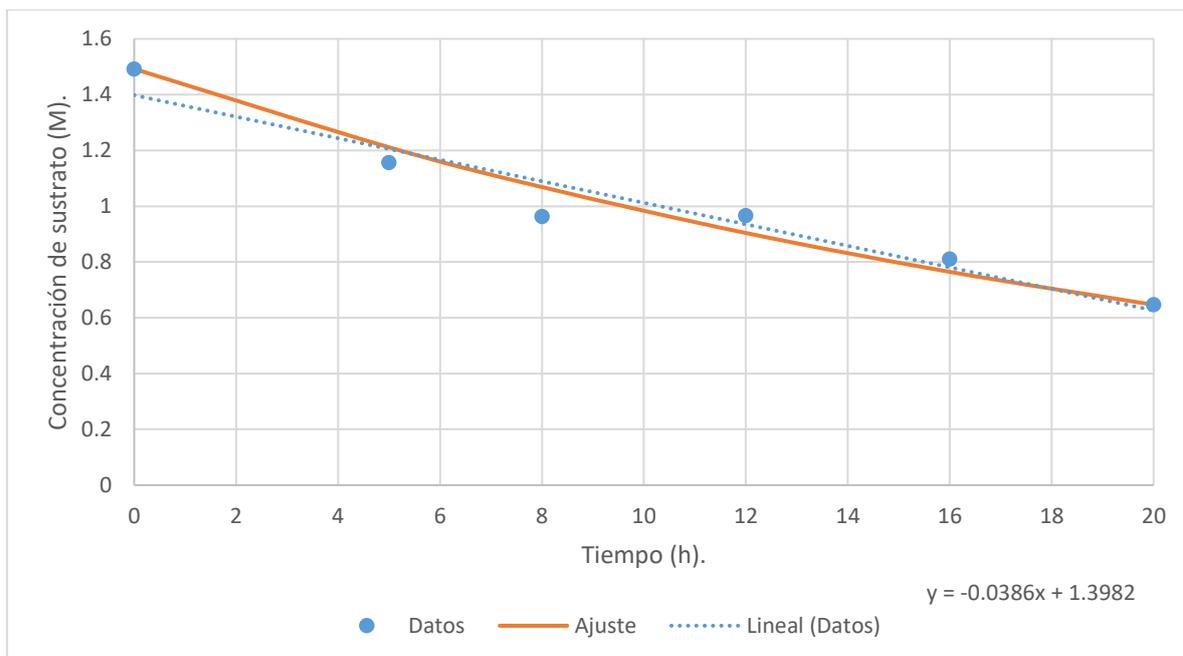
Tabla 18. Conversiones y ajuste de C18 con CalB en hexano

C ₁₈ catalizado con CalB		
t (h)	C ₁₈	Ajuste
0	1.492382	1.4924
5	1.156198	1.2114
8	0.963215	1.0687
12	0.966107	0.90409
16	0.810845	0.7647
20	0.646764	0.64672

Los parámetros cinéticos son:

K_m: 154.26 M h⁻¹

V_{máx}: 6.5 M



Gráfica 9. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C18 con CalB en n-hexano.

5.3.2.1.D Ajuste aceite de cocina con RM en n-hexano

a) Compuestos C₁₆

Los siguientes datos, muestran los resultados de reacción catalizada con R.M. en el mismo medio que las reacciones anteriores.

Para las cadenas de 16 carbonos tenemos:

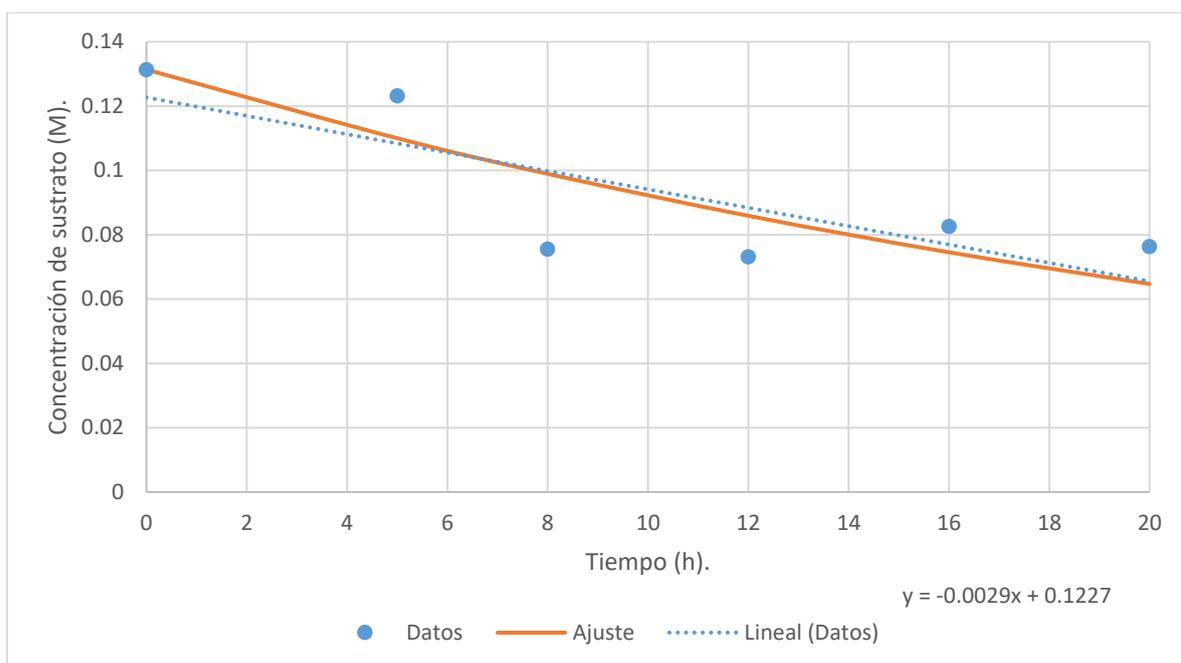
Tabla 19. Conversiones y ajuste de C₁₆ con RM en hexano

C ₁₆ catalizado con R.M.		
t (h)	C ₁₆	Ajuste
0	0.131252	0.131352
5	0.12313	0.11003
8	0.075487	0.09896
12	0.073115	0.085904
16	0.082514	0.074559
20	0.076318	0.064703

Y los parámetros cinéticos son:

K_m: 10.5 M h⁻¹

V_{máx}: 0.374



Gráfica 10. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C16 con RM en n-hexano.

b) Compuestos C₁₆

Para las cadenas de 18 carbonos en *n*-hexano se muestran los siguientes resultados:

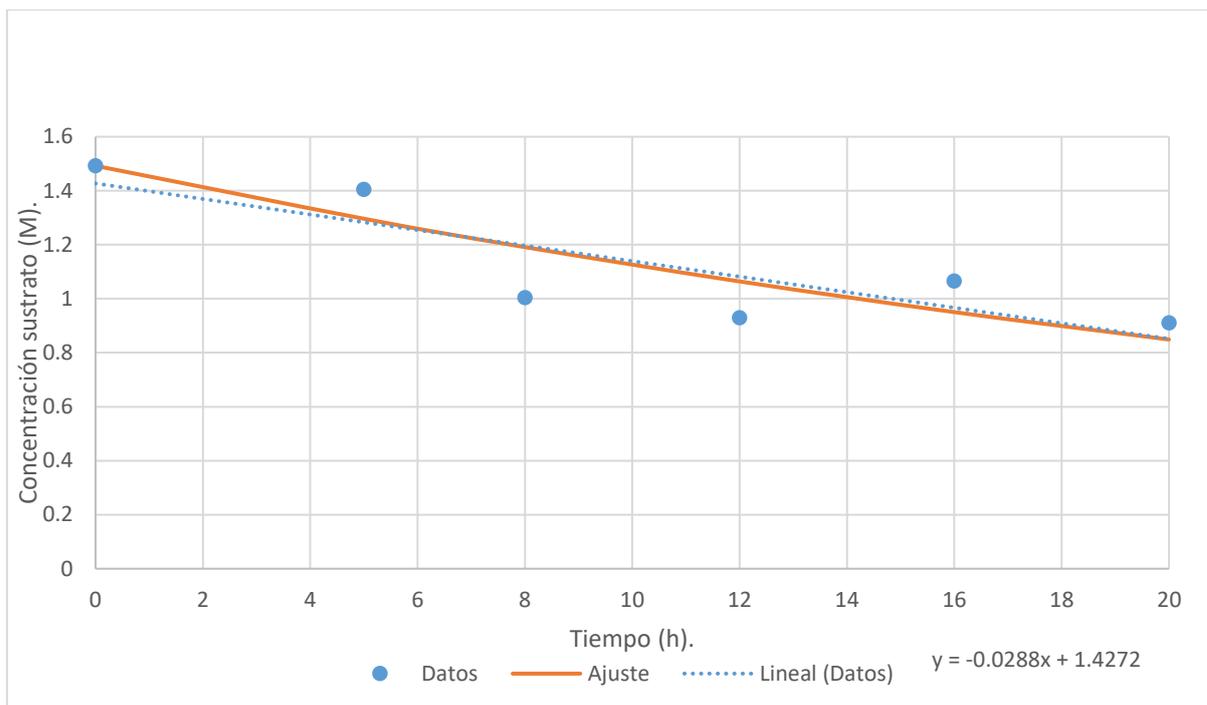
Tabla 20. Conversiones y ajuste de C18 con RM en hexano

C₁₈ catalizado con R.M.		
t (h)	C₁₈	Ajuste
0	1.492382	1.4924
5	1.405006	1.2963
8	1.004346	1.1912
12	0.929525	1.0641
16	1.06586	0.95046
20	0.909946	0.84891

Cuyos parámetros cinéticos son:

K_m: 169.75 M h⁻¹

V_{máx}: 4.8205 M



Gráfica 11. Ajuste lineal en Excel para conversiones de C18 con RM en n-hexano.

5.3.2.1.1 Tabla de conversiones de aceite de cocina.

En una tabla comparativa se muestran los parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas con CalB y R.M. siendo los principales sustratos las cadenas de 16 y 18 carbonos en los dos diferentes medios antes mencionados.

Tabla 19. Comparativa de parámetros y conversiones en reacciones de aceite de cocina.

Aceite de cocina								
Disolvente	t-butanol				nHexano			
Enzima	Cal B		R.M.		Cal B		R.M.	
Sustrato	C ₁₆	C ₁₈						
Km	10.153	174.580	7.011	173.420	12.693	154.260	10.499	169.750
V_{máx}	0.594	7.367	0.351	5.925	0.739	6.492	0.375	4.821
Conv. Total	0.58	0.51	0.70	0.53	0.68	0.57	0.42	0.39

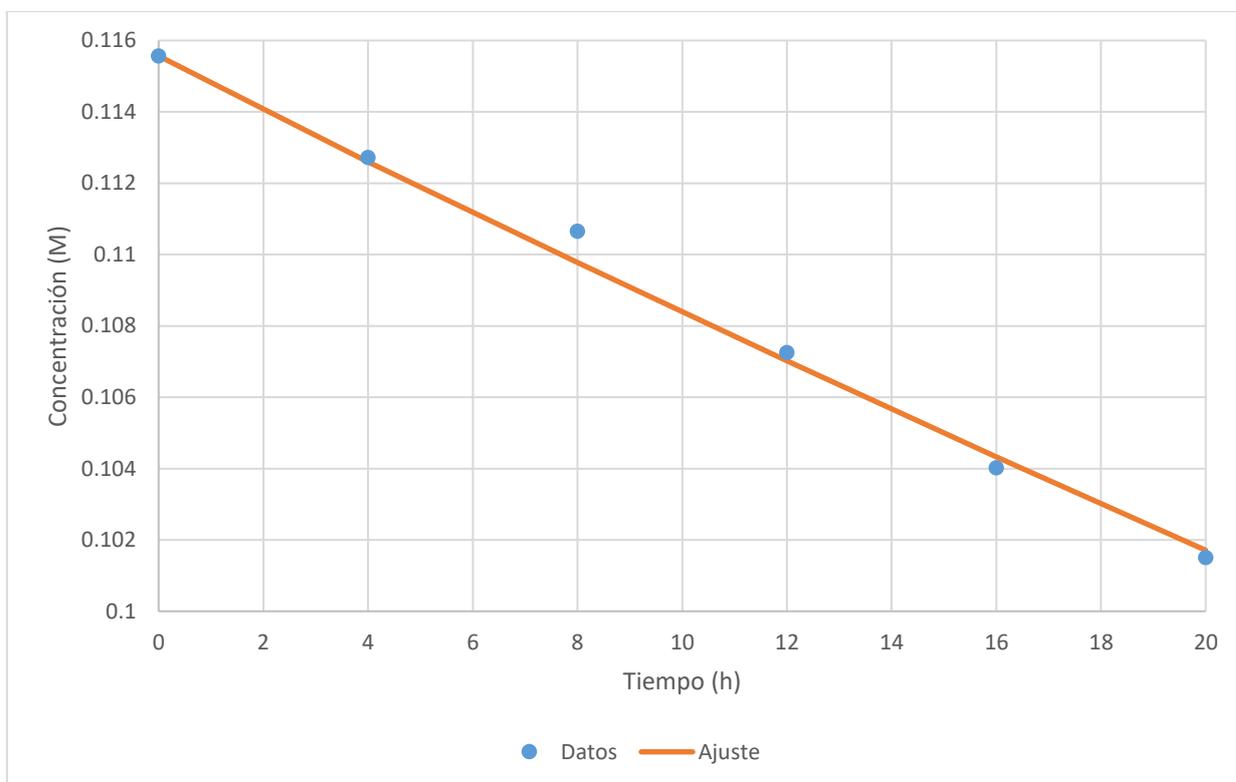
Como se puede apreciar, los valores cinéticos Km y Vmax son mayores para las cadenas de 18 carbonos que para las de 16 carbonos, comportamiento que se discutirá en el siguiente capítulo.

5.3.2.2. Resultados de reacción con aceite de ajonjolí.

5.3.2.2.A. Ajuste de aceite de ajonjolí con CalB en *t*-butanol.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al ajuste de la reacción con aceite de ajonjolí como sustrato. Esta reacción se llevó a cabo únicamente en *t*-butanol como medio de reacción. Los resultados que se reportan son también para las cadenas de 16 y 18 carbonos por su predominante abundancia en el aceite.

Los resultados que a continuación se muestran son para las cadenas de 16 carbonos provenientes del aceite de ajonjolí y catalizadas con CalB.



Gráfica 12. Ajuste lineal en Excel para conversiones de aceite de ajonjolí de C16 con CalB en *t*-butanol.

Tabla 19. Conversiones y ajuste de C16 con calB en *t*-butanol

C ₁₆ catalizado con CalB		
t (h)	C ₁₆	Ajuste
0	0.115568	0.115568
4	0.112719	0.1126
8	0.110651	0.10978
12	0.107253	0.10702
16	0.104026	0.10433

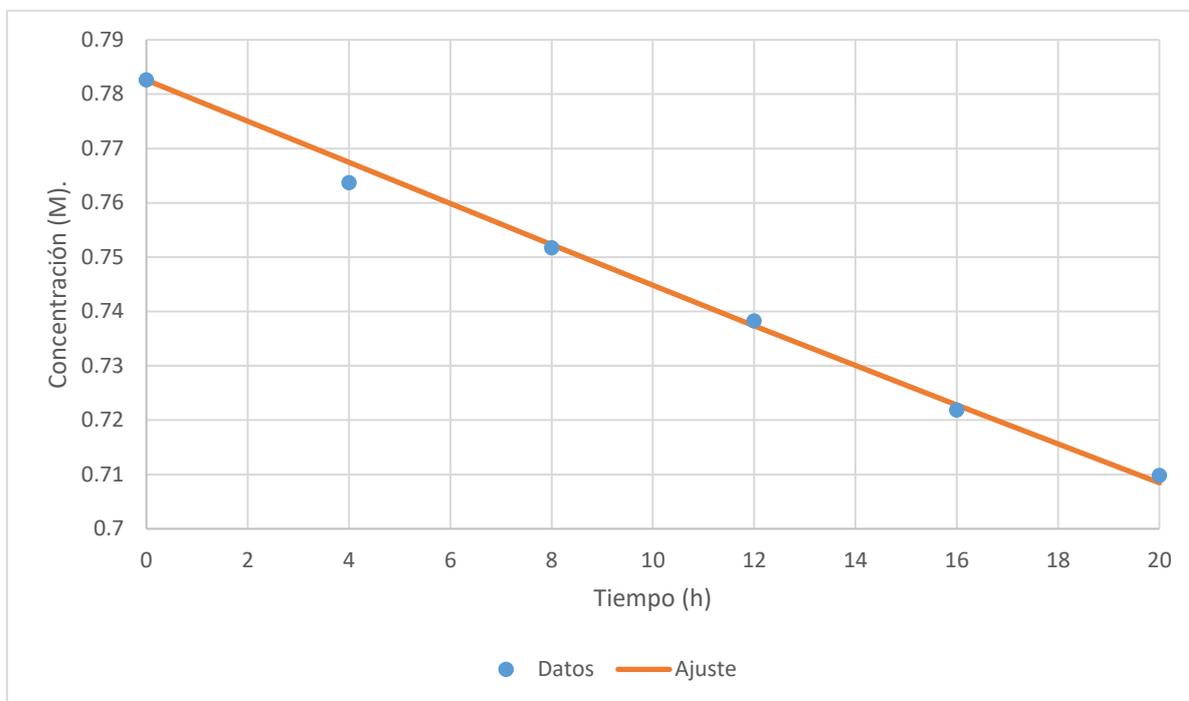
20	0.101512	0.10171
----	----------	---------

Parámetros cinéticos:

K_m: 6.635 h⁻¹

Para las cadenas de 18 carbonos catalizadas con CalB se obtuvieron los siguientes resultados.

V_{máx}: 0.043 M



Gráfica 13. Ajuste lineal en Excel para conversiones de aceite de ajonjolí de C18 con CalB en t-butanol.

Tabla 21. Conversiones y ajuste de C18 con CalB en t-butanol

C ₁₈ catalizado con CalB		
t (h)	C ₁₈	Ajuste
0	0.782591	0.782591
4	0.763711	0.76746
8	0.751718	0.75227
12	0.738245	0.73737
16	0.721858	0.72277
20	0.709804	0.70846

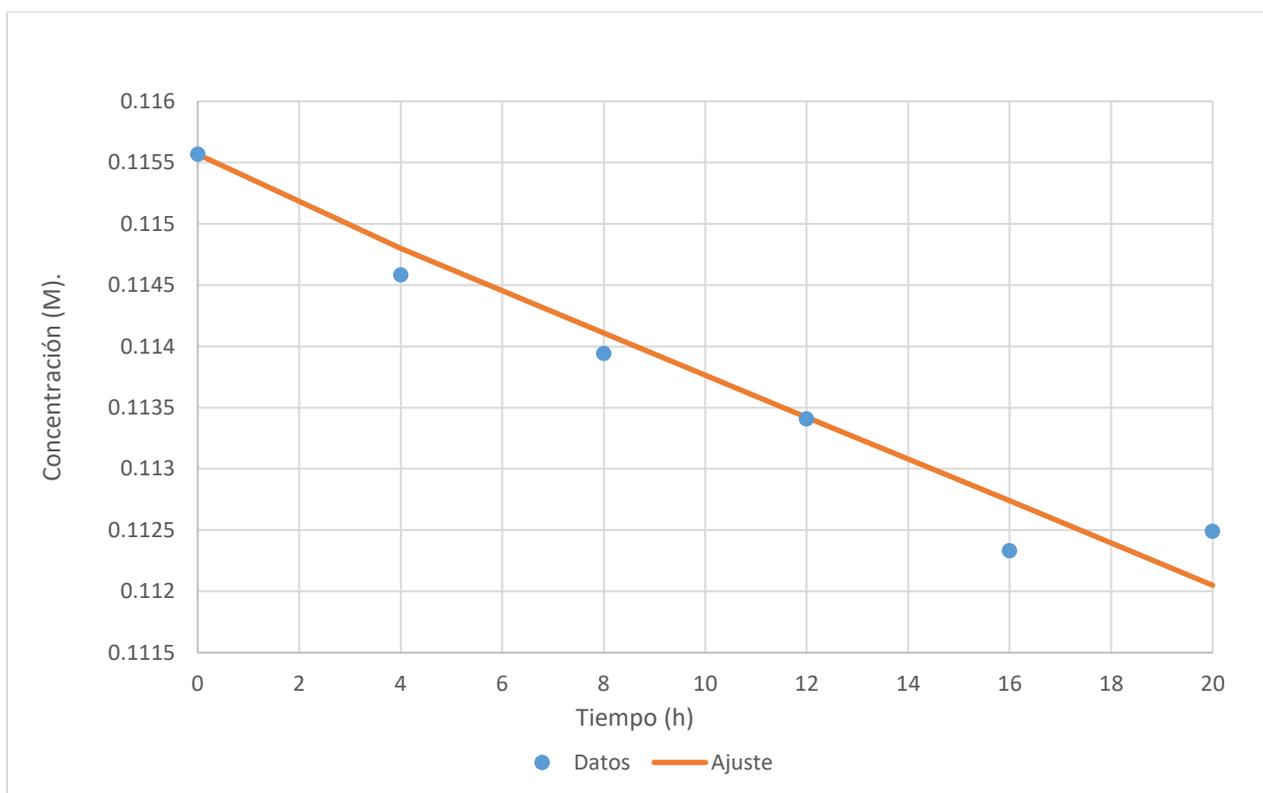
Parámetros cinéticos:

K_m: 93.634 h⁻¹

V_{máx}: 0.487 M

5.3.2.2. B Ajuste de aceite de ajonjolí con R.M. en t-butanol.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las cadenas de 16 carbonos obtenidas del aceite de ajonjolí y catalizadas con R.M.



Gráfica 14. Ajuste lineal en Excel para conversiones de aceite de ajonjolí de C16 con RM en t-butanol.

Tabla 22. Conversiones y ajuste de C16 con RM en t-butanol

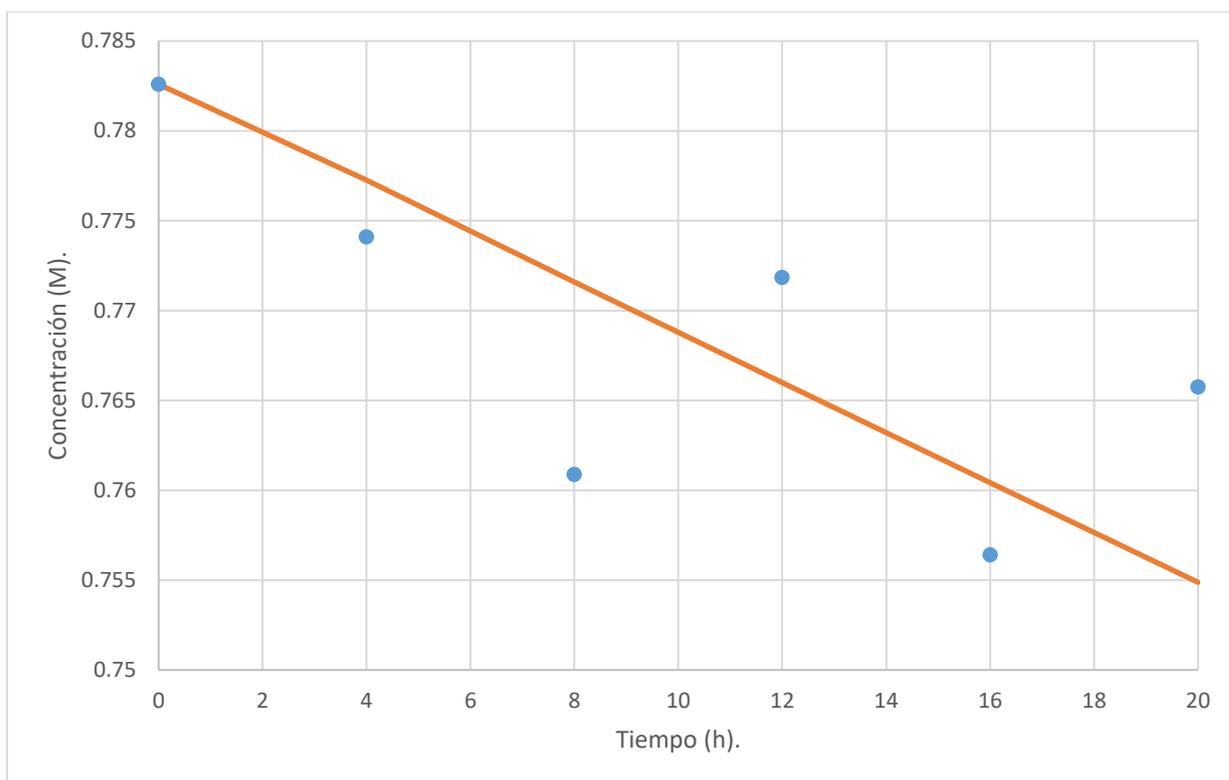
C ₁₆ c atalizado con R.M.		
t (h)	C ₁₆	Ajuste
0	0.115568	0.115568
4	0.114583	0.1148
8	0.113943	0.11411
12	0.113408	0.11342
16	0.112332	0.11274
20	0.11249	0.11205

Parámetros cinéticos:

Km: 1.005 h⁻¹

Vmáx: 0.002

Para las cadenas de 18 carbonos, también catalizadas con R.M., se muestran los siguientes resultados:



Gráfica 15. Ajuste lineal en Excel para conversiones de aceite de ajonjolí de C18 con RM en t-butanol.

Tabla 23. Conversiones y ajuste de C18 con RM en t-butanol

C₁₈ catalizado con R.M.		
t (h)	C₁₈	Ajuste
0	0.782591	0.782591
4	0.774092	0.77726
8	0.760885	0.7716
12	0.771838	0.76599
16	0.756399	0.76042
20	0.765741	0.75488

Parámetros cinéticos:

K_m: 23.753 h⁻¹

V_{máx}: 0.045 M

5.3.2.2.1. Tabla de los resultados de los ajustes para aceite de ajonjolí.

En una tabla comparativa se muestran también los parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas con CalB y R.M. con aceite de ajonjolí, siendo los principales sustratos las cadenas de 16 y 18 carbonos en t-butanol como medio de reacción. Se reporta también la conversión total.

Tabla 24. Comparativa de parámetros y conversiones en reacciones de aceite de ajonjolí.

Aceite de ajonjolí				
Enzima	Cal B		R.M.	
Sustrato	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₆	C ₁₈
Km	6.635	96.634	1.0056	23.753
V _{máx}	0.04286	0.4867	0.001696	0.04476
Conversión Total	0.1216	0.0930	0.0266	0.0215

Los valores cinéticos Km y V_{máx} son mayores para las cadenas de 18 carbonos, comparadas con las de 16 carbonos, en el siguiente capítulo se explicará dicho comportamiento.

6. Discusión de resultados.

En la mayoría de los casos, el valor de K_m para R.M. fue menor que el de CalB, esto quiere decir que esta última presenta una menor afinidad tanto para las cadenas de 16 carbonos como para las de 18. Además, este valor se ve afectado dependiendo del medio de reacción. Para CalB la **afinidad enzima-sustrato (K_m)** con las cadenas de 16 carbonos, se ve favorecida en *t*-butanol como medio de reacción. Por otra parte, para las cadenas de 18 carbonos la afinidad enzima-sustrato se ve favorecida en *n*-hexano como medio.

Notamos también que el valor de K_m es siempre menor en las cadenas de 16 carbonos que en las de 18, esto quiere decir, que tanto CalB como R.M. presentan una mayor afinidad para las cadenas de 16 comparadas contra las de 18 carbonos.

Al momento de la caracterización de los aceites, después de una comprobación cualitativa del avance de reacción con c.c.f. se observa que los FAME's están distribuidos en ambas fases, por lo que, para su mejor análisis se recomienda hacer una extracción con algún disolvente orgánico como el acetato de etilo.

Existen propuestas sobre el mecanismo de reacción de alcoholisis de triglicéridos (Camacho, et al. [2006] (Mechanistic model for lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols)), donde considera una reacción específica en las posiciones 1,3 del triglicérido, así como una reacción de isomerización migratoria de monoglicéridos (no catalizada por enzima, posiblemente catalizada por el soporte, celita no cataliza esta reacción) con cadena en posición 2 a cualquiera de los dos extremos. En este estudio no fue posible dar seguimiento a esta propuesta debido a la técnica analítica utilizada, porque el equipo disponible no es adecuado para detectar tri y diglicéridos. Sería necesario utilizar la técnica de HPLC. Esto permitiría, a su vez, determinar si existe reacción de isomerización migratoria de monoglicéridos en posición 2.

6.1. Reacción con aceite de cocina

Según los resultados mostrados en las tablas 11 y 19 en la sección **5.3.1. Conversiones obtenidas** la enzima que muestra un menor valor de K_m para ambos sustratos es R.M., para C_{16} en *t*-butanol, se aprecia una conversión total de 0.70 para R.M. contra 0.58 de CalB, mientras que para C_{18} también en *t*-butanol se observa una conversión total de 0.53 con R.M. contra 0.51 obtenida con CalB.

Con base en los datos obtenidos de k_m en todas las existen puntos importantes para considerar en caso de futuras investigaciones:

- Para C_{16} , CalB tiene mayor afinidad en *t*-butanol
- Para C_{18} , CalB tiene mayor afinidad en *n*-hexano
- Para C_{16} , RM tiene mayor afinidad en *t*-butanol
- Para C_{18} , RM tiene mayor afinidad en *n*-hexano

- Entre C16 y C18, Cal B tiene mayor afinidad por C16
- Entre C16 y C18, RM tiene mayor afinidad por C16

6.2. Reacción con aceite de ajonjolí.

Para este aceite sólo se estudió la reacción con t-butanol como medio. Los resultados muestran nuevamente valores mayores de Km para R.M. que para CalB, lo que indica que ésta última tiene mayor afinidad por los sustratos utilizados.

Los puntos a resaltar son:

- Entre C16 y C18, Cal B y RM tienen mayor afinidad por C16.
- R.M. tienen una mayor afinidad (menor km) para cadenas de 16 y 18 carbonos comparada con Cal B.

Al tener condiciones similares entre las diferentes reacciones (lipasa CalB-Lipasa RM, medio de reacción apolar t-butanol-hexano, cadenas de 16-cadenas de 18-carbonos), podría esperarse obtener valores, sino idénticos, muy similares. Sin embargo, debido a la gran especificidad de las lipasas se encontraron estas diferencias en los puntos antes mencionados, con lo que se podría decir que: Se puede comprender a profundidad las reacciones de transesterificación para la producción de biocombustibles catalizados con lipasas con la finalidad de optimizar los procesos de reacción.

7. Conclusiones

Efecto del disolvente.

Según los datos mostrados en 5.3.1. *Conversiones obtenidas* se muestra una mayor conversión de sustratos para las reacciones en t-butanol como medio de reacción, debido a su capacidad de disolver metanol y aceite, evitando así problemas de miscibilidad de sustratos. Además, al ser un alcohol terciario no inhibe la actividad lipasa, tal como lo hacen los alcoholes primarios (como el metanol); esto facilita no sólo la miscibilidad de los sustratos sino que también favorece la actividad lipasa. Por lo que el solvente más favorable para la reacción, para ambas enzimas es t-butanol.

Sustratos.

Las lipasas, catalizan favorablemente cadenas de alcoholes primarios cortas y de la misma manera ácidos grasos de cadenas cortas. Cadenas más largas o

con ramificaciones tendrían un impedimento esteérico para una catálisis óptima, por lo que las cadenas más cortas resultan ideales para las serín hidrolasas. Por otra parte, a pesar de que los alcoholes primarios inhiben la actividad lipasa, su bajo peso molecular y mayor polaridad permiten acceder más fácilmente al sitio catalítico de la enzima y es más miscible en *t*-butanol, hecho que favorece la catálisis y ayuda a disminuir los problemas de inhibición enzimática. Por esto, el metanol es ideal como sustrato para transesterificación enzimática, tanto para CalB como para R.M.

La adición en tres pasos del metanol a la mezcla de reacción, tal como se menciona en el método experimental, permite solucionar el problema de la no miscibilidad del metanol en aceite y su efecto inhibidor en la actividad lipasa.

Enzimas

El comportamiento mostrado en las tablas de conversiones, permite confirmar que, durante la experimentación y análisis de resultados, R.M. mostró mayor afinidad por los sustratos utilizados en comparación con CalB, y que *t*-butanol se mostró como un medio más favorable para la reacción de transesterificación enzimática comparada con *n*-hexano, ya que, al ser un alcohol y tener una polaridad mayor que la del *n*-hexano, permite solucionar el problema de miscibilidad de los sustratos.

Entonces, las cadenas cortas de ácidos grasos, los alcoholes primarios como el metanol son los sustratos más favorecidos para una transesterificación utilizando lipasas como catalizadores, de las cuales, entre las aquí utilizadas, R.M. demostró una mayor afinidad enzima-sustrato (5.3.1. *Conversiones obtenidas*) siendo *t*-butanol el mejor medio de reacción.

Para monitorear el ataque de las enzimas, sería apropiado realizar el análisis cromatográfico por HPLC, ya que al ser una cromatografía para moléculas más grandes que la cromatografía de gases, sería posible conocer en toda la reacción los sustratos presentes.

La selectividad que presentaron las enzimas hacia las ramas en triglicéridos no fue distinta, esto no descarta la posibilidad de que el ataque de las enzimas en los triglicéridos sea el distinto.

Cabe resaltar que de toda la investigación bibliográfica realizada acerca de la transesterificación para producción de biodiesel en todo el mundo, nadie ha reportado resultados de análisis cinético y de conversiones por componente.

8. Apéndices

Problemas de dilución

Se hizo una corrección ya que las reacciones enzimáticas y con metóxido de sodio tienen concentraciones de sustrato distintas y al realizar el análisis cromatográfico el resultado no representa una conversión real. El ajuste es:

Porcentaje másico en reacción con metóxido:

$$\frac{10g}{16g} = 0.625$$

El cual se diluyó un tercio como técnica analítica, lo que da:

$$\frac{0.625}{3} = 0.208$$

Porcentaje másico de reacción enzimática:

$$\frac{90g}{159g} = 0.566$$

El cual se diluyó un tercio como técnica analítica:

$$\frac{0.566}{3} = 0.188$$

0.208 y 0.188 representan las fracciones de porcentaje másico de reacción con metóxido y con enzima, respectivamente, que fueron inyectadas al cromatógrafo. Hubo una fracción más grande de sustrato inicial en las muestras de reacción con metóxido de sodio que la fracción de sustrato inicial en la reacción con enzimas. De estos resultados se hace una relación para obtener un factor que permita una equivalencia entre los conteos resultantes en los análisis cromatográficos de las dos distintas reacciones realizadas.

$$\frac{0.188}{0.208} = 0.905$$

Esto significa que, de la conversión resultante del análisis enzimático calculado sin corrección, sería siempre subestimado.

Se multiplicó este factor por el número de conteos de área de los resultados sólo de la reacción con metóxido de sodio para así tener los resultados reales acerca de los conteos para la conversión máxima posible de los aceites.

7. Referencias.

- Abd-elhakeem, M. A., Elsayed, A. M., & Alkhulaqi, T. A. (2013). New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(September), 442–444.
- Chen, Jech-Wei; Wu, W.-T. (2003). Regeneration of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Transesterification. *Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 466–469.
- Dayananda, C., Kumudha, A., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2010). Isolation , characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus* sp . *Scientific Research and Essays*, 5(17), 2497–2505.
- Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. *Lavoisier.Fr* (Vol. 13409). [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(99\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(99)00114-4)
- Franco Vera, L. (2007). Enzimas: Qué Son Y Para Que Sirven. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101(2), 399–417.
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405–416. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- HaCohen, Zvi; Metzger P, L. (1999). Chemicals of *Botryococcus Braunii*. In T. & Francis (Ed.), *Chemicals from Microalgae* (p. 205–260.). London.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Marcos, V. D. S. (2011). Estructura Y, 1–162.
- Metzger, M. P. (2005). *Botryococcus braunii* : a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*., 66(5), 486–496. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z>
- Ramírez Ramírez, J. (2014). Enzimas: ¿Qué Son Y Cómo Funcionan? *Joaquín Ramírez Ramírez*, 15(12), 1607–6079. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Raza, S., Fransson, L., & Hult, K. (2001). Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: a molecular dynamics study. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 10(2), 329–38. <https://doi.org/10.1110/ps.33901>
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., & Locatelli, S. (2007). Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, 98(3), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.021>

Samantray, S., Guruprasad, S., & Ramachandra, T. V. (2010). Diversity of lipids in algae. *Wetlands, Biodiversity and Climate Change*, (December), 1–9.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., & Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 17(3–5), 133–142. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00020-6)

Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2008). Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.002>

Situación Actual de Biodiesel en México (Secretaría de Energía / Subsecretaría de Planeación y Transición Energética / Boletín / Volumen 2 No. 14 – Julio 2016)¹¹.

¹¹Página en Internet de la SENER:

http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/120132/Bolet_n_ENERG_AS_LIMPIAS_catorce.pdf