

# OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL

por transesterificación de aceite de palmiste utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus*

## OBTAINING BIODIESEL

for Kernel Oil Transterification Using Lipases of *Thermomyces lanuginosus*

### AUTORES



**Aidé Perea**  
**María Amado**

**Erick Rodríguez**

Centro de Investigación en Ciencia  
y Tecnología de Alimentos  
Escuela de Química  
Universidad Industrial de Santander  
Bucaramanga (Colombia)  
Sede de Investigaciones  
UIS-Guatiguará, Km 2 Vía al  
Refugio - Piedecuesta.  
aperea@uis.edu.co

### Palabras CLAVE

Biodiésel, ésteres alquílicos, transesterificación de aceites vegetales, lipasas, biocatalizadores, obtención de ésteres etílicos, *Thermomyces lanuginosus*.

Biodiesel, alkyl esters, vegetable oil transterification, lipases, catalyst, obtaining ethyl esters, *Thermomyces lanuginosus*.

Editado por Fedepalma.

### RESUMEN

Para la obtención de ésteres alquílicos por transesterificación de aceites vegetales se han empleado catalizadores químicos que requieren de 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 también pueden ser utilizadas como biocatalizadores, trabajan en condiciones suaves y medios libres de solvente, 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 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  $2^3 +$  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. 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, 100 rpm y 40 ° C) permiten alcanzar conversiones de  $96,7 \pm 1,6\%$  con un índice de acidez de  $1,3 \pm 0,1$ . La formación de acilgliceroles parciales es mínima (1,47%) y la enzima presenta buena estabilidad operativa.



## SUMMARY

Obtaining alkyl esters through vegetable oil transesterification requires the use of chemical catalysts that require strong operating conditions, have a high corrosion power and present difficulties in the recovery of glycerol and removal of the catalyst. Moreover, lipases can also be used as biocatalysts, they work in soft conditions and in solvent – free media, they are biodegradable and their reutilization is possible if immobilized. This work aimed at obtaining ethyl esters from palm oil, using as catalyst immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. The first phase dealt with the determination of the average molecular weight of a triacylglycerol in oil and with the evaluation of internal and external diffusion effects in the system. Then the best reaction conditions were selected applying an experimental design of three variables times three levels, based on a rotating central compound design of  $2^3 + \text{star}$ , analyzed by a response surface methodology, with the help of a Stratgraphics centurion XV statistical software. At last, an operating stability evaluation was made of the enzyme. No internal or external diffusion restrictions are present in the system and the most influencing variable on the conversion percentage is the amount of enzyme, while agitation is the most important one over the acidity index. The selected reaction conditions (Substrate ratio 4:1 alcohol – oil, 9% of the enzyme, 100 rpm and 40°C) enable the achievement of conversions of  $96,7 \pm 1,6\%$  with an acidity index of  $1,3 \pm 0,1$ . The formation of partial acylglycerols is minimum (1,47%) and the enzyme presents a good operating stability.



## INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación mundial por los asuntos del medio ambiente y el desarrollo de biocombustibles ha incrementado el interés en los aceites vegetales, para sustituir grasas animales y materias primas de la petroquímica, por ser materias primas naturales, biodegradables, de baja toxicidad y renovables (Barnwal *et al.*, 2005). Para la obtención de biodiésel por transesterificación de aceites vegetales, se han empleado catalizadores químicos que si bien conllevan a altos rendimientos, requieren de condiciones fuertes de operación, poseen un alto poder de corrosión y presentan dificultades en la recuperación del glicerol y en la remoción del catalizador (Zheng *et al.*, 2006).

Los catalizadores enzimáticos como las lipasas, también pueden ser utilizados, trabajan en condiciones suaves y medios libres de solvente, son biodegradables y su reutilización es posible si son inmovilizadas (Castellanos *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2005]. Anteriormente, su uso a escala industrial era limitado por su costo, sin embargo, recientemente, la Novo Nordisk lanzó al mercado la lipasa 1,3 estereoespecífica de *Thermomyces lanuginosus* en forma inmovilizada, a un precio más competitivo. En este trabajo, se evaluó la obtención de biodiésel a partir del aceite de palmiste, empleando como catalizador esta enzima.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se emplearon como sustratos aceite de palmiste refinado grado comestible y etanol del 99,9% de pureza; como catalizador se usó la lipasa estereoespecífica (sn-1) de *Thermomyces lanuginosus* Lipozyme TL IM inmovilizada por adsorción en un soporte de sílice, la cual fue suministrada por Novozyme SA.

### Métodos de análisis

La composición de ácidos grasos se estableció empleando cromatografía de gases de alta resolución según el procedimiento descrito por Castellanos *et al.* (2004). Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de Fames Supelco Cat. N° 18918-1 AMP, analizado bajo las mismas condiciones. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo. Los productos de la reacción fueron analizados empleando cromatografía de gases de alta temperatura, utilizando un método para la determinación simultánea de ésteres grasos y acilglicerolos descrito previamente por Castellanos *et al.* (2004). 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 aplicó el método



del estándar externo, comparando el área de los TAG's en el producto con los de un blanco de PKO para hallar el porcentaje de conversión (%X), definido como la cantidad de sustrato transformada sobre la cantidad de sustrato inicial por cien. El análisis del índice de acidez de las muestras se realizó de acuerdo con el método AOAC 940.20/1990.

### Reacción de transesterificación

La reacción de transesterificación se llevó a cabo en un reactor batch con capacidad de 1 litro. En todas las reacciones se emplearon como sustratos aceite de palmiste y etanol en una relación molar 1:4, basados en los estudios de Wu *et al.* (2003) y de Castellanos *et al.* (2004). La enzima fue sometida a un pretratamiento y posteriormente se mezcló con la cantidad de aceite requerida y se incubó en un baño termostataado 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 inactivó la enzima, después se realizó la filtración y el producto de reacción fue almacenado en congelación en atmósfera de nitrógeno para su posterior análisis. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante tres horas.

Para evaluar de las condiciones de reacción, se analizaron las variables 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), Castellanos *et al.* (2004). Las variables de respuesta fueron el porcentaje de conversión ( $Y_1$ ) y el índice de acidez ( $Y_2$ ). La influencia de cada una de las variables y su interacción con la conversión y el índice de acidez, se estudió utilizando un diseño experimental de tres variables por tres niveles, basado en un diseño central compuesto rotatorio de  $2^3 +$  estrella (CCRD), utilizando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurión XV para Windows.

### Evaluación de las restricciones de difusión externa e interna

Para evaluar la difusión interna 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. Para

evaluar la difusión externa, la enzima fue tamizada usando tamices de la serie Tayler número 20, 30, 40 y 50 con aberturas de malla de 850, 600, 425, 370  $\mu\text{m}$ , respectivamente, obteniéndose cuatro rangos de tamaños de partícula diferentes. Las fracciones obtenidas se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de esterificación en las condiciones escogidas en el diseño experimental.

### Estabilidad operativa de la enzima

La enzima se utilizó en forma sucesiva en varias reacciones de alcoholisis realizadas bajo los mismos parámetros operacionales. 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.

## RESULTADOS

### Evaluación de las restricciones de difusión externa e interna

Las reacciones efectuadas utilizando diferentes valores de agitación (Figura 1a) y diferentes rangos de tamaño de partícula de la enzima (Figura 1b) no presentaron diferencias significativas en la producción de ésteres etílicos concluyéndose que el sistema se encuentra libre de restricciones difusionales externas e internas, por lo cual, la enzima puede ser utilizada tal y como la provee el fabricante y la reacción sólo se encontrará limitada por la capacidad catalítica de la misma.

### Evaluación de condiciones de reacción

Para determinar las condiciones óptimas de la reacción, los resultados del diseño experimental se analizaron mediante los diagramas de Pareto (figuras 2a y 2b), en los cuales se muestra cada efecto en orden decreciente de magnitud (la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, efecto estimado/error estándar). En estos diagramas las barras que se extienden mas allá de la línea vertical corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95%.

En el caso de la variable de respuesta porcentaje de conversión ( $Y_1$ ), la agitación y la cantidad de enzima

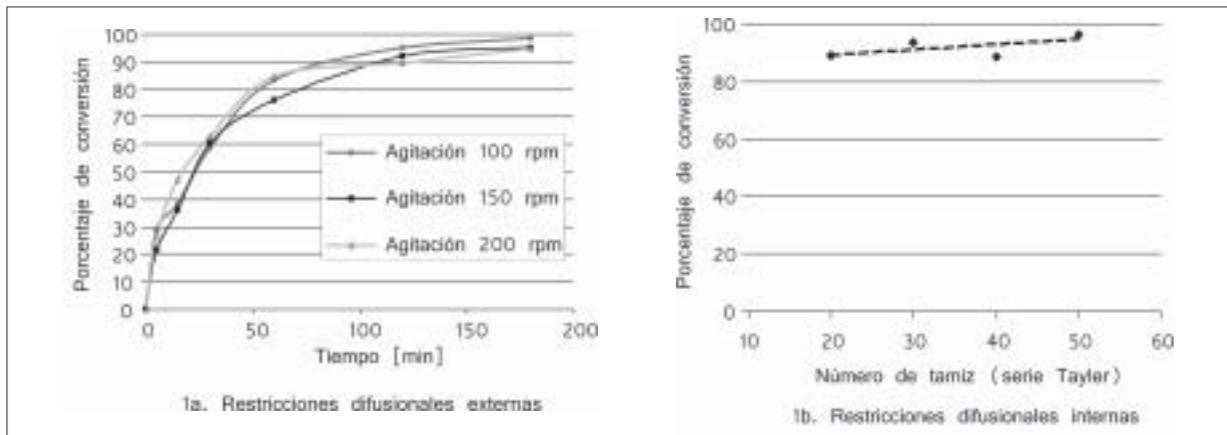


Figura 1. Evaluación de las restricciones difusionales.

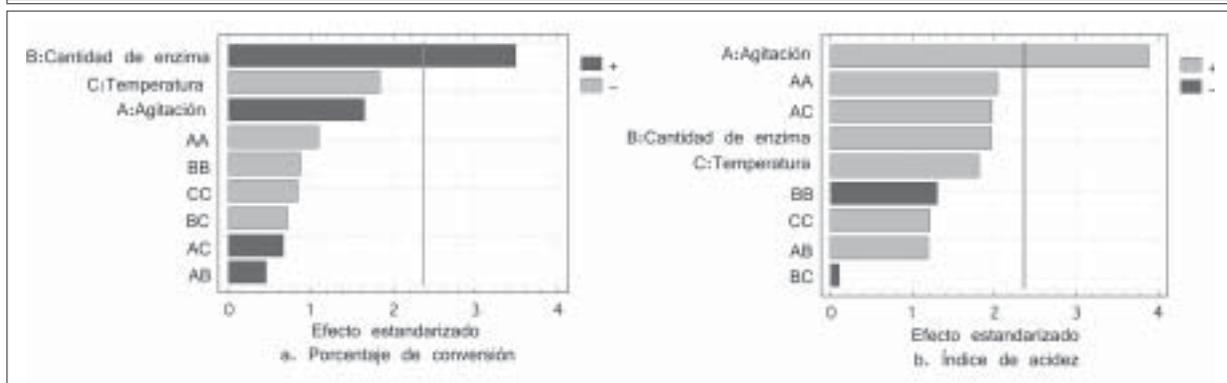


Figura 2. Diagramas de Pareto.

tienen un efecto positivo, es decir, que en la medida en que estos factores avanzan del nivel más bajo al más alto se incrementa la conversión, sin embargo, solo la cantidad de enzima posee un efecto significativo en un nivel de confianza del 95% (Figura 3). Se encuentra también que la temperatura posee un efecto negativo, por lo cual se recomienda trabajar a temperaturas bajas. Para la variable respuesta índice de acidez, el efecto de la cantidad de enzima y de la temperatura es menos pronunciado y solo la agitación posee un efecto significativo en un nivel de confianza del 95%. En los dos casos y para las dos variables de respuesta, el efecto de las interacciones entre variables no fue significativo.

Teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente, se desarrollaron modelos polinómicos para cada una de las variables de respuesta, conversión ( $Y_1$ ) e índice de acidez ( $Y_2$ ), tal como se muestra en las ecuaciones (1) y (2).

Con estos polinomios 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 respuesta  $Y_1$  y  $Y_2$ , a fin de establecer las condiciones de reacción, en las cuales se maximiza la conversión y se minimiza el índice de acidez. El análisis de la evolución de la conversión y del índice de acidez de

$$(Y_1) = 76,46 + (8,52)(A) + (18,03)(B) - (9,49)(C) - (6,18)(A^2) + (3,06)(A)(B) + (4,45)(A)(C) - (4,97)(B^2) - (4,83)(B)(C) - (4,79)(C^2) \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$(Y_2) = 1,27 + (0,53)(A) + (0,27)(B) - (0,25)(C) + (0,31)(A) + (0,21)(A)(B) + (0,35)(A)(C) - (0,20)(B) - (0,20)(B)(C) - (0,18)(C) \quad \text{Ecuación (2)}$$



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 suponer un costo importante en el producto. En el contexto internacional no se encuentran en la bibliografía reportes sobre la evaluación del índice de acidez en este tipo de reacciones.

Los rangos dentro de los cuales se realizó la optimización de la reacción fueron: porcentaje de conversión (20-100%) e índice de acidez (0.5-3). Los resultados se graficaron y permitieron obtener la superficie de respuesta que se presenta en la Figura 3. En ella se aprecia con claridad una zona muy favorable para la reacción, con condiciones operacionales suaves (temperatura y agitación) que conducen a altos porcentajes de conversión.

Las condiciones seleccionadas fueron cantidad de enzima 9%, 40°C de temperatura y una agitación de 100 rpm. En estas condiciones la reacción debería conducir a un porcentaje de conversión del 85,8% con un índice de acidez de 1,2, sin embargo, en la validación de las condiciones seleccionadas se alcanzaron rendimientos de  $96,7 \pm 1,6\%$  e índices de acidez de  $1,3 \pm 0,1$ . Este resultado 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, Xu y Liu (2005) en una reacción de alcoholólisis y por Yang *et al.* (2005), en una reacción de acidólisis.

### Estabilidad operativa de la enzima

En los primeros cuatro reusos (12 horas) se obtienen rendimientos que superan 90%, en el quinto la conversión se reduce a 82,2% y, finalmente, con el sexto el rendimiento es del 69,9%. Es decir, después de 6 reusos la disminución del rendimiento de la reacción es de 31,8%, situación que es considerada como normal por parte de los proveedores de la enzima y los que la han utilizado a escala industrial en otros procesos como la obtención de grasas especiales (Perea *et al.*, 2005). La disminución de la conversión puede ser consecuencia de la inactivación térmica de la enzima. Investigaciones desa-

rolladas por Soumanou *et al.* (2003) con esta misma enzima, señalan que la enzima pierde cerca del 50% de su actividad inicial a las 48 horas de reacción y posteriormente la conversión decrece levemente hasta llegar al octavo batch, en el cual se registra una pérdida considerable de actividad (70%).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para poder comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura y teniendo en cuenta que en todas las investigaciones se utilizan condiciones de reacción diferentes, se calculó en todos los casos, la *productividad específica*, parámetro que relaciona la cantidad de ésteres alquílicos producidos respecto al tiempo de reacción y la cantidad de catalizador. Así, los mayores valores de actividad específica (13,5 y 11,1) se logran en los trabajos de Nouredini, Gao y Philkana (2005) y de Salis (2003), seguida de 4.9 alcanzada por Foglia y Jones (2000) quienes utilizan una enzima lipasa de *Pseudomonas cepacia* y la lograda en este trabajo que fue de 3.6.

De otra parte, al comparar los trabajos realizados con la enzima Lipozyme TL IM, se observa 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 específica se alcanzan en este trabajo, seguidos por los ejecutados por Castellanos *et al.* (2004). Se encuentra además, que

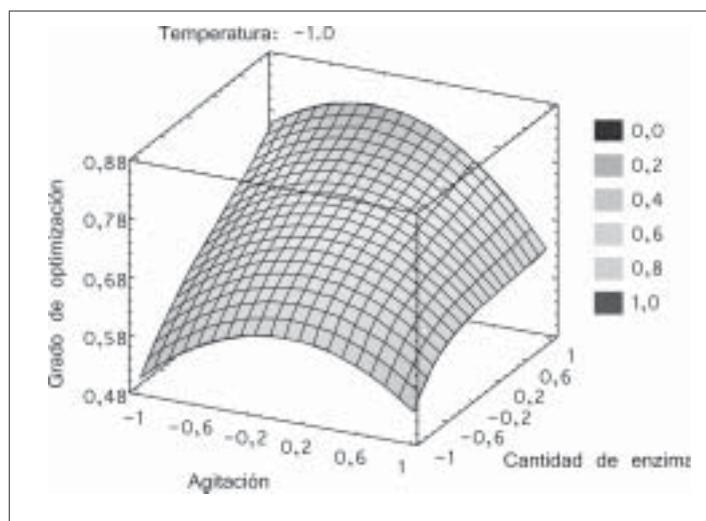


Figura 3. Superficie de respuesta del grado de optimización.

sólo en esta investigación y en el estudio exploratorio llevado a cabo por Castellanos *et al.* (2004) se hace uso del aceite de palmiste.

Finalmente, al analizar reportes de investigaciones en los cuales se usan catalizadores químicos se encuentra que ellos registran valores de conversión en un rango de 60-100%, pero utilizando condiciones de reacción bastante exigentes como: 50 bares de presión sobre atmósfera de nitrógeno, velocidades de agitación que van desde 100 a 600 rpm y altas temperaturas (Canoira *et al.*, 2006). En este trabajo, en cambio, se emplearon condiciones de reacción suaves: 40°C, 100 rpm y presión atmosférica y se alcanzaron conversiones similares (97,8%).

En cuanto a la productividad específica para la catálisis química salvo los valores obtenidos por Meher *et al.* (2005), para la transesterificación de aceite de Karanja (*Pongamia pinnata*) y metanol, los demás

valores son comparables a los obtenidos por los métodos enzimáticos.

Los anteriores resultados permiten predecir que la catálisis enzimática puede ser una alternativa importante para la producción de biodiésel, al tratarse de una tecnología limpia.

## 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.

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.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barnwal, BK.; Sharma, MP. 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 9: 363– 378.
- Canoira, L., *et al.* 2006. Biodiesel from Jojoba oil-wax: Transesterification with methanol and properties as a fuel. *Biomass and Bioenergy*. 30: 76–81.
- Castellanos, F; Gonzáles, R; Perea, A; Martínez, F. 2004. Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholisis del aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de *Mucor miehei*. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- Du, W; Xu, Y-Y; Liu, D. 2005. Lipase-catalysed transesterification of soybean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol Appl. Biochem.* 38: 103–106.
- Desai, PD; Dave, AM; Devi, S. 2005. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chemistry*. 95: 193–199.
- Foglia, T; Jones, K. 2000. The cotton gin and oil mill. 30:304–305.

- Meher, LC; Dharmagadda, VSS; Naik, SN. 2005. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Bioresource Technology*.
- Noureddini, H; Gao, X; Philkana R. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*. 96: 769–777.
- Salis, A; *et al.* 2003. Characterisation of accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 24: 75 – 82.
- Soumanou, M; Bornscheuer, UT. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(1): 97–103.
- Wu, Hong; *et al.* 2003. Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free system. *Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.* 48 (2): 533–534.
- Yang, T; Fruekilde, M; Xu, X. 2005. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chemistry*. 92: 101 – 107.
- Zheng, S; Kates, M; Dube, M; D.D. Mc Lean. 2006. Biomass and Bioenergy. 30(3):267–272

