

Artículo Original

**CONDICIONES PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA
DE ACEITE DE *JATROPHA CURCAS* CON UN SÓLIDO
FERMENTADO**

**CONDITIONS FOR THE ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF
JATROPHA CURCAS OIL WITH FERMENTED SOLID**

Diana D. Alcala-Galiano Morell ¹ <https://orcid.org/0000-0002-3081-8837>
Jesús A. Córdova López ² <https://orcid.org/0000-0002-9320-1033>
Evelyn Romero Borbón ² <https://orcid.org/0000-0003-2403-3133>
Jorge Alberto Rodríguez González ³ <https://orcid.org/0000-0001-9544-2917>
Ricardo Cosío Cuadros ³ <https://orcid.org/0000-0002-4481-5530>
Luis B. Ramos-Sánchez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-6403-1936>

¹ Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Aplicadas. Universidad Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey. Carretera Circunvalación Norte km 5½. Camagüey, Cuba.

² Departamento de Química. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Bulevar. Marcelino García Barragán #1421, Esquina Calzada Olímpica, Guadalajara, Jalisco, México.

³ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, CIATEJ A.C, Avenida Normalistas # 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: Agosto 5, 2020; Revisado: Septiembre 21, 2020; Aceptado: Noviembre 30, 2020

RESUMEN

Introducción:

La producción de biodiesel enzimático, tiene como principal inconveniente, altos precios del biocatalizador. La utilización de sólidos fermentados con actividad lipasa, mitigan los costos, pero al ser un conjunto de enzimas lipasas se desconoce las mejores condiciones de reacción.

Objetivo:

Determinar las mejores condiciones de tamaño de partícula, velocidad de agitación y relación molar etanol/aceite, para la reacción de producción de etil-ésteres, utilizando como sustratos: aceite de *Jatropha curcas* y etanol y, como biocatalizador, un sólido fermentado con actividad lipasa.



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

*Autor para la correspondencia. Luis B. Ramos, E-mail: luis.ramos@reduc.edu.cu



Materiales y Métodos:

Se contrastaron inicialmente dos biocatalizadores. Se estudiaron la velocidad de agitación, el tamaño de partícula y la relación molar alcohol/aceite, en la reacción de transesterificación. Los productos de la reacción se midieron, mediante cromatografía de capa fina de alta resolución.

Resultados y Discusión:

Se seleccionó como biocatalizador el sólido de *Rhizopus homothallicus*, con una actividad de 75,39 UI g_{MS}⁻¹ y una alta productividad de 4,19 UI g_{MS}⁻¹ h⁻¹. Se estableció que las resistencias a la transferencia de masa difusional se minimizan, al utilizar 200 rpm y un intervalo de tamaños de partícula de 0,149 a 0,297 mm. Se comprobó que para la relación molar 3:1 y 4:1, no hay diferencias significativas en el porcentaje de conversión, obteniéndose valores de 77,69 %. Sin embargo, para la relación 6:1, se afectó la conversión, debido a los procesos de inhibición de la enzima.

Conclusiones:

Se estima que el biocatalizador utilizado en las condiciones de reacción establecidas tiene un buen potencial para ser usado en la síntesis de biodiesel.

Palabras clave: aceite de *Jatropha curcas*; Biodiesel; Lipasa; sólido fermentado seco; transesterificación enzimática.

ABSTRACT

Introduction:

The main drawback of enzymatic biodiesel production is biocatalyst high prices. Fermented solids with lipase activity use mitigates costs, but being a set of lipase enzymes, the best reaction conditions are unknown.

Objective:

To determine the best conditions for particle size, stirring speed and ethanol / oil molar ratio, for the reaction to produce ethyl esters, using *Jatropha curcas* oil and ethanol as substrates and, as a biocatalyst, a fermented solid with activity lipase.

Materials and Methods:

Two biocatalysts were initially contrasted. The stirring speed, the particle size and the alcohol / oil molar ratio were studied in the transesterification reaction. The reaction products were measured by high performance thin layer chromatography.

Results and Discussion:

Rhizopus homothallicus fermented solid was selected as biocatalyst, with an activity of 75.39 IU g_{MS}⁻¹ and a high productivity of 4.19 IU g_{MS}⁻¹ h⁻¹. It was established that the diffusional mass transfer resistances were minimized, using 200 rpm and a particle sizes range of 0.149 to 0.297 mm. It was found that for 3:1 and 4:1 molar ratio, there are no significant differences in conversion degree, reaching 77.69 % of conversion. However, for 6:1 ratio, the conversion was affected, due to enzyme inhibition processes.

Conclusions:

It was considered that used biocatalyzer under the established reaction conditions has a good potential to be used in biodiesel synthesis.

Keywords: *Jatropha curcas* oil; Biodiesel; Lipase; dry fermented solid; enzymatic transesterification.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la necesidad de búsqueda de fuentes de energía renovables es un tema de gran importancia, debido a la disminución de las reservas de petróleo y la crisis medioambiental relacionada con la emisión de gases contaminantes, por el uso de combustibles fósiles, para lo cual los biocombustibles son una buena alternativa (Amini y col., 2017). El biodiesel es producido a partir de una gran variedad de aceites vegetales como el aceite de *Jatropha curcas*, de soya, de palma, de girasol, entre otros. En la actualidad el uso de aceites no comestibles como el aceite de *Jatropha curcas* es muy reportado (Rezania y col., 2019; Luque y col., 2016), dada sus buenas propiedades para estos fines. Este aceite es una alternativa muy atractiva. Comparado con el diesel del petróleo, presenta muchos beneficios como: su biodegradabilidad, su menor toxicidad y menor emisión de gases como los óxidos nitrosos y los óxidos de azufre. También, el biodiesel tiene valores aceptables de viscosidad, índice de cetano, poder calórico y punto de inflamación, lo que lo hace un candidato fuerte para reemplazar el diesel convencional sin cambio alguno en los motores (Zarejousheghani y col., 2016).

La transesterificación es la técnica más conveniente para la producción de biodiesel (Borgolov y col., 2016). La misma se lleva a cabo en un sistema de tres reacciones consecutivas que usa los alcoholes como sustratos y un catalizador de naturaleza ácida, básica o enzimática. La reacción es reversible y el exceso de alcohol se usa para favorecer la reacción en el sentido de la producción de biodiesel. Hay varios factores que pueden influenciar la velocidad de la reacción, tales como: la relación molar alcohol/aceite, la carga del catalizador, la temperatura y la agitación mecánica (Zarejousheghani y col., 2016). Los biocatalizadores enzimáticos del tipo lipasas han recibido una amplia atención, debido a que presentan varias ventajas frente a los catalizadores alcalinos y ácidos. Estos procesos operan a temperaturas más bajas, se eliminan los costos asociados a la recuperación del catalizador químico precipitado, la posibilidad del reuso de la enzima es muy deseable, la alta especificidad de la enzima por el sustrato, la habilidad de la enzima de esterificar no sólo ácido grasos libres, sino también, triglicéridos directamente en un solo paso. Muy importante también es la necesidad del uso de una menor relación alcohol/aceite, la eliminación de reacciones colaterales y la minimización de impurezas, lo que la hace el proceso más fácil separación y recuperación del producto. La degradabilidad del biodiesel y su compatibilidad medioambiental es otro aspecto que lo avalan como alternativa más deseable que el de petróleo (Alcala-Galiano y col., 2018).

La mayoría de los estudios reportados de la transesterificación de aceites vegetales catalizados con lipasas, se realizaron con el uso de enzimas comerciales, fundamentalmente, Novozyme 435 (Rezania y col., 2019), pero el principal inconveniente de este tipo de catálisis es el alto precio de la enzima, lo que hace que la producción de biodiesel no sea factible. Desde hace unos años, ha comenzado a reportarse el uso de un sólido fermentado con actividad lipasa (SFAL) para reacciones de esterificación y transesterificación, con resultados interesantes (Soares y col., 2013; Galeano y col., 2017). No se ha encontrado, sin embargo, reportado el uso de SFAL en reacciones de transesterificación del aceite de *J. curcas* con etanol. En general, los pocos estudios cinéticos reportados, estudian principalmente la influencia de la temperatura en el avance de la reacción (Zarejousheghani y col., 2016). Esto puede ser

adecuado, si se usa una enzima comercial pura como biocatalizador, pero para un SFAL, que contiene varias enzimas del tipo lipasas que participan en la reacción, ese enfoque podría no ser correcto. Como cada enzima contenida en un SFAL puede tener condiciones óptimas diferentes, a la que exprese su máxima actividad, entonces, resulta de gran interés estudiar el comportamiento del conjunto de enzimas contenidas en el SFAL, para diferentes condiciones de reacción. Es por ello que, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar las mejores condiciones de tamaño de partícula, velocidad de agitación y relación molar etanol/aceite, para la reacción de producción de etil-ésteres, utilizando como sustratos: aceite de *Jatropha curcas* y etanol y, como biocatalizador, un sólido fermentado con actividad lipasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El aceite de *Jatropha curcas* comercializado por *Jatrobioenergy and Oilseeds S.P.R.* de R.L, Morelos, México, con un 5 % de ácidos grasos libres (Cosío-Cuadros y col., 2017), lo cual se corresponde con los valores reportados por (Chua y col., 2020) para este tipo de aceite. El alcohol etílico anhidro, el hexano anhidro, el éter dietílico y el ácido acético al 99 % de pureza, usados fueron de la marca SIGMA, mientras que el isooctano (2,2,4-trimetil pentano) fueron de la marca FERMONT.

2.2 Selección del biocatalizador

Se estudiaron dos biocatalizadores sólidos, los cuales fueron preparados, empleando técnicas de fermentación en medio sólido para el cultivo de *Rhizopus homothallicus* y de *Aspergillus niger*, de acuerdo a lo reportado por Rodríguez y col., (2006) y Cujilema-Quitio y col., (2018).

Para la selección del biocatalizador, se midieron las dinámicas de la producción de lipasas en cultivos sólidos, empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL. Cada 12 h, fueron tomados dos matraces por cepa de hongo, para medir por triplicado, la actividad enzimática en hidrólisis (UI/g_{MS}). Se empleó un método colorimétrico reportado por Kwon y Rhee, (1986) con algunas modificaciones (Rodríguez y col., 2006) para medir la actividad enzimática. Este método se basa en la formación de sales de cobre con los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de aceite de oliva.

El biocatalizador escogido, se secó a 50 °C en una estufa marca Shanghai Boxun.

2.3 Establecimiento de las mejores condiciones de la reacción

2.3.1 Tamaño de partículas y velocidad de agitación

En el sistema de reacción de transesterificación, libre de solvente, los aceites vegetales y el etanol son poco miscibles y, el uso de un catalizador heterogéneo, conduce a la formación de tres fases, lo que dificulta la transferencia de masa entre ellos y consecuentemente, reduce la velocidad global de la reacción. La velocidad de agitación del medio de reacción, reduce el espesor de la capa límite y mejora la homogeneidad de la suspensión sólida, minimizando las limitaciones externas, difusionales de transferencia de masa. Por otro lado, una disminución del tamaño de partícula del biocatalizador, reduce la longitud del camino de difusión de los sustratos, en los poros del sólido; por lo tanto, se reduce la resistencia interna a la transferencia de masa. Al

mismo tiempo, que con esto, se aumenta el área superficial de contacto, todo lo que contribuye a un aumento de la velocidad de la transferencia de masa (Haigh y col., 2014), (Chowdhury y col., 2017).

Con el objetivo de establecer las condiciones que minimizan las resistencias difusionales antes mencionadas, se estudiaron la velocidad de agitación del sistema de reacción y el tamaño de partícula del sólido fermentado. Se realizó un experimento en el que la velocidad de agitación tuvo tres niveles (200, 250 y 350 rpm) y el tamaño de partícula, cuatro intervalos del SFAL (0,149-0,297; 0,400-0,595; 0,595-0,841; 0,841-2,000 mm). El experimento contó con una réplica, lo que dio un total de 24 experiencias.

Los niveles de las variables de la reacción, se fijaron según experiencias anteriores (Norjannah y col., 2016), (Roque, 2017): temperatura 40 °C, relación molar alcohol/aceite 3:1. La masa de biocatalizador usada en todos los casos fue de 0,5 g (5,5 % peso respecto a la masa de aceite).

Se utilizó como variable respuesta, el porcentaje de conversión de los triglicéridos. Las determinaciones se realizaron en un equipo de cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) marca CAMAG, empleando placas de sílica gel en aluminio, como fase móvil, hexano/éter dietílico/ácido acético (85:15:1) y, para revelar, ácido fosfórico y una solución saturada de acetato de cobre (1:1) (Ojeda y col., 2018).

La comparación entre tratamientos se realizó con un análisis de varianza multifactorial, usando el programa *Statgraphics Centurion XVI*, comprobando la normalidad de los datos por el comportamiento de los residuos y la prueba de bondad del ajuste normal Chi-cuadrado. Finalmente, con vistas a detectar entre qué niveles se establecen las diferencias, se realizó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD).

2.3.2 Relación molar etanol/aceite

La determinación de la relación molar para la mejor conversión de la mezcla de etanol/aceite en biodiesel, se realizó con un experimento en tres niveles (3:1, 4:1 y 5:1) con dos réplicas, teniendo en cuenta reportes anteriores (Amini et al., 2017). Los parámetros de la reacción fueron: temperatura 40 °C, la masa de catalizador en todos los casos fue de 0,5 g (5,5 % peso respecto a la masa de aceite). Se utilizó como variable respuesta el porcentaje de conversión de triglicéridos. Las determinaciones se realizaron en un equipo de HPTLC como se explicó en el epígrafe anterior.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección del biocatalizador para la reacción de transesterificación

En un primer experimento, se comparó la producción de lipasas por Fermentación en Medio Sólido (FMS), empleando dos cepas de hongos: una de *Aspergillus niger* (variante 1) y otra de *Rhizopus homothallicus* (variante 2); cada una ellas, con su medio y condiciones de cultivo adecuados. En la Figura 1a, se observa que la media de la máxima actividad de lipasas (medida en hidrólisis) alcanzada por ambos biocatalizadores fue de 57,79 y 75,39 (UI/g_{MS}), respectivamente. En la Figura 1b, se observa que la media de los valores de productividad fue de 0,80 y 4,19 UI/g_{MS}/h, donde se evidencia de manera contundente la superioridad de la variante 2. Esto se debe fundamentalmente a que, para la variante 2, el valor máximo de actividad enzimática se

alcanzó a las 18 h de fermentación; mientras que, con la variante 1 se alcanzó a las 72 h.

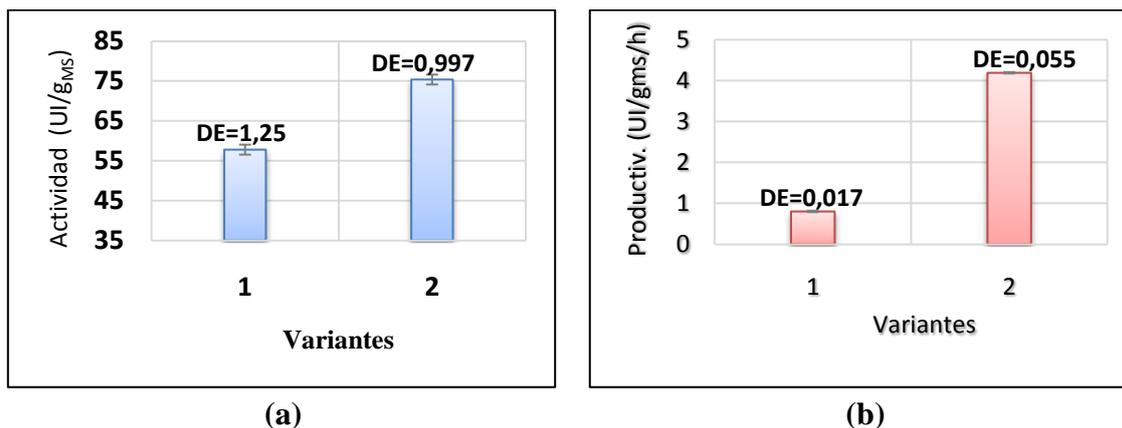


Figura 1. Comparación de las producciones y productividades en lipasas de *Aspergillus niger* (variante 1) y de *Rhizopus homothallicus* (variante 2), cultivados por fermentación en medio sólido. Notar que DE es la desviación estándar de la población.

En una compilación realizada por Alcalá-Galiano y col., (2018), se reportan los valores de productividad de 13 hongos filamentosos productores de lipasas, donde este valor se encuentra en un intervalo de 0,034-3,08 UI/g_{MS}/h lo cual confirma las potencialidades de este biocatalizador.

Ante esta evidencia, para los estudios posteriores, se decidió trabajar con el biocatalizador de *Rhizopus homothallicus*, obtenido por fermentación en medio sólido, empleando un medio químicamente definido.

3.2 Condiciones de reacción de la transesterificación de aceite de *Jatropha curcas* y etanol

3.2.1 Influencia del tamaño de partícula del biocatalizador

En la Figura 2 se presenta el efecto que tiene el tamaño de partícula del biocatalizador, en la reacción de transesterificación del aceite de *Jatropha curcas* y etanol.

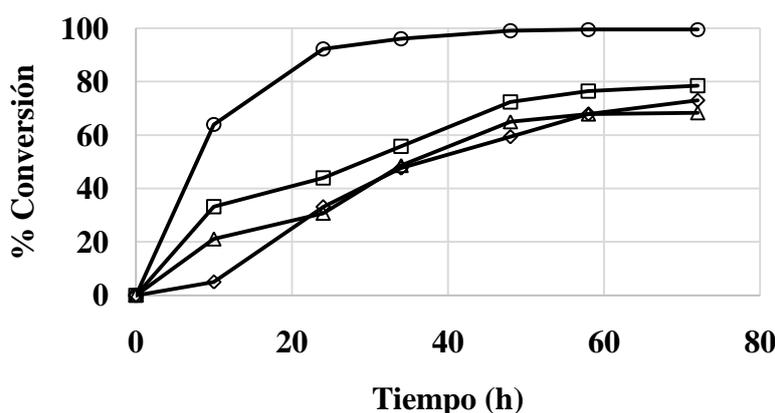


Figura 2. Dinámica de la conversión en la reacción de transesterificación del aceite de *Jatropha curcas* y etanol, empleando diferentes intervalos de tamaños de partícula del biocatalizador (0,149-0,297 (○); 0,400-0,595 (□); 0,595-0,841 (Δ); 0,841-2,000 (◇) mm). Las condiciones estándares para estas reacciones fueron: relación molar 1:3, 40 °C, 200 rpm y una adición de biocatalizador de 0,5 g (5,5 % peso respecto a la masa de aceite). A las reacciones no se les adició solvente.

En esta figura, se observa que, para los tamaños de partícula entre los intervalos de 2,000-0,841; 0,841-0,595 y 0,595-0,400 mm, los valores de conversión máximos son cercanos entre ellos (entre 68 % y 78 %) y se obtienen a las 72 h de reacción. Mientras que, para tamaños de 0,149-0,297 mm, que corresponde a un tamaño de partícula más pequeño, se alcanzan conversiones por encima del 95 % a las 34 h de reacción.

En el análisis de la diferencia mínima significativa, realizado al estudio del efecto del tamaño de partícula sobre el porcentaje de conversión del aceite de *Jatropha curcas* en biodiesel, se observan tres grupos homogéneos, siendo el intervalo de tamaños de partícula entre 0,149-0,297 mm, el que mostró la mejor conversión en la reacción de transesterificación (Tabla 1). Además, se comprobó la normalidad de los datos experimentales dando el valor de Chi-Cuadrado igual a 0,082, lo que indica que no se puede rechazar la idea de que los datos experimentales provienen de una distribución normal con un 95 % de confianza.

En efecto, el intervalo de menores tamaños de partícula evaluado en este trabajo, redujo la resistencia difusional dentro de los poros e intersticios del biocatalizador, lo que explicó por qué se obtuvieron resultados significativamente superiores. Resultados similares obtuvieron Chowdhury y col., (2017) demostrando que una disminución del tamaño de partícula del biocatalizador, reduce la longitud del camino de difusión y, por lo tanto, la resistencia interna a la transferencia de masa.

Tabla 1. Análisis de diferencia mínima significativa para el intervalo de tamaños de partícula (Tp) del biocatalizador, realizando la reacción de transesterificación

<i>Tamaño de partícula (mm)</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,149-0,297	6	86,70	2,16037	XXX
0,400-0,595	6	69,71	2,16037	XX
0,595-0,841	6	62,85	2,16037	X
0,841-2,000	6	59,99	2,16037	X

3.2.2 Influencia de la velocidad de agitación

En la figura 3 se presenta el efecto que tiene la velocidad de agitación, en la reacción de transesterificación del aceite de *J. curcas* y etanol. En esta figura, se observa que, para velocidades de agitación de 200 y 250 rpm, los valores de conversión máximos son cercanos entre ellos (90 %) y se obtienen a las 72 h de reacción. Mientras que, para 350 rpm, se obtuvieron valores inferiores de conversión cercanas a los 80 % a las 72 h.

En el análisis de diferencia mínima significativa, realizado al estudio del efecto de la velocidad de agitación sobre el porcentaje de conversión del aceite de *Jatropha curcas* en biodiesel, se observan dos grupos homogéneos con diferencias significativas (Tabla 2).

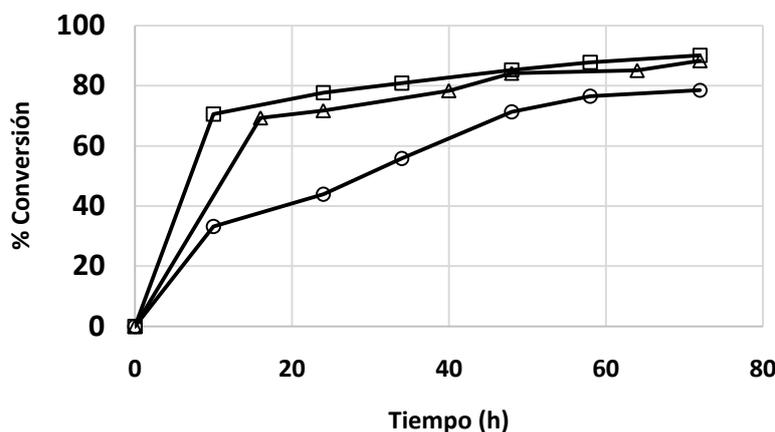


Figura 3. Dinámica de la conversión en la reacción de transesterificación del aceite de *Jatropha curcas* y etanol, empleando diferentes velocidades de agitación (200 (□); 250 (Δ); 350 (○) rpm).

Las condiciones estándares para estas reacciones fueron: relación molar 1:3, 40 °C y una adición de biocatalizador de 0,5 g (5,5 % peso respecto a la masa de aceite). A las reacciones no se les adicionó solvente

Tabla 2. Análisis de diferencia mínima significativa para la velocidad de agitación (N) del sistema de reacción de transesterificación

<i>N</i> (rpm)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
200	8	73,9525	1,87093	XX
250	8	70,8162	1,87093	XX
350	8	64,68	1,87093	X

Los grupos que comparten las mismas columnas no tienen diferencias significativas entre ellos, como es el caso de 200 rpm y 250 rpm. En el experimento a 350 rpm, se observó la formación de conglomerados del sólido en el centro del matraz Erlenmeyer. Esto explica la disminución de la conversión, como consecuencia de la limitación en el contacto entre el sólido (el biocatalizador) y las fases líquidas inmiscibles (aceite y etanol).

Teniendo en cuenta el análisis anterior, se seleccionó 200 rpm como velocidad de agitación del sistema de reacción.

3.2.3 Influencia de la relación molar etanol/aceite de *J. curcas*

En la Figura 4 se observa que, para las relaciones molares 3:1 y 4:1 (etanol/aceite de *Jatropha curcas*), los valores máximos de conversión en biodiesel (cercanas al 80 %) que fueron obtenidos a las 48 h. Para la relación molar 6:1, los valores de conversión disminuyeron a 37 % (a las 48 h); debido posiblemente a una inhibición de la actividad enzimática en el biocatalizador, por el exceso de etanol, tal como ha sido reportado por otros autores (Amini y col., 2017), (Delgado y Pashova, 2010).

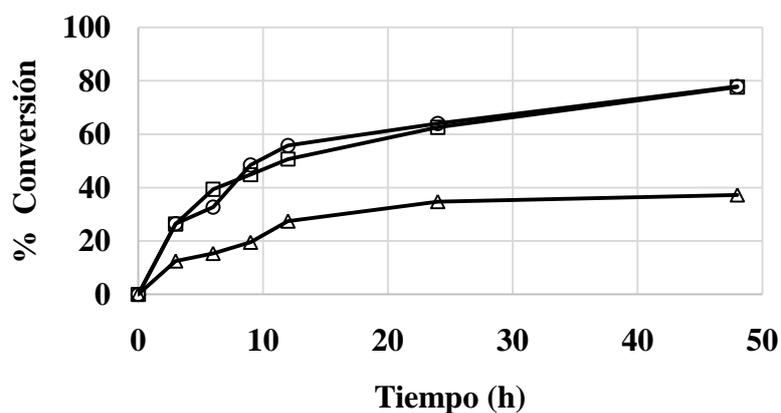


Figura 4. Dinámica de la conversión de aceite de *Jatropha curcas* en biodiesel, a diferentes valores de relaciones molares de etanol/aceite: 3:1 (O), 4:1 (□) y 6:1 (Δ). La reacción de transesterificación se llevó a cabo a 40 °C, 200 rpm y una adición de biocatalizador de 0,5 g (5,5 % peso respecto a la masa de aceite) con un intervalo de tamaños de partículas entre 0,149 y 0,297 mm. A las reacciones no se les adicionó solvente

En el análisis de diferencia mínima significativa, realizado al estudio del efecto de la relación molar etanol/aceite sobre el porcentaje de conversión del aceite de *Jatropha* en biodiesel, se observan dos grupos homogéneos con diferencias significativas (Tabla 3). Los grupos que comparten las mismas columnas no tienen diferencias significativas entre ellos, como es el caso de 3:1 y 4:1.

Tabla 3. Análisis de diferencia mínima significativa para la relación molar etanol/aceite (Rm)

<i>Rm</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3:1	3	77,69	XX
4:1	3	77,69	XX
6:1	3	37,27	X

Dado que los perfiles en las dinámicas de conversiones de las reacciones de transesterificación fueron muy similares, empleando relaciones molares de 3:1 y 4:1, se seleccionó la relación 3:1 por economía del proceso de síntesis de biodiesel y para minimizar la inhibición enzimática por el etanol.

Se calculó, la productividad (g/kg/h) en función de la cantidad máxima de ésteres sintetizados por kilogramo de la mezcla reactiva obtenida en este trabajo y el tiempo de reacción en el cual se obtuvo (48 h). Este valor se comparó con diferentes publicaciones de años recientes (Fernandes y col., 2007; Liu y col., 2013; Liu y col., 2014; Zago y col., 2014; Todeschini y col., 2016; Galeano y col., 2017 y Agueiras y col., 2019), como se muestra en la figura 5.

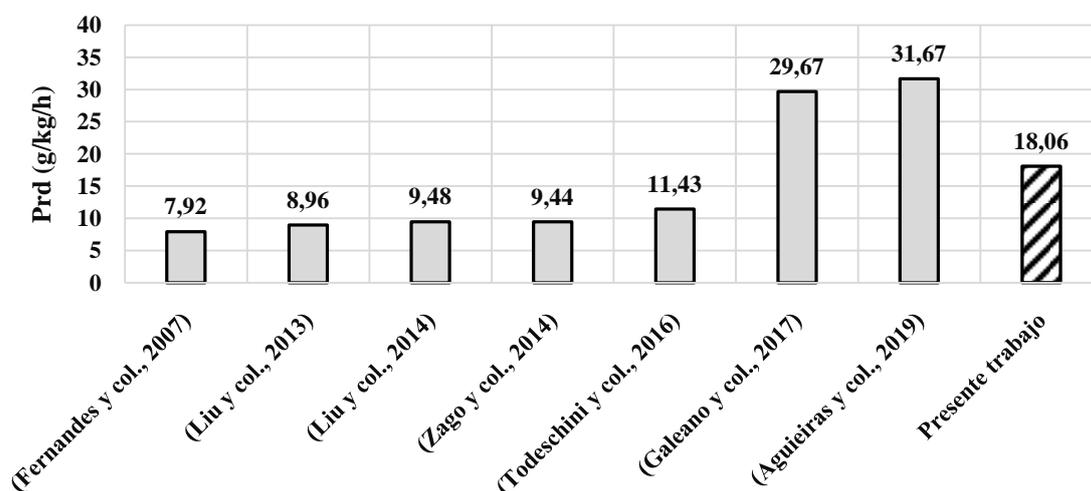


Figura 5. Comparación de productividades (Prd) reportadas del uso directo del sólido fermentado seco en la producción de biodiesel y la alcanzada por el presente trabajo

Se puede observar que la productividad obtenida en este trabajo se encuentra entre los tres valores más altos, lo que es muestra el potencial de este sólido para ser utilizado como biocatalizador en la producción industrial de biodiesel.

4. CONCLUSIONES

1. El sólido fermentado seco de *Rhizopus homothallicus*, con una actividad de lipasas (75,39 UI/g_{MS}, en hidrólisis) fue seleccionado para este estudio, debido a su alta actividad y productividad de síntesis de lipasas (4,19 UI/g_{MS}/h).
2. Los mejores resultados en los valores de conversión del aceite de *Jatropha curcas* (por encima del 95 %), fueron alcanzados empleando una velocidad de agitación de 200 rpm, un intervalo de tamaños de partícula del biocatalizador de 0,149-0,297 mm.
3. Se comprobó que para relación molar 3:1 y 4:1 no hay diferencias significativas en el porcentaje de conversión, obteniéndose valores de 77,69 %. Para la relación 6:1, se afecta la conversión debido a la inhibición de la enzima.
4. Se estima que el biocatalizador utilizado en las condiciones de reacción establecidas tiene potencialidades para ser usado en la síntesis industrial de biodiesel.

REFERENCIAS

- Aguieiras, E.C.G., Barros, D.S.N., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D.M., Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions., *Renew Energy*, Vol. 130, 2019, pp. 574–581.
- Alcala-Galiano, D., Cujilema-Quitio, M., León-Revelo, G., Baryolo-González, L., Ramos-Sánchez, L., Producción enzimática de biodiesel con biomasa lignocelulósica., *Tecnología Química*, Vol. XXXVIII, No. 1, 2018, pp. 162-181.
- Amini, Z., Ilham, Z., Ong, H., Mazaheri, H., Chen, W., State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production., *Energy Conversion and Management*, Vol. 141, Oct. 2017, pp. 339–353.

- Borgolov, A., Gorin, K., Pozhidaev, V., Sergeeva, Y., Gotovtsev, P., Vasilov, R., Mathematical Modeling of Triglyceride Transesterification through Enzymatic Catalysis in a Continuous Flow Bioreactor., *Indian Journal of Science and Technology*, Vol. 9, No. 47, 2016, pp. 1-10.
- Chowdhury, J., Cao, X., Basir, F., Roy, P., Effect of mass transfer and reaction kinetics in transesterification of *Jatropha curcas* oil., *International journal of mathematical models and methods in applied sciences.*, Vol. 11, 2017, pp. 130-138.
- Chua, S.Y., Periasamy, L.A. P., Goh, C.M.H., Tan, Y.H., Mubarak, N.M., Kandedo, J., Biodiesel Synthesis using Natural Solid Catalyst Derived from Biomass Waste—A Review., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.*, Vol. 81, 2020, pp. 41-60.
- Cosío-Cuadros, R., Aprovechamiento biotecnológico de pastas de *Jatropha Curcas L.* y *Ricinus Communis L.* para su detoxificación y obtención concomitante de biocarburos/biolubricantes., Tesis presentada en opción al título de Máster en ciencia y tecnología con orientación en Biotecnología productiva, Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C., México, 2017.
- Cujilema-Quitio, M., León-Revelo, G., Rizo, M., Ruiz, L., Ramos-Sánchez, L., Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: Influencia del pH., *Centro Azúcar*, Vol. 45, No. 4, 2018, pp. 1-9.
- Delgado, C., Pashova, V., Producción enzimática de ésteres etílicos del aceite de ricino., *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, No. 53, 2010, pp. 9-19.
- Fernandes, M.L.M., Saad, E.B., Meira, J.A., Ramos, L.P., Mitchell, D.A., Krieger, N., Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media., *J Mol Catal B Enzym*, Vol. 44, 2007, pp. 8–13.
- Galeano, J.D., Mitchell, D.A., Krieger, N., Biodiesel production by solvent-free ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids containing lipases of *Burkholderia contaminans.*, *Biochem. Eng. Journal*, Vol. 127, 2017, pp. 77-86.
- Haigh, K., Vladislavljević, G., Reynolds, J., Nagy, Z., Saha, B., Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production., *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. 92, No. 4, 2014, pp. 713-719.
- Kwon, D., Rhee, J., A simple a rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay., *JAOCS*, Vol. 63, 1986, pp. 89–92.
- Liu, Y., Li, C., Meng, X., Yan, Y., Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation., *Fuel Process Technol.*, Vol. 106, 2013, pp. 303–309.
- Liu, Y., Li, C., Wang, S., Chen, W., Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics., *Appl. Energy*, Vol. 113, 2014, pp. 713–721.
- Luque, R., Lin, C., Wilson, K., Clark, J., *Handbook of Biofuels Production.*, Processes and Technologies., No.98, Ed. Woodhead Publishing, 2016, pp. 1-747.
- Norjannah, B., Chyuan Ong, H., Masjuki, H.H., Juan, J.C., Chong, W.T., Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review., *RSC Advances*, Vol. 6, No. 65, 2016, pp. 60034-60055.
- Rezania, S., Oryani, B., Park, J., Hashemi, B., Yadav, K.K., Kwon, E.E., Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on

- economic aspects, fuel properties and by-product applications., *Energy Conversion and Management*, Vol. 201, Oct. 2019, pp. 1-15.
- Rodríguez, J., Mateos, J., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J., Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation., *Process Biochem*, Vol. 41, 2006, pp. 2264–2269.
- Roque, Y., Evaluación de un sólido fermentado como biocatalizador en la reacción de transesterificación para la síntesis de biodiesel, Tesis presentada en opción al título en Ingeniería Química, Universidad de Camagüey, Cuba, 2017.
- Soares, D., Pinto, A.F., Gonçalves, A.G., Mitchell, D.A., Krieger, N., Biodiesel production from soybean soap stock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor., *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 81, 2013, pp. 15-23.
- Todeschini, J.K.P., Aguiéiras, E.C.G., Castro, A.M., Langone, M.A.P., Freire, D.M.G., Rodrigues, R.C., Synthesis of butyl esters via ultrasound-assisted transesterification of macaúba (*Acrocomia aculeata*) acid oil using a biomass-derived fermented solid as biocatalyst., *J Mol Catal B Enzym*, Vol. 133, 2016, pp. 213–219.
- Zago, E., Botton, V., Alberton, D., Córdova, J., Yamamoto, C.I., Côcco, L.C., Mitchell, D. A., Krieger, N., Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*., *Energy Fuel*, Vol. 28, 2014, pp. 5197–5203.
- Zarejousheghani, F., Kariminia, H., Khorasheh, F., Kinetic Modelling of Enzymatic Biodiesel Production from Castor Oil: Temperature Dependence of the Ping Pong Parameters., *The Canadian Journal of Chem. Eng.*, Vol. 94, 2016, pp. 512-517.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- M.Sc. Diana D. Alcala-Galiano Morell. Realizó el estudio experimental, el análisis de los datos y escritura del artículo.
- Dr.C. Jesús A. Córdova López. Colaboró en la planificación de los experimentos, en el procesamiento de los datos, el análisis de los resultados y la escritura del artículo.
- Dra.C. Evelyn Romero Borbón. Colaboró con el procesamiento de los datos, y el análisis de los resultados.
- Dr.C. Jorge Alberto Rodríguez González. Colaboró con la implementación de las técnicas analíticas utilizadas.
- M.Sc. Ricardo Cosío Cuadros. Colaboró con las técnicas analíticas utilizadas.
- Dr.C. Luis B. Ramos-Sánchez. Colaboró con el procesamiento de los datos, el análisis de los resultados y la escritura del artículo.