

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE VEGETAL PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE CATÁLISIS ENZIMÁTICA
CON LIPASAS DE *Bacillus spp.***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CARINA SHIANYA ALVAREZ VILLAGOMEZ

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2009.

RESUMEN de tesis de **Carina Shianya Alvarez Villagomez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación a Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Septiembre, 2009.

TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE VEGETAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE CATÁLISIS ENZIMÁTICA CON LIPASAS DE *Bacillus spp* .

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

El objetivo de este trabajo fue realizar la reacción de transesterificación entre un aceite vegetal y metanol para la producción de biodiesel mediante catálisis enzimática utilizando lipasas pertenecientes al género *Bacillus*, así mismo comparar el porcentaje de conversión de triglicéridos a metil ésteres entre la catálisis química y enzimática. Para tal fin, se identificaron y seleccionaron de 52 cepas analizadas, 4 cepas pertenecientes al género *Bacillus* productoras de lipasas (cepas S, T, 36 y 1R), las cuales se extrajeron e inmovilizaron en quitosano mostrando estabilidad en su actividad y se probaron como catalizadores enzimáticos para realizar la transesterificación de aceite de maíz y metanol para la elaboración de biodiesel. La reacción de transesterificación, se logró completar mediante catálisis química con hidróxido de sodio a 45 °C, y mediante catálisis enzimática con las lipasas de la cepa 1R de *Bacillus* a 30 °C y con 20 % de metanol (v/v aceite-alcohol); observándose mediante su análisis en HPLC un mayor porcentaje de conversión a metil ésteres (biodiesel) en la reacción química (del 92.8 %) en relación con la reacción enzimática (del 25.2%). Se midieron las características físico-químicas del biodiesel obtenido y se compararon con los estándares señalados por la norma EN14214 implantada por el Comité Europeo de Normalización, corroborando que la densidad, viscosidad y punto de escurrimiento del biodiesel generado en el laboratorio, tanto por catálisis química como enzimática, cumplió con los estándares de calidad establecidos. Se evaluó además la tasa de crecimiento de cuatro cepas de microalgas pertenecientes al género *Dunaliella* (consideradas como factibles para generar biomasa lipídica como fuente de materia prima para la elaboración de biodiesel), y se seleccionaron las cepas CBO y DUT2 quienes mostraron mayor crecimiento. Estos resultados confirman que se logro hallar una cepa de *Bacillus* (1R) productora de lipasas extracelulares útiles para su uso como catalizadores en la producción de biodiesel, así como la generación de biomasa de de dos cepas de microalgas (CBO y DUT2).

Palabras Clave: Biodiesel, transesterificación, lipasas.

ABSTRACT of the thesis presented by **Carina Shianya Alvarez Villagomez** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. September 2009.

TRANSESTERIFICATION OF VEGETABLE OIL FOR THE BIODIESEL PRODUCTION BY ENZYMATIC CATALYSIS WITH *Bacillus* LIPASES

The objective of this work was to carry out the transesterification reaction between vegetable oil and methanol, in order to produce biodiesel through enzymatic catalysis using lipases from *Bacillus* genus, likewise to compare the percentage of triglycerides conversion to methyl ester between chemical and enzymatic catalysis. Therefore, we identified and selected 4 strains of *Bacillus* genus as lipases producers (strains S, T, 36 y 1R) of 52 tested strains, the synthesized lipases were extracted and immobilized in chitosan showing stability in their activity and were tested as catalysts for the enzymatic transesterification of corn oil and methanol for the biodiesel elaboration. The transesterification reaction was complete by chemical catalysis with sodium hydroxide at 45 °C, and by enzymatic catalysis with lipases of the strain 1R of *Bacillus* at 30 °C and with 20% methanol (v/v oils - alcohol); and we observed by HPLC analysis, a higher percentage of conversion to methyl esters (biodiesel) in the chemical reaction (from 92.8%) compared to the enzymatic reaction (from 25.2%). The physical-chemical characteristics of the obtained biodiesel were measured and compared with the standards as pointed out by the norm EN14214 implanted by the European Committee of Normalization, corroborating that the density, viscosity and point of glide of the biodiesel generated in the laboratory, for both, chemical and enzymatic catalysis, showed the established standards of quality. It was also evaluated the growth rate of four microalgae strains belonging to the genus *Dunaliella* (feasibility for generate lipidic biomass as potential sources of feedstock for the biodiesel production), and the CBO and DUT2 strains were selected which showed the higher growth rates. These results confirm that it was possible to find a strain of *Bacillus* (1R) with the synthesizer lipases capacity and useful as catalysts in biodiesel production, as well as the biomass generation from two strains of microalgae (CBO and DUT2).

Keywords: Biodiesel, transesterification, lipases

Dedicatorias

A **Dios** por brindarme la fuerza para continuar luchando en la vida pese a las adversidades y a mis errores; por ser mi fe y esperanza; y por darme entre muchas cosas la oportunidad de alcanzar esta meta.

A mi padre, **José Antonio Alvarez** por ser el aliento que me da ánimo para seguir siempre adelante a alcanzar mis sueños, por tener fe en mi, por el apoyo y amor que siempre he recibido de ti, y simplemente por ser el hombre más maravilloso que existe.

A mi madre, **Norma Angélica Villagomez**, por ser mi ejemplo de tezón y fortaleza, por ayudarme a ser una persona constante y perseverante, porque gracias a ti he aprendido que no hay nada que no pueda alcanzar, por enseñarme a no dejarme vencer, pero sobre todo por ayudarme a ser la mujer que soy.

A mis hermanas **Karen** y **Karla**, por quienes me esfuerzo día a día para dar el mejor ejemplo, por aguantarme y escucharme, por los lazos de amistad que nos unen y porque sé que siempre podré contar con ustedes. Las amo

A mi **pequeño Tony**, por darle luz a nuestras vidas y llenar de alegría nuestros corazones, por todo el orgullo, amor y felicidad que forjas en nosotros; porque el mirarte crecer es el mejor regalo de la vida. Te amo tesoro.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), quien me abrió las puertas para alcanzar una meta mas.

A mi director de tesis, el Dr. Jorge Olmos Soto por la oportunidad, confianza y apoyo brindado a lo largo de nuestro trabajo.

A mis sinodales, el Dr. José de Jesús Paniagua Michel y al Dr. Rubén Lara Lara por su cordialidad, apoyo e invaluable sugerencias.

A Eduardo Morales, técnico del HPLC, por su colaboración y amable asistencia.

A mis compañeros Abigail, Abelardo y Gretel, por su constante apoyo, por sus consejos, gentileza y por hacer de mi trabajo un lugar agradable.

A Izbelt, Alma, Ana Isabel y Alex por su amistad y por los gratos momentos compartidos.

A Giuliana Martínez, por su incondicional apoyo aun en los momentos difíciles, por los instantes bellos, por su alegría, estimulación y complicidad.

A mi familia, quienes son mi guía y motivo para continuar siempre adelante a alcanzar grandes cosas. Por ser lo que son y por estar siempre conmigo, gracias.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 El biodiesel y sus propiedades.....	3
II.2 Producción mundial de biodiesel.....	4
II.3 Materia prima.....	7
II.4 Reacción de transesterificación.....	9
II.5 Lipasas.....	11
II.6 Género <i>Bacillus</i>	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
V. MATERIAL Y MÉTODO.....	18
V.1 Origen y selección de cepas de <i>Bacillus spp</i> productoras de lipasas.....	18
V.1.1 Determinación de la temperatura y pH óptimos de las lipasas.....	19
V.2 Caracterización fenotípica y molecular de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.....	19
V.2.1 Caracterización fenotípica.....	19
V.2.2 Caracterización molecular a nivel de género.....	20
V.2.3 Crecimiento celular.....	21
V.3 Producción y extracción de lipasas.....	21
V.4 Inmovilización enzimática de lipasas.....	22
V.5 Cultivo de cepas de microalgas del género <i>Dunaliella</i>	23

CONTENIDO (Continuación)

V. 5.1 Descripción morfológica.....	23
V. 5.2 Crecimiento celular.....	23
V.6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel	24
V. 6.1 Reacción química.....	24
V.6.2 Reacción enzimática.....	25
V.7 Análisis de los productos formados en la transesterificación por HPLC.....	26
V.8 Comparación de características físico-químicas de los metil ésteres obtenidos, con las del Biodiesel Estándar.....	27
VI. RESULTADOS	28
VI.1 Origen y selección de cepas de <i>Bacillus spp</i> productoras de lipasas.....	28
VI. 1.1 Determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad de las lipasas.....	29
VI. 2 Identificación fenotípica y molecular de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.....	31
VI. 2.1 Caracterización fenotípica.....	31
VI. 2.2 Caracterización molecular a nivel de género.....	32
VI. 2.3 Crecimiento celular.....	32
VI.3 Producción de lipasas.....	33
VI. 4 Inmovilización enzimática de lipasas.....	34
VI. 5 Cultivo de cepas de microalgas del género <i>Dunaliella</i>	35
VI. 5.1 Descripción morfológica.....	35
VI. 5.2 Crecimiento celular.....	36
VI. 5.2.1 Cepa CBO.....	36
VI. 5.2.2 Cepa CCAP 19/30.....	37
VI. 5.2.3 Cepa DUT2.....	38
VI. 5.2.4 Cepa DUX1.....	39
VI. 6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel.....	40
VI. 6.1. Transesterificación química.....	40
VI. 6.2 Transesterificación enzimática.....	41
VI. 7 Análisis de los productos formados en la transesterificación por HPLC.....	42
VI. 7.1 Estandarización del método.....	42
VI. 7.2 Identificación de productos formados en las reacciones por HPLC.....	42
VI. 8 Comparación de características físico-químicas de los metil ésteres obtenidos con los del Biodiesel Estándar.....	45
VII. DISCUSIONES.....	46
VII.1 Origen y selección de cepas de <i>Bacillus spp</i> productoras de lipasas.....	46
VII.2 Caracterización fenotípica y molecular a nivel de género de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.....	47

CONTENIDO (continuación)

VII.3 Producción de lipasas.....	48
VII.4 Inmovilización enzimática de lipasas.....	48
VII. 5 Cultivo de cepas de microalgas del género <i>Dunaliella</i>	49
VII.6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel.....	50
VII. 7 Análisis de los productos formados en la transesterificación por HPLC.....	51
VII.8 Comparación de características fisico-químicas de los metil ésteres obtenidos, con las del Biodiesel Estándar.....	51
VIII. CONCLUSIONES PUNTUALES.....	53
IX. ESPECTATIVAS.....	55
LITERATURA CITADA.....	56
ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción de biodiesel en la Unión Europea en millones de toneladas (Wei <i>et al.</i> , 2008)	6
2	Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel con metanol (Chen <i>et al.</i> , 2008).....	10
3	Estructura química del quitosano (Kumar, 2000).	14
4	Producción de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R en MSL. Se observa la presencia de un halo fluorescente en torno a las cepas S, T, 36 y 1R como indicador de lipasas, tras 72 horas de incubación a 30°C.....	28
5	Producción de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R en MSL con inhibidor de proteasas. Se observa la presencia de un halo fluorescente en torno a las cepas S, T, 36 y 1R como indicador de lipasas, tras 72 horas de incubación a 30°C.....	29
6	A) Tinción Gram de la cepa S, observada en microscopio compuesto a 100x. La cepa S muestra forma de bacilos y paredes teñidas de color violeta, es decir, Gram positiva. B) Tinción de espora de la cepa 36, observada en microscopio compuesto a 100x. Se observan las esporas generadas por la cepa 36, teñidas con verde de malaquita.....	31
7	Identificación molecular de las cepas S, T, 1R y 36 mediante amplificación por PCR, observadas en gel de agarosa al 1.2%. Línea 1, 2y 5. Cepa BB80 $\Delta npr his A gly B$, de <i>Bacillus subtilis</i> (control) 600pb. Líneas 3, 4, 6, y 7. Fragmentos de 600pb obtenido de las cepas S, T, 1R y 36.....	32
8	Curva de crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> , en medio PL: cepa S (◆) cepa T (■) cepa 36 (▲) y cepa 1R (●).....	33
9	Lipasas extraídas de las cepas S, T, 36 y 1R de <i>Bacillus</i> , sembradas en medio agar con aceite de olivo y rodamina B. Se observa la presencia y actividad de lipasas, debido a la formación de fluorescencia producto de la degradación del sustrato tras 24 horas de incubación a 30°C, bajo luz UV.....	34

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

10	A) Perlas de quitosano con lipasas extracelulares inmovilizadas de la cepa 1R de <i>Bacillus</i> B) Imagen A, ampliada.	35
11	Características fenotípicas de <i>Dunaliella</i> observadas en microscopio compuesto a 40x. A) Cepa DUT2. B) Cepa CBO.....	36
12	Curvas de crecimiento de las cepas de microalgas de <i>Dunaliella spp</i> , cultivadas en 100 ml de medio Guillard F/2: Cepa CBO (◇), cepa CCAP 19/30 (●), cepa DUT2 (▲) y cepa DUX1 (■).....	37
13	Productos derivados de reacción de transesterificación química entre aceite de maíz y metanol. Izquierda: Formación de dos capas en el tubo de reacción, biodiesel concentrado en la parte superior y glicerol en el fondo de color más oscuro. Derecha: imagen ampliada de las capas formadas.....	40
14	Productos derivados de la reacción de transesterificación enzimática con la lipasa 1R, a 30°C y 20% de metanol. A) Blanco de reacción donde el orden de los compuestos de abajo a arriba son: glicerol, enzima, aceite, y metanol. B) Productos formados en la reacción enzimática de transesterificación (de abajo hacia arriba): glicerol, enzima y biodiesel.....	41
15	Perfil cromatografico por HPLC, de los componentes presentes en el aceite de maíz, con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20µl.....	43
16	Perfil cromatográfico por HPLC, de los productos obtenidos tras la transesterificación química, con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20µl.....	44
17	Perfil cromatográfico por HPLC, de los productos obtenidos tras la transesterificación enzimática, con lipasas de <i>Bacillus</i> , cepa 1R; con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20µl.....	45

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Principales países productores de biodiesel en el mundo. Fuente: F.O. Licht's World Ethanol and Biofuels Report (2005), (citado por Castro <i>et al</i> , 2007).....	5
II	Comparación entre las propiedades físicas y químicas del biodiesel producido por diferentes aceites vegetales (Al Zuhair, 2007).....	8
III	Lipasas microbianas utilizadas en la producción de biodiesel, fuente de aceite, alcohol, y temperatura óptima (Al Zuhair, 2007).....	13
IV	Composición del medio luminoso (MSL- solido, MLL-liquido).....	18
V	Numero de ensayo, porcentaje de metanol y temperatura utilizada en los ensayos de reacción de transesterificación enzimática con lipasas de <i>Bacillus spp</i>	26
VI	Actividad de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R sembradas en MSL a diferentes temperaturas, indicado por el diámetro del halo fluorescente en cm.....	30
VII	Actividad de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R sembradas en MSL a diferente pH, indicado por el diámetro del halo fluorescente en cm.....	30
VIII	Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa CBO cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.....	37
IX	Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa CCAP19/30 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.....	38
X	Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa DUT2 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.....	39
XI	Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa DUX1 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.....	39

LISTA DE TABLAS (Continuación)

XII	Tiempos promedio de retención de los principales componentes identificados en la transesterificación de aceite de maíz con metanol.....	42
XIII	Comparación entre los valores fisico-químicos estándares establecidos en la norma EN14214 para Biodiesel y los valores obtenidos del Biodiesel Químico y Enzimático producido en el laboratorio.....	45

I. INTRODUCCIÓN

El biodiesel es un biocombustible definido como ésteres monoalquílicos (metil o etil ésteres) de ácidos grasos, derivado de aceites vegetales o de grasas animales. Se utiliza en artefactos de compresión-ignición de manera alternativa a los derivados del petróleo. Es formado por una reacción de transesterificación de un aceite vegetal con un alcohol ligero (comúnmente metanol o etanol) (Al-Zuhair, 2007), dejando como residuo de valor añadido glicerol (Hoydonex *et al.*, 2004), que puede ser utilizado en la industria cosmética, entre otras.

El biodiesel tiene muchos meritos como recurso de energía renovable, es biodegradable y no tóxico. Los productos de su combustión tienen niveles reducidos de partículas de monóxido de carbono, oxido de sulfuro y bajo algunas condiciones óxidos de nitrógeno (Al-Zuhair, 2007), por lo que lo convierten en una fuente nueva de energía limpia en contra del calentamiento global. Las características del biodiesel generalmente similares a las del diesel de petróleo lo hacen un fuerte candidato para remplazar al mismo, permitiendo que funcione efectivamente en motores de diesel convencional sin que sea necesaria ningún tipo de modificación (Al-Zuhair, 2007).

Varios tipos de aceite vegetal pueden ser utilizados para la elaboración de biodiesel, en los que destacan el aceite de palma, aceite de soja, aceite de colza y aceite de girasol (Fukuda *et al.*, 2001). Las microalgas, por su parte, también son una buena fuente de aceite; además, presentan diversas ventajas respecto al uso de cultivos agrícolas, siendo la más importante, su elevada productividad. La limitante del uso de este recurso es su lento crecimiento, por lo que se hace necesario realizar estudios para optimizar las condiciones de cultivo, que permitan obtener un rápido crecimiento y una alta producción de aceite en menor tiempo (Palligarnai *et al.*, 2008).

El biodiesel puede ser producido a través de vías químicas y biológicas, sin embargo, el método químico es el que se ha utilizado en la industrialización del biodiesel en varios países y usualmente incluye dos tipos de catálisis: catálisis ácida y alcalina (Wei *et al.*, 2008). La producción enzimática (vía biológica) del biodiesel ha sido propuesta para superar los obstáculos del proceso de catálisis química, la cual, al utilizar catalizadores alcalinos como KOH y NaOH presenta algunos inconvenientes, como lo es la co-generación de glicerol contaminado con el catalizador y la formación de jabones, lo que dificulta el proceso de purificación del biodiesel obtenido (Liu, 1994; Basu y Norris, 1996). No obstante el principal obstáculo del uso de enzimas para la catálisis enzimática es su alto costo, es por ello que es esencial el reutilizo de enzimas desde el punto de vista económico, lo cual se logra utilizando la enzima en forma inmovilizada, que además, mejora su estabilidad y actividad en las reacciones enzimáticas (Al-Zuhair, 2007). Las enzimas encargadas de realizar la reacción de transesterificación entre un aceite y alcohol para producir biodiesel se denominan lipasas y las podemos encontrar distribuidas en todos los tipos de organismos vivos entre los que destacan las bacterias, que incluyen entre otros, al género *Bacillus*; éste género de bacterias presentan forma de bastón, son Gram positivas, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, se les encuentra en una gran diversidad de ambientes y es un género importante ya que exhiben una alta actividad enzimática, las cuales catalizan una amplia gama de reacciones, es por ello que en la presente investigación se planteo identificar cepas de *Bacillus spp* y las lipasas producidas por las mismas, que lleven a cabo la reacción de transesterificación de aceite vegetal y alcohol para su uso en la producción de biodiesel, y a la vez, comparar el porcentaje de conversión de triglicéridos a metil ésteres entre la transesterificación por catálisis química y enzimática, así como evaluar el crecimiento y generar biomasa de cepas de microalgas del género *Dunaliella* para su futura utilización como materia prima en la elaboración de biodiesel.

II. ANTECEDENTES

Es claro, que debido el agotamiento de los combustibles fósiles, así como, por la emisión de gases contaminantes que aceleran el efecto invernadero, es imprescindible introducir o ampliar las fuentes de energía y tecnologías que permitan sustituir gradualmente las actuales, y a la vez, generar menos contaminantes (Collymore *et al*, 2008). Es por ello, que la importancia del biodiesel ha ido incrementando en los últimos años, para utilizarse como fuente de energía alterna al diesel de petróleo, ya que tiene muchos meritos como recurso de energía renovable, además de ser biodegradable y no tóxico.

II.1 El biodiesel y sus propiedades.

El biodiesel es un biocombustible definido como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos formados por una reacción de transesterificación, también llamada alcoholisis, de aceites vegetales o de grasas animales. El proceso es similar a la hidrólisis, excepto que es empleado un alcohol en lugar de agua. Los alcoholes convenientes son metanol, etanol, propanol, butanol y alcohol amilo. El metanol y etanol son utilizados con mayor frecuencia, especialmente el metanol, debido a su bajo costo y a sus ventajas físicas y químicas (Fukuda *et al.*, 2001).

Las características atractivas de la utilización del biodiesel como combustible son: que es derivado de plantas, no es un combustible fósil, tiene poco perfil de emisiones, y siendo un recurso renovable, es benéfico para el ambiente (Ma y Hanna, 1999; Du *et al.*, 2004). Es biodegradable y relativo al combustible diesel convencional, los productos de su combustión tienen niveles reducidos de partículas de monóxido de carbono (Reyes y Sepulveda, 2006), óxido de sulfuro, hidrocarburos y hollín (Ma y Hanna, 1999; Wardle, 2003; Du *et al.*, 2004). Además no hay diferencias significativas entre el biodiesel y el diesel en la durabilidad de los artefactos o en depósitos de carbono, esto ha sido demostrado en su mayoría, en estudios en laboratorio (Vicente *et al.*, 2004).

Adicionalmente, el uso de biodiesel a gran escala promueve la plantación y cosecha para la producción de su materia prima; lo que resulta en el reciclaje de más dióxido de carbono, por medio de la fotosíntesis, minimizando el impacto del efecto invernadero (Korbitz, 1999; Agarwal y Das, 2001).

El biodiesel tiene un punto de encendido relativamente alto (150°C), lo cual lo hace menos volátil y más seguro en el transporte que el diesel de petróleo (Krawcsyk, 1996), provee de propiedades lubricantes como resultado de los ácidos grasos libres, los cuales reducen el uso de los artefactos de ignición- compresión y extienden su vida (Von, 1999). Además el biodiesel tiene propiedades físicas y un contenido energético cercanos a los del diesel de petróleo, lo cual permite que funcione eficientemente en artefactos de diesel convencional sin que sea necesaria ninguna modificación (Yusaf *et al.*, 2005).

II.2 Producción mundial de biodiesel

El biodiesel en América tiene por lo menos de 45 a 50 años de antigüedad. El producto se produjo experimentalmente en el laboratorio de la Universidad de Uruguay en la década del 60. Años más tarde, se inició su producción con diferentes tipos de oleaginosas y su empleo masivo fue ganando interés en Argentina, Estados Unidos, Brasil y Colombia. En Francia, Alemania, Italia, España, Suecia y Austria, la tecnología biodiesel ha tenido más años de uso que en América, siendo utilizado puro (B100), o mezclado con petrodiesel, denominándosele B5 (5% biodiesel y 95% petrodiesel) y B20 (20% biodiesel y 80 % petrodiesel) (http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0019/noticia_biodiesel.htm).

Según el F. O. Licht's World Ethanol and Biofuels Report, la producción de biodiesel en el mundo en el 2005 había superado los 3 mil 500 millones de litros, siendo Alemania el principal productor con 1,920 millones de litros, seguido por Francia (511 millones), Estados Unidos (290 millones), Italia (227 millones), y Austria (83 millones) (Castro *et al.*, 2007) (Tabla I).

Tabla I. Principales países productores de biodiesel en el mundo. Fuente: F.O. Licht's World Ethanol and Biofuels Report (2005), (citado por Castro *et al*, 2007)

País	Año	Producción (millones l/año)	Insumos	Tipo de uso ¹
Alemania	2005	1.920	Colza, girasol, aceite de cocina reciclado	Uso puro en todo tipo de vehículos.
Francia	2005	511	Colza, girasol, aceite de cocina reciclado	Mezcla en el diesel: sin etiquetado para uso general (B2) y en flotas cautivas (B30)
Estados Unidos	2005	290	Más del 90% proviene de otros aceites.	B100, B20 y B2 principalmente en flotas cautivas, pero también venta al público y uso en minas subterráneas.
Italia	2005	227	Girasol o aceite de cocina reciclado	90% del biodiesel se usa puro o mezclado con 20% de diesel fósil, para usos térmicos como calefacción. Inicios en uso para transporte, especialmente flotas cautivas.
China	2004	138	Colza, semilla de algodón, aceite de cocina reciclado.	Exportado a Hong Kong, uso principal en flotas cautivas.
República Checa	2002	63	Colza, girasol, aceite de cocina reciclado	Mezcla de diesel con 30% a 40% de biodiesel.
Australia	2004	36	Aceite de cocina reciclado, grasas animales	
Austria	2005	30	Colza y aceite de cocina reciclado	Mezcla de biodiesel de colza con diesel, o biodiesel puro de aceite de fritura.
España	2002	7	Girasol y aceite de cocina reciclado	Flotas cautivas
Reino Unido	2002	5	Aceite de cocina reciclado, colza.	Venta directa a flotas o en algunas estaciones de servicio. Promoción del B5.
Suecia	2002	3	Colza.	Flotas cautivas.

¹ Bx se refiere a la proporción (x%) de mezcla de biodiesel (B) en diesel convencional. Por ejemplo, B2 hará referencia a una mezcla de 2% de biodiesel en 98% de diesel.

La Unión Europea (UE), ha sido indiscutiblemente el líder global en la producción del biodiesel, la cual, ha aumentado de casi 3.2 millones de toneladas en el 2005, a 4.9 millones de toneladas en el 2006. Esto representa un 54% de crecimiento anual. Como resultado, la producción biodiesel en la UE ha incrementado a más del doble en los últimos 2 años, aumentando de 1.9 millones de toneladas en el 2004 a 4.9 millones de toneladas en el 2006 (Figura 1), esto ha marcando una extensa aceleración en la continua expansión del sector de producción de biodiesel en Europa (Wei *et al.*, 2008).

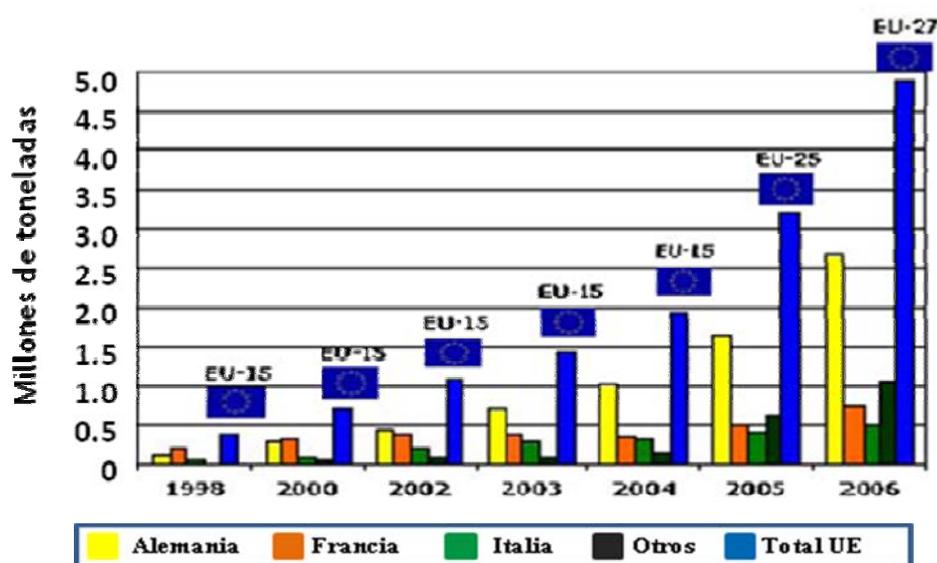


Figura 1. Producción de biodiesel en la Unión Europea en millones de toneladas (Wei *et al.*, 2008).

La producción de Biodiesel en los Estados Unidos también aumentó dramáticamente en los últimos años, de 2 millones de galones en el 2000 a 250 millones de galones en el 2006 y se estima una producción de 450 millones de galones en el 2007. La tendencia acelerada de producción, creció a un paso de 113 millones de galones por año entre el 2004 y 2006 (Carriquiry, 2007). Se estima que el mercado del biodiesel mundial, alcanzara los 37 mil millones de galones para el año 2016, creciendo una tasa media anual del 42%. Europa continuará siendo el líder mundial de producción de biodiesel en la próxima década, seguido por el mercado estadounidense (Sims, 2007).

II.3 Materia prima.

Las grasas y aceites, son componentes esenciales de todos los animales y vegetales. Se producen en todo el mundo, a un nivel de aproximadamente 67 millones de toneladas por año, de los cuales, más del 90% se utiliza en productos comestibles (O'Brien, 1993; Gunstone, 2001). Aunado a que las grasas y aceites tienen una función nutricional, estas se utilizan también en más de 2 millones de toneladas como material para la síntesis de productos valiosos, como lubricantes, plastificantes, cosméticos, y en la producción de biodiesel (Harrington, 1994; Drown y Harper, 2001).

Varios tipos de aceite vegetal pueden ser utilizados para la elaboración de biodiesel, la fuente de materia prima usualmente depende de las cosechas presentes en el clima regional. En Estados Unidos y algunos países europeos, el aceite de soja y de colza, respectivamente, son los más utilizados. En países tropicales, se utilizan el aceite de palma y de coco (Knothe, 2002). Otros trabajos han reportado la producción enzimática de biodiesel utilizando aceite de olivo (Sánchez y Vasudevan, 2006), aceite de salvado de arroz (Al Zuhair *et al.*, 2006) y aceite de canola (Chang *et al.*, 2005). Actualmente la principal barrera para la comercialización del biodiesel es el costo del material crudo, esta reportado que el 60- 75% del costo del biodiesel se eleva debido al costo de la materia prima (Krawcsyk, 1996; Connemann y Fischer, 1998). Por ejemplo el precio del biodiesel fue de más de 0.5 dólares el dm^{-3} en el 2001, comparado con 0.35 dólares del diesel de petróleo (Zhang *et al.*, 2003).

En la tabla II, se muestra una comparación, del rendimiento de producción de varios aceites vegetales, así como, las propiedades físicas y químicas del combustible biodiesel producido a partir de los mismos (Al Zuhair, 2007).

Tabla II. Comparación entre las propiedades físicas y químicas del biodiesel producido por diferentes aceites vegetales (Al Zuhair, 2007).

Aceite vegetal utilizado	Producción (kg ha⁻¹)	Viscosidad (mm² s⁻¹)	Numero cetano	Poder calorífico inferior (MJ L⁻¹)	Punto de turbidez	Punto de encendido (°C)	Densidad (g L⁻¹) (°C)
Cacahuete	890	4.9 (37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883
Soja	375	4.5 (37.8°C)	45	33.5	1	178	0.885
Soja	375	4.0 (40°C)	45.7-56	32.7	-	-	0.880 (15°C)
Palma	4000	5.7 (37.8°C)	62	33-5	13	164	0.880
Palma	4000	4.3-4.5 (40°C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877 (15°C)
Girasol	655	4.6 (37.8°C)	49	33.5	1	83	0.860
Colza	1000	4.2 (40°C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882 (15°C)
Colza usado	-	9.48 (30°C)	53	36.7	-	192	0.885
Aceite de maíz usado	-	6.23(30°C)	63.9	42.3	-	166	0.894

Por otro lado, y de manera alternativa a los cultivos terrestres, existe cada vez mayor interés para la producción de biodiesel basado en el aceite de algas, sin embargo, lo deseable al momento es encontrar una especie de alga o microalga que produzca una cantidad de aceite alta, que permita a su vez minimizar los costos de producción, y que muestre un crecimiento rápido. A manera de estrategia se pretende también aumentar la producción de aceite de microalgas identificando la enzima que regula la producción de lípidos y aumentando su actividad a través de la ingeniería genética (Palligarnai *et al.*, 2008).

Según Weldy y Huesemann, la producción de lípidos de microalgas y su correspondiente producción de biodiesel ha sido estudiada desde 1970, pero la producción a gran escala ha permanecido económicamente inviable debido al gran costo que genera mantener condiciones estériles requeridas para el crecimiento de muchas especies de microalgas. Es por ello, que si se desea hacer crecer microalgas para obtener niveles de aceite altos, es necesario el uso de especies que puedan tolerar condiciones extremas, y por consiguiente crezcan en un estanque abierto (Vasudevan y Briggs, 2008).

Hasta el momento, solo se ha encontrado la capacidad de crecer en estanques abiertos no estériles, de tres taxas: *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* y *Chlorella* (Jimenez *et al.*, 2003), ya que estas especies crecen bajo condiciones extremas, se puede evitar la contaminación por parásitos y se puede lograr obtener una máxima producción. (Huntley y Redalje, 2006). Tornabene, en 1980 reporto que el contenido de lípidos de *Dunaliella salina*, se encuentra entre el 45 y 55% de su peso total. Weldy y Huesemann, por su parte, encontraron que el contenido de lípidos de *Dunaliella salina* oscila entre el 16 y 44% de su peso, obteniendo una máxima producción de lípidos de 450 mg lípidos L⁻¹, y una producción diaria máxima de 46 mg lípidos L⁻¹.

II.4 Reacción de transesterificación.

La transesterificación es la forma más común de producir biodiesel, se refiere a una reacción química catalizada, la cual, involucra la participación de un aceite vegetal y un alcohol para producir ácidos grasos de metil ésteres (es decir, biodiesel) y glicerol (Al-Zuhair, 2007).

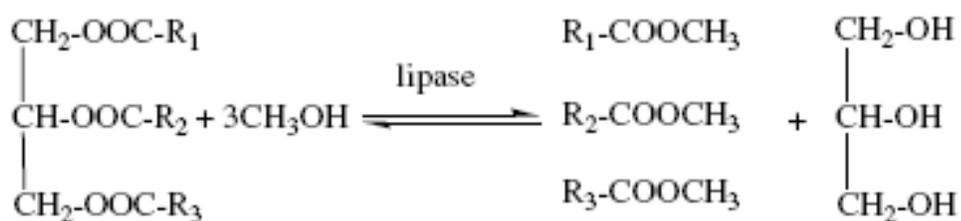


Figura 2. Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel con metanol (Chen *et al.*, 2008)

Kreutzer (1984) demostró que en un proceso comercial de transesterificación mediante catálisis alcalina, se producen metil ésteres a una escala industrial, a presión (90 bar) y temperatura (240°C) altas. Sin embargo, la gran energía consumida, que incrementa significativamente el costo del equipamiento, y los problemas de seguridad, relacionados con la misma, hacen que se dificulte este proceso. La limitación más importante de la catálisis alcalina es su sensibilidad al contenido de agua y ácidos grasos libres de la materia prima. La presencia de agua puede causar saponificación bajo condiciones alcalinas, y los ácidos grasos libres pueden reaccionar con la catálisis alcalina produciendo jabones (Liu, 1994; Basu *et al.*, 1996).

La saponificación no solo consume la catálisis alcalina, sino que también los jabones resultantes pueden causar la formación de emulsiones, lo cual genera dificultades en la recuperación y purificación del biodiesel. Así, el aceite vegetal deshidratado con menos del 0.5 % de ácidos grasos libres, un catalizador alcalino anhídrido y un alcohol anhídrido, son necesarios para una viable comercialización del sistema de catálisis alcalina (Freedman *et al.*, 1986; Jeromin *et al.*, 1987). Estos requerimientos provocan una significativa limitación para el uso de materias primas a bajo costo (Lepper y Friesenhagen, 1986; Watanabe, 2001).

Por otro lado, la transesterificación mediante catálisis ácida ha sido ignorada principalmente por su velocidad lenta de reacción. Freedman y otros (1986) investigaron la

transesterificación del aceite de soja con metanol utilizando ácido sulfúrico al 1%; y encontraron que a 65°C y a un radio molar de 30:1, metanol y aceite tomo 69 horas obtener más del 90 % de conversión del aceite a metil ésteres.

Comparado los métodos químicos de catálisis alcalina o ácida, con la utilización de enzimas (lipasas) para la catálisis en la producción de biodiesel, estas últimas tienen un gran potencial porque no requieren operaciones complejas para la recuperación del glicerol, y para la eliminación de catalizadores. Las investigaciones extensivas han conducido a estudiar lipasas inmovilizadas, mediante metanolisis para la producción de biodiesel; debido a su fácil recuperación, reutilización, estabilidad, y tolerancia a solventes (Köse *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2005).

II.5 Lipasas.

Las lipasas son enzimas que catalizan *in vivo* la hidrólisis de triacilglicéridos, *in vitro* pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de una gran variedad de ésteres y la resolución de mezclas racémicas con una selectividad alta (Palomo, 2004). La habilidad de catalizar la síntesis de ésteres, lo hacen por medio de transesterificación e interesterificación (Sharma *et al.*, 2001; Lutz, 2004). Dichas enzimas, al ser hidrolasas actúan sobre el grupo carboxil de los enlaces éster presentes en los acylglicerol para liberar ácidos grasos y glicerol (Jaeger *et al.*, 1999)

A las lipasas se les considera un grupo importante de enzimas, relevantes biotecnológicamente con una inmensa aplicación en alimentos, detergentes e industrias farmacéuticas (Guvipta *et al.*, 2004). La demanda industrial de lipasas activas con una apropiada especificidad y estabilidad al pH, temperatura, fuerza iónica y solventes orgánicos continúan estimulando la búsqueda para las nuevas fuentes de las mismas (Lee y Rhee, 1993). Sin duda, hay un aumento constante en la necesidad de identificar, caracterizar y producir lipasas de una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas con especial énfasis en biotransformaciones selectivas (Jaeger *et al.*, 1999).

Las enzimas lipasas están presentes en todos los tipos de organismos vivos, en los eucariontes pueden estar confinadas dentro de un organelo (ejem. lisosoma) o pueden ser encontradas en espacios fuera de la célula y juegan roles en el metabolismo, absorción y transporte de lípidos. Las enzimas bacterianas pueden ser también intracelulares o pueden ser secretadas para degradar sustratos lipídicos presentes en el ambiente (Polaina y MacCabe, 2007). Los microorganismos representan una fuente excelente de enzimas debido a su gran diversidad bioquímica (Godfrey y West, 1996) y se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias, levaduras y hongos (Mahadik *et al.*, 2002; Pandey, 2003). Principalmente las lipasas de bacterias y de hongos tienen un gran potencial como biocatalizadores industriales ya que generalmente son fáciles de producir por fermentación y fáciles de extraer de los medios de cultivo (Lotti y Alberghina, 2007).

Actualmente ya se han encontrado lipasas provenientes de fuentes microbianas y aun falta por explorar una gran diversidad de microorganismos que permita obtener enzimas mejoradas. Las lipasas bacterianas son en su mayoría extracelulares y algunos géneros bacterianos importantes productores de lipasas incluyen a *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (Jeager *et al.*, 1999) y *Bacillus* (Lesuisse, 1993; Khyami-Horani, 1996; Jeager *et al.*, 1999; Nthangenia *et al.*, 2001). Bradoo (1999) por su parte, señaló a tres especies de *Bacillus* como potenciales productores de lipasas termotolerantes: *B. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, y *B.licheniformis*.

Así mismo, se han purificado y extraído lipasas que se han utilizado en la producción de biodiesel solo a nivel laboratorio (Watanabe *et al.*, 2001; Iso *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2004), la tabla III muestra algunas de estas enzimas; la lipasa B de *C. antarctica*, inmovilizada en resina de nombre comercial Novozym 435, es la enzima más utilizada para la elaboración de biodiesel (Iso *et al.*, 2001).

Tabla III. Lipasas utilizadas en la producción de biodiesel, fuente de aceite, alcohol, y temperatura óptima (Al-Zuhair, 2007).

Lipasa	Aceite	Alcohol	Temperatura óptima (°C)
<i>Novozime 435</i>	Soja	Metanol	
	Soja	Acetato de metilo	
	Canola	Metanol	38
	Salvado de arroz	Metanol	
	Olivo	Metanol	40
<i>R. delemar</i>	Vegetal	Metanol	
<i>R. miehei</i>	Vegetal	Metanol	
	Palma	Metanol	
<i>C. rugosa</i>	Jatrofa	Etanol	
<i>C. lipolytica</i>	Soja	Metanol	
<i>K. oxytoca</i>	Soja	Metanol	
<i>P. camemberti</i>	Soja	Metanol	
<i>P. fluorescens</i>	Soja	Metanol	
	Trioleína	1-propanol	60
	Jatrofa	Etanol	
<i>p. cepacia</i>	Soja	Metanol y Etanol	40

No obstante, a pesar del desempeño de una enzima en una reacción, éstas también presentan ciertos problemas para su utilización en procesos industriales ya que tienen baja estabilidad, su separación es complicada, su reutilización es muy limitada (Palomo, 2004) además de que la mayoría de las enzimas comerciales tienen un alto costo de producción (Castilho *et al.*, 2000). Por consiguiente, una estrategia para mejorar el desempeño de las lipasas es la inmovilización (Palomo, 2004).

La inmovilización de una enzima es un proceso en el que se le confina o localiza en un soporte, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente (Sánchez *et al.*, 2005), lo cual es esencial desde el punto de vista

económico, además mejora su desempeño al aumentar su termo-estabilidad y facilita su separación (Bornscheuer *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2005).

Las lipasas ya han sido inmovilizadas por diferentes métodos: adsorción, entrecruzamiento, unión covalente y atrapamiento físico utilizando como soporte diferentes materiales orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, la actividad y la estabilidad operacional de las lipasas dependen de varios parámetros como la fuente de la lipasa, el tipo de soporte y el protocolo de inmovilización. Dentro de las técnicas de inmovilización, la adsorción es la de mayor potencial comercial ya que los soportes utilizados en otros métodos de inmovilización presentan resistencia mínima en las mezclas reaccionantes, mientras que los soportes que se pueden utilizar para la adsorción son mecánicamente resistentes y pueden reutilizarse (Pouilloux *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2002)

Entre los polímeros de inmovilización de enzimas y en particular de lipasas se encuentra el quitosano, no solo porque su método de obtención como soporte es simple, y no tóxico, sino porque brinda propiedades físicas y químicas de interacción enzimas-soporte interesantes para llevar a cabo reacciones biológicas con alto grado de eficiencia, actividad enzimática y bajo costo (Arroyo *et al.*, 2000; Cifuentes y Rojas, 2005). El quitosano (Figura 3) es un amino polisacárido (1-4)-2-amino-2-deoxi- β -D-glucano obtenido por D-acetilación alcalina de la quitina (1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucano, polisacárido duro, inelástico y nitrogenado que se encuentra en las paredes de algunos hongos y en el exoesqueleto de artrópodos tales como insectos, escarabajos y crustáceos (Herrera, 1993).

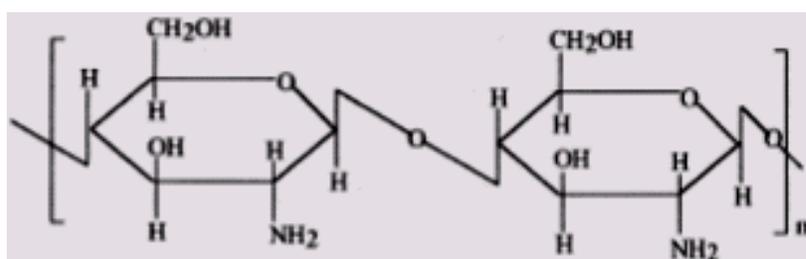


Figura 3. Estructura química del quitosano (Kumar, 2000).

II.6 Género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus* se han utilizado en la investigación básica y en la producción de productos industriales principalmente por su capacidad de generar grandes cantidades de proteínas (Doy, 1992), es por ello que se utilizan en esta investigación como productores de lipasas extracelulares para efectuar la reacción de transesterificación para la elaboración de biodiesel.

El género *Bacillus* está integrado por una gran diversidad de bacterias Gram positivas ampliamente estudiadas, poseen una morfología de barra y bajo condiciones ambientales adversas forman endosporas muy resistentes, las cuales sobreviven al calor, luz ultravioleta, desecación y solventes orgánicos (Slepecky, 1992).

Las especies de *Bacillus* son reconocidas como organismos seguros, por la Administración de Alimentos y Drogas del Departamento de Salud de los Estados Unidos (FDA) (Schallmeyer *et al.*, 2004), la mayoría de las especies no son nocivas para los mamíferos, incluyendo a los seres humanos, y son comercialmente importantes como productores de una gran y diversa cantidad de metabolitos secundarios (antibióticos, bioinsecticidas, productos de química fina y enzimas) (Ferrari *et al.*, 1993; Godfrey y West, 1996; Olmos 2003; Ochoa, 2005), y además crecen eficientemente con requerimientos bajos de fuentes de carbono y nitrógeno (Sonnenschein *et al.*, 1993).

Las características de determinadas cepas de *Bacillus* que producen y secretan cantidades grandes de enzimas extracelulares (20-25g L⁻¹) las ha colocado entre los productores más importantes de enzimas industriales. Así mismo, la habilidad de especies diferentes de éste género de fermentar en amplios rangos de pH que van del ácido, neutro, y alcalino, combinado con la presencia de algunas especies termófilas, ha permitido el desarrollo de una gran variedad de productos enzimáticos nuevos, comerciales, desarrollados a temperaturas y pH óptimos de actividad, y estabilidad para hacer frente a una variedad de aplicaciones específicas (Schallmeyer *et al.*, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Una de las necesidades que enfrenta nuestro planeta es el desarrollo de biocombustibles alternativos a los combustibles derivados de petróleo que generen reducciones significativas en la emanación de óxidos de carbono y que resulte favorable ante los problemas de contaminación atmosférica, es por ello que ha ido cobrando cada vez más importancia el uso y la producción del biodiesel; por lo cual en esta investigación se plantea la producción de biodiesel mediante una reacción de transesterificación entre un aceite vegetal y metanol por medio de catálisis enzimática, utilizando para ello lipasas seleccionadas del género de bacterias *Bacillus*, a quien se le considera un importante productor de enzimas industriales; y que conlleve a superar los problemas de fabricación de éste biocombustible por medio de catálisis química la cual resulta contaminante.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Llevar a cabo la reacción de transesterificación entre un aceite vegetal y metanol para la producción de biodiesel, mediante catálisis enzimática utilizando lipasas pertenecientes al género *Bacillus*; así como comparar el porcentaje de conversión de triglicéridos a metil ésteres, entre la transesterificación por catálisis química y enzimática.

IV. 2 Objetivos particulares

- ✚ Identificar y seleccionar cepas del genero *Bacillus* productoras de lipasas extracelulares.
- ✚ Determinar la temperatura y el pH óptimos, para la actividad enzimática de las lipasas seleccionadas.
- ✚ Producir biodiesel mediante transesterificación química de aceite de maíz y metanol, con hidróxido de sodio.
- ✚ Determinar si las lipasas seleccionadas realizan la transesterificación para la producción de biodiesel, y comparar el porcentaje de conversión obtenido con el de la transesterificación química.
- ✚ Comparar las propiedades del biodiesel químico y enzimático producido en el laboratorio, como son: la densidad, viscosidad y punto de escurrimiento con las propiedades físico- químicas estándares establecidas para biodiesel según el C.E.N, Norma EN14214.
- ✚ Evaluar la factibilidad de generar biomasa lipídica a partir de microalgas del género *Dunaliella*.

V. MATERIAL Y MÉTODO

V.1 Origen y selección de cepas de *Bacillus spp* productoras de lipasas.

Organismo

Las cepas del género *Bacillus* analizadas y *Bacillus subtilis* BB80, fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular del departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Los organismos se mantuvieron en refrigeración a 4°C en tubos eppendorf con medio Luria-Bertrani (LB) y glicerol, y se activaron previas a su selección mediante su sembrado en placas de agar con medio LB, incubadas a 37 ° C por 12 horas.

Condiciones de crecimiento

Las cepas productoras de lipasas se seleccionaron según el método de Kouker y Jaeger, (1986) modificado, mediante su crecimiento en placas de agar con aceite de maíz comercial al 25 % (p/v) y una solución de rodamina B al 0.001% (p/v). El medio de selección utilizado se denomina medio solido luminoso (MSL), sus componentes por litro de agua destilada se encuentran en la tabla siguiente.

Tabla IV. Composición del medio luminoso (MSL- solido, MLL-liquido)

COMPONENTE	Cant/ Lt.
Amortiguador Tris-HCl 1M (pH 7.5)	50 ml
Glicerol	3 ml
Cloruro de sodio (NaCl)	30g
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	5 g
Extracto de levadura	5g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	1g
Triptona	5g
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	3.9g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2.1g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1g
Cloruro de potasio (KCl)	0.75g
Agar	20 g

Las cepas productoras de lipasas se seleccionaron después de su incubación durante 72 horas a 37 ° C mediante la detección de halos fluorescentes formados en torno a sus colonias (causada por la hidrólisis del medio luminoso) los cuales se observaron tras la irradiación de las placas con luz UV a 350 nm, y se determinó la actividad de lipasa relacionando linealmente la actividad con el diámetro del halo fluorescente medido en centímetros. Las bacterias no productoras de lipasas, acumulan la Rodamina B y forman colonias de color rosa pero no muestran fluorescencia bajo irradiación con luz UV.

A manera de control, con el fin de inhibir la producción de proteasas, y corroborar la producción de lipasas, se sembraron las cepas seleccionadas en cajas de medio luminoso con una solución de PMSF 100 mM (inhibidor de proteasas) en etanol, bajo las mismas condiciones de incubación y se observó si ocurría la formación de halos fluorescentes.

V. 1.1 Determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad de las lipasas.

Se determinó la temperatura óptima de actividad de las lipasas producidas por las cepas seleccionadas mediante su sembrado en placas con medio luminoso con tres replicas, se incubaron a gradiente de temperatura de 25, 30, 37 y 40 °C por 72 horas, y se seleccionó como temperatura óptima aquella en la cual el diámetro (medido en centímetros) de fluorescencia formado en torno a las colonias bacterianas fue mayor. Una vez determinada la temperatura óptima se realizó un ensayo a gradiente de pH sembrando las cepas seleccionadas en placas con medio luminoso con tres replicas a pH 5, 6, 7, 8 y 9, se incubaron por 72 horas, y de igual manera se seleccionó como pH óptimo aquel en el que se obtuvo un diámetro de fluorescencia mayor.

V.2 Caracterización fenotípica y molecular a nivel de género de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.

V. 2.1 Caracterización fenotípica

Las características fenotípicas de las cepas bacterianas se observaron mediante tinción Gram (ver anexo I), la cual considera como bacteria gran positiva a las bacterias que se visualizan de color

violeta, y bacteria gran negativa a las que se visualizan de color rosa. Así mismo, se observó la forma de las bacterias, y si generan o no, esporas mediante tinción de espora con verde de malaquita (anexo II), donde la espora se tiñe de color verde.

V. 2.2 Caracterización molecular a nivel de género

Para la caracterización molecular, primeramente se realizó la extracción y purificación de ADN cromosomal de las cepas bacterianas seleccionadas como productoras de lipasas mediante el método de fenol-cloroformo estandarizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular del CICESE (anexo III). Las muestras de cDNA obtenidas se almacenaron en tubos eppendorf a -20°C . Para verificar que se extrajo cDNA, se preparó un gel de agarosa al 1.2%, se cargaron las muestras y se corrieron mediante electroforesis por 30 minutos a 75 volts; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observaron las bandas formadas (indican la presencia de cDNA), bajo luz UV.

Una vez confirmada la extracción y purificación de cDNA de las cepas seleccionadas, se realizó una amplificación por medio de PCR, de las muestras, así como, del cDNA de la cepa BB80 $\Delta npr his A gly B$ perteneciente a *Bacillus subtilis*, utilizada como control. Para ello se necesitó de oligonucleótidos específicos para género de *Bacillus*, el oligonucleótido BSQ1 5' y el oligonucleótido *Bacillus* 3', para amplificar fragmentos de tamaño esperado (600 pb), bajo las siguientes condiciones: 2 μl de DNA cromosomal, 1 μl de *Taq* polimerasa, 1 μl de oligo 5', 1 μl de oligo 3', 1 μl de dNTPs, 5 μl de buffer 10x, 1.5 μl de MgCl_2 y 37.5 μl de H_2O estéril. El protocolo usado en el termociclador marca BIO RAD, consistió de 3 programas; el primero de 1 ciclo a 95°C por 5 min.; el segundo programa fue de 25 ciclos, divididos en 3 segmentos, el segmento 1 a 95°C por 1 minuto para desnaturalizar el ADN, el segmento 2 a 55°C por 1 minuto para la hibridación del ADN con los oligonucleótidos y el segmento 3 a 72°C por 2 minutos para la polimerización de las cadenas; y el tercer programa (una extensión) de 1 ciclo a 72°C por 2 minutos. Los productos obtenidos de la amplificación se almacenaron a 4°C , y se corrieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %, se observaron las bandas formadas en el gel bajo luz UV y se determinó si se obtuvo la amplificación de fragmentos de tamaño esperado (600 pb) tomando como referencia la cepa control (BB80 $\Delta npr his A gly B$), para corroborar la identificación a nivel de género de las cepas seleccionadas como productoras de lipasas.

V. 2.3 Crecimiento celular

Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas para determinar la tasa y las fases de crecimiento. Dado que las enzimas bacterianas tienen una producción lenta en la fase exponencial pero se acelera su secreción antes de llegar a la fase estacionaria continuando cuando el organismo ha dejado de crecer y al inicio de la esporulación (López Murguía, 2002) se determinó el tiempo de la fase estacionaria donde se presentan los tiempos T_2 y T_4 , en las cuales, se concentra la máxima producción y secreción de enzimas hidrolíticas al medio. Las cepas se cultivaron en matraces de 250 ml, en 30 ml de medio PL, a la temperatura óptima (previamente determinada), y 250 rpm. Se tomaron muestras a cada hora de iniciado el cultivo, y se leyeron bajo un factor de dilución de 10 (100 μ l de muestra y 900 μ l de medio) en un espectrofotómetro marca Hach, modelo DR 2800, a 600 nm. Se graficaron los valores obtenidos y se determinaron las fases del crecimiento.

V. 3 Producción y extracción de lipasas

Las cepas de *Bacillus* seleccionadas se cultivaron en frascos Erlenmeyer de 250 ml, con 100ml de medio, en un medio específico para la producción de lipasas denominado medio PL que contiene los siguientes componentes: 20 g L^{-1} glucosa, 10 mL L^{-1} aceite de maíz, 10 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} extracto de levadura, 10 mL L^{-1} Tween 80, 5 g L^{-1} CH_3COONa , 5 g L^{-1} NaCl , 2 g L^{-1} KCl , 1 g L^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g L^{-1} $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.1 g L^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; el medio se ajustó inicialmente a pH 7 utilizando NH_4OH 1 mol L^{-1} , y se esterilizó.

El medio de producción se inoculó con 5 % (v/v) del cultivo en la fase media-exponencial de la cepa de *Bacillus* de interés. Y se incubó con una agitación de 250 rpm a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa, hasta alcanzar el tiempo T_4 de la fase estacionaria (determinado en la curva de crecimiento previamente realizada). Se obtuvo el sobrenadante del cultivo libre de células por medio de centrifugación a 3000 rpm y se almacenó a -20°C .

La extracción de lipasas se realizó mediante su concentración por ultrafiltración en un centricon (Centrifugal Filter Devices) con membrana de 10,000 NMWL (límite de peso molecular nominal en daltones), se añadió 1 ml del sobrenadante del cultivo celular y se centrifugó a 3000 rpm durante 60 minutos, divididos en dos series de 30 minutos. Los componentes del medio de

cultivo presentes en el sobrenadante atraviesan la membrana permitiendo la concentración de las lipasas de *Bacillus* que presentan un peso de menos de 20 kDa (Lotti y Alberghina, 2007) por arriba de la membrana; las enzimas concentradas por ultrafiltración se recuperaron y almacenaron en tubos de 1 ml a -20°C .

A manera de control y con el fin de corroborar la extracción y la actividad de lipasas se sembró en cajas de agar con aceite de maíz comercial al 25 % (p/v), solución de rodamina B al 0.001% (p/v), y sin nutrientes (debido a que se siembra únicamente enzima, y no una cepa bacteriana la cual requiere de nutrientes para su crecimiento), $5\mu\text{l}$ de el concentrado de enzimas obtenido de cada cepa seleccionada y se incubo a la temperatura optima de actividad de lipasas (previamente establecida), por 24 horas. La extracción y actividad de lipasas se visualizo a través de la formación de fluorescencia (debido a la hidrólisis del medio), bajo luz UV.

V.4 Inmovilización enzimática de lipasas

La inmovilización de las lipasas extraídas de las cepas de *Bacillus* seleccionadas se realizo en base al método de inmovilización descrito por Fierro (2004), para el cual se utilizó quitosano obtenido a partir del exoesqueleto de camarón, con un grado de acetilación de 10.2%, humedad residual del 4.0% y viscosidad intrínseca de 6.49 dl g^{-1} .

Se preparó una solución de quitosano al 2% en ácido acético al 1% con pH ajustado a 4.0, y se tamizó utilizando una malla con una abertura de $400\mu\text{m}$ para eliminar las impurezas que contiene el quitosano. Las lipasas extraídas se resuspendieron en la solución de quitosano mezclándolas con una espátula, y una vez obtenida una mezcla homogénea, se coloco en una bureta. El extremo superior de la bureta se conectó a una bomba de aire para que la solución de quitosano fluyera más rápido. A la punta de la bureta se le colocó una punta desechable de $200\mu\text{l}$ para micropipeta, con la finalidad de disminuir el diámetro de salida y obtener perlas más pequeñas.

La mezcla de quitosano con lipasas se vertió por goteo en una solución de NaOH 0.1 N a pH 12.0 colocada en un vaso de precipitados de 250 ml con 100 ml de hidróxido de sodio y se mantuvo a una agitación constante con una plancha de agitación y un agitador magnético. Se dejo gotear la mezcla quitosano-lipasas durante dos minutos una vez cerrada la llave, las perlas se dejaron en agitación con la solución de NaOH durante tres minutos más. Este proceso se

repitió varias veces hasta terminar todo el volumen de la mezcla quitosano-lipasas colocada en la bureta. Las lipasas se recolectaron con un colador y se lavaron varias veces con agua destilada, hasta que el agua tuviera un pH neutro y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Finalmente, las perlas que contienen a las lipasas inmovilizadas se sembraron en placas de agar con aceite de maíz comercial al 25 % (p/v) y una solución de rodamina B al 0.001% (p/v), sin nutrientes; se incubaron por 24 horas y se observó bajo luz UV la formación de fluorescencia. La presencia de fluorescencia en torno a las perlas ocurre debido a la hidrólisis del sustrato y permite corroborar la presencia y actividad de lipasas en las mismas.

V.5 Cultivo de cepas de microalgas del género *Dunaliella*.

Una vez evaluado el potencial de *Bacillus* para la producción de lipasas se desarrolló otra estrategia la cual consistió en evaluar la capacidad de cuatro cepas de *Dunaliella* (obtenidas del cepario del laboratorio de microbiología molecular del CICESE) para generar biomasa lipídica. Para ello se cultivaron las cepas CBO, DUX1, CCAP 19/30 y DUT2 de *Dunaliella spp* en medio Guillard f/2 (1968), descrito por Alvarez (2003) con agua de mar 1M, en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de medio a temperatura ambiente (25 °C) e iluminadas por lámparas fluorescentes con fotoperiodo de 14-10 horas luz/obscuridad.

V. 5.1 Descripción morfológica

Las reservas puras se mantuvieron en tubos de ensayo de 10 ml, con 5 ml de medio de cultivo. Además, se realizó una descripción morfológica de las cepas de microalgas mediante la observación de sus células en un examen *in vivo* y fijadas con lugol, en un microscopio óptico para determinar las características generales de *Dunaliella spp*.

V. 5.2 Crecimiento celular

Se evaluó indirectamente la cantidad de biomasa producida para cada cepa, con mediciones de la densidad óptica (DO) leídas a una absorbancia de 550 nm en un espectrofotómetro marca Hach DR 2800. Se determinó la producción diaria de células y la tasa de crecimiento específica (μ), con base en la ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\log_2 (D_1/D_0)}{t_1-t_0} \quad (1)$$

Donde: μ = crecimiento específico (divisiones día⁻¹).

D_1 = densidad óptica al tiempo final

D_0 = densidad óptica la tiempo inicial

t_1 = tiempo final

t_0 = tiempo inicial

En base a la capacidad de crecimiento y reproducción de las cepas cultivadas, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron crecimiento mayor y se escalo su cultivo a matraces de 1L con 400 ml de medio, seguido a garrafrones de 20 L con 4.5 L de medio posteriormente se llevo a 15 L, y finalmente se traspaso a columnas abiertas de 200 L.

V.6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel

V. 6.1 Reacción química

La reacción de transesterificación entre aceite de maíz comercial y metanol mediante catálisis química se realizó con el fin de elaborar biodiesel y utilizar al mismo como estándar de biodiesel para el análisis en HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Definición), así como, para comparar el porcentaje de conversión de triglicéridos a metil ésteres entre la transesterificación mediante éste proceso químico con la transesterificación por catálisis enzimática.

Para efectuar la reacción se mezclo en un vaso de 50 ml, 10 ml de alcohol isopropílico con 1ml de aceite de maíz comercial, se agito y se le añadieron dos gotas de fenolftaleína. Se utilizo una solución de 1g de NaOH en 1L de agua destilada para realizarse una valoración de la mezcla anterior. En la valoración, se obtuvo el número de ml de solución de NaOH necesarios para

alcanzar un pH de entre 8 y 9 y a esa cantidad se le sumaron 3,5 gr de NaOH por cada litro de aceite que se vaya a transesterificar. Por separado, se realizó una solución de NaOH y metanol (metóxido de sodio); por cada litro de aceite a procesar se mezclaron 200 ml de metanol con la cantidad de NaOH obtenido en la valoración anterior, y se dejó reaccionar por 24 horas.

El aceite de maíz empleado en la reacción, se calentó hasta alcanzar una temperatura de 45°C, se le vertió el metóxido de sodio y se dejó reaccionar con agitación durante 60 minutos. Una vez completada la reacción se centrifugó la mezcla por 10 min para separar los productos formados (glicerina semilíquida de color marrón oscuro concentrada en el fondo del tubo y biodiesel de color miel concentrado arriba), se recuperaron por decantación y se obtuvieron muestras para su análisis mediante HPLC.

V.6.2 Reacción enzimática

Los ensayos de reacciones enzimáticas a diferentes temperaturas (30, 35, 40 y 50 °C) y con diferente porcentaje de metanol (10, 20 y 30 %, aceite/alcohol v/v) se realizaron con el propósito de encontrar si las lipasas (de las cepas seleccionadas como productoras de lipasas) llevan a cabo la reacción de transesterificación, y siendo así, determinar la temperatura y cantidad de metanol óptimas en la cual se forma biodiesel.

Los ensayos de reacciones enzimáticas se efectuaron en frascos de vidrio de 80 ml con tapa. Las temperaturas y el porcentaje de metanol utilizados en cada ensayo se muestran en la Tabla V; se utilizaron en cada reacción 6 ml de aceite de maíz comercial con 500 µl de lipasas extraídas de cada cepa de *Bacillus* seleccionada como productora de lipasas, y se incubaron con una agitación de 200 rpm durante una hora. Transcurrida la incubación se añadió metanol a la mezcla de aceite y enzima manteniendo las mismas condiciones de incubación por un tiempo de 2 horas. Los productos formados en la reacción se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos, se separaron por decantación y se almacenaron en tubos eppendorf a 4 °C para su análisis en HPLC, donde se determinó con qué lipasas (es decir de qué cepa) y bajo qué condiciones se formó biodiesel.

Tabla V. Numero de ensayo, porcentaje de metanol y temperatura utilizada en los ensayos de reacción de transesterificación enzimática con lipasas de *Bacillus* spp.

Numero de ensayo	% de metanol (metanol/aceite, v/v)	Temperatura (°C)
1	10	30
2	20	30
3	30	30
4	10	35
5	20	35
6	30	35
7	10	40
8	20	40
9	30	40
10	10	50
11	20	50
12	30	50

V.7 Análisis de los productos formados en la transesterificación química y enzimática por HPLC

La formación de metil ésteres y subproductos presentes en la reacción de transesterificación química y enzimática como los son ácidos grasos libres y glicéridos, fue determinada mediante análisis en HPLC fase reversa, con detector de UV a 205 nm. Para el análisis se utilizó una columna Zorbax 300 SB C18 4.6 x 150 mm; la fase móvil se baso en el método descrito por Holcpek (1999) el cual consiste de dos reservorios: el reservorio A de metanol puro y el reservorio B, que es una mezcla de 2-propanol-hexano (5:4 v/v); a un gradiente que inicia en 100% A hacia 50% A +50% B a los 15 minutos, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Todas las muestras se disolvieron en 2-propanol-hexano (5:4 v/v), a una disolución de 1:1000. La inyección de muestra fue de 20 µl.

No se utilizaron estándares analíticos para la identificación de los compuestos formados, por lo tanto la detección se determinó en base a la literatura (Holcpek, 1999) donde se señala que el orden de aparición de los componentes es ME < GL < AGs.

V.8 Comparación de características físico-químicas de los metil ésteres obtenidos, con las del Biodiesel Estándar.

Al biodiesel obtenido en la catálisis química y enzimática se le determinó su densidad a 15 °C (el biodiesel se enfrió a una temperatura de 15 °C, se midió su masa y volumen, y se determinó la densidad al dividir ambos valores con unidades de g cm^{-3}), la viscosidad a 40 °C (el biodiesel se calentó a alcanzar una temperatura de 40 °C y se midió su viscosidad por medio de un viscosímetro de Ostwald); y el punto de escurrimiento, el cual se refiere a la temperatura a la cual el biodiesel deja de fluir y toma el estado sólido en condiciones de presión ambiente (para esto el biodiesel se enfrió a baño maría en una solución 10 M de NaCl a temperaturas de entre -15 y -20 °C y se determinó la temperatura a la cual el biodiesel cambió de estado líquido a sólido). Los valores obtenidos se compararon con los estándares establecidos por el C.E.N (Comité Europeo de Normalización), reflejados en la Norma EN14214, aplicables al Biodiesel y se corroboró si el biodiesel producido en el laboratorio cumplía con las características deseadas.

VI. RESULTADOS

VI.1 Origen y selección de cepas de *Bacillus spp* productoras de lipasas.

Para la selección de cepas del género *Bacillus* productoras de lipasas se estudiaron las cepas 1, 2, 4, 5, 9a, 10a, 12, 14, 20b, 21a, 21b, 23, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 40, 42, 44, 46, 49, 96, 1R, 4R, LM1, LM2, LM3, LM4, LM5, LM6, LM7, LM8, A, B, D, E, F, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, y T sembradas en placas de agar con medio luminoso (MSL); y se seleccionaron las cepas que mostraron producción y secreción de lipasas extracelulares, visibles mediante la formación de un halo fluorescente en torno a sus colonias bacterianas (debido a la hidrólisis del sustrato lipídico). Las cepas seleccionadas fueron las cepas S, T, 36 y 1R las cuales generaron un halo fluorescente de 0.5 cm (cepas S y T), 0.6 cm (cepa 36) y 0.8 cm (cepa 1R), tras 72 horas de incubación a 30°C, lo que indica una producción y actividad de lipasas extracelulares (Fig. 4). La cepa 1R mostro una producción de lipasas mayor, (estimado mediante el diámetro del halo fluorescente), que presento un diámetro de 0.8 cm y que fue, por lo tanto, mayor a las cepas S, T y 36.

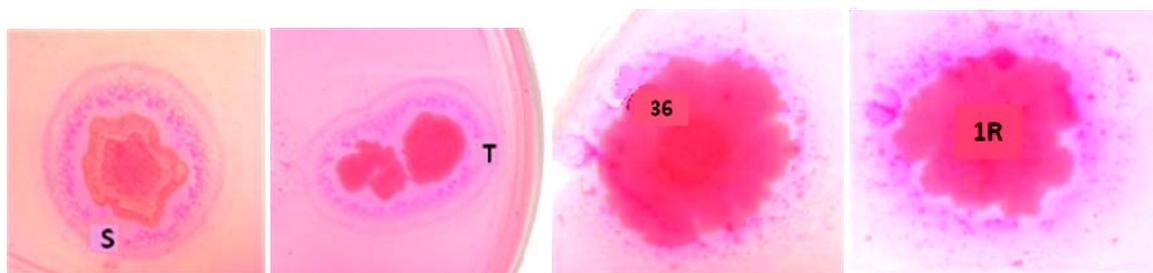


Figura 4. Producción de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R en MSL. Se observa la presencia de un halo fluorescente en torno a las cepas S, T, 36 y 1R como indicador de lipasas, tras 72 horas de incubación a 30°C.

A manera de control, se sembraron las cepas seleccionadas (S, T, 36 y 1R), en medio luminoso (MSL) con inhibidor de proteasas, con el fin de inhibir la producción de proteasas y corroborar la producción de lipasas, ya que en algunos casos puede confundirse la expresión de una enzima por otra. Las cepas se incubaron a 30°C por 72 h y se observó la formación de halos fluorescentes en torno a las mismas, lo que confirma la producción de lipasas por parte de dichas cepas (Fig.5), el diámetro de los halos fluorescentes visibles fue el mismo obtenido en los ensayos anteriores (sin el inhibidor), lo cual indica que este no causó efecto sobre la producción y actividad de las lipasas extracelulares.

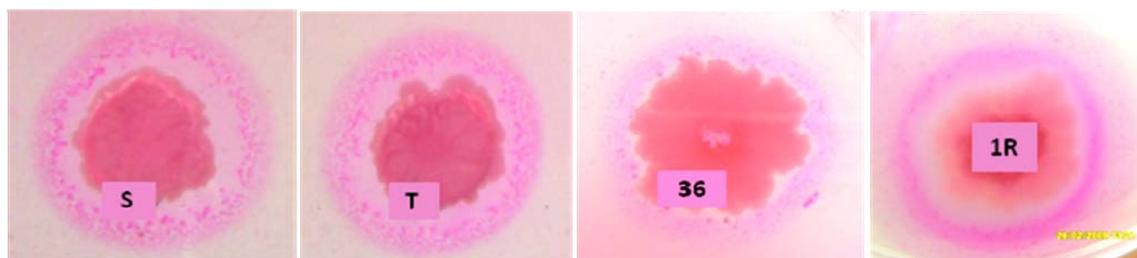


Figura 5. Producción de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R en MSL con inhibidor de proteasas. Se observa la presencia de un halo fluorescente en torno a las cepas S, T, 36 y 1R como indicador de lipasas, tras 72 horas de incubación a 30°C.

VI. 1.1 Determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad de las lipasas.

Se evaluó la actividad de las lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R a gradiente de temperatura (25, 30, 37 y 40 °C) y de pH (5, 6, 7, 8 y 9), para establecer las condiciones óptimas que favorezcan la actividad de las lipasas. Los resultados de actividad de lipasas (en términos del diámetro del halo fluorescente) de las cuatro cepas de *Bacillus* a diferentes temperaturas se reportan en la tabla VI, donde se observa que la mayor actividad de lipasas de las cuatro cepa estudiadas y por lo tanto mayor diámetro de halo fluorescente se presentó a los 30 °C, siendo la cepa 1R quien mostró mayor actividad de lipasas (diámetro de 0.8 cm) seguida por la cepa 36 (diámetro de 0.6 cm).

Tabla VI. Actividad de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R sembradas en MSL a diferentes temperaturas, indicado por el diámetro del halo fluorescente en cm.

Cepa	Temperatura (°C)	Diámetro halo fluorescente (cm)	Desviación estándar
S	25	0.2	0.00
S	30	0.5	0.02
S	37	0.4	0.02
S	40	0	0.00
T	25	0.2	0.01
T	30	0.5	0.01
T	37	0.3	0.04
T	40	0	0.00
36	25	0.3	0.04
36	30	0.6	0.02
36	37	0.1	0.00
36	40	0	0.00
1R	25	0.4	0.02
1R	30	0.8	0.02
1R	37	0.1	0.00
1R	40	0	0.00

Tabla VII. Actividad de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R sembradas en MSL a diferente pH, indicado por el diámetro del halo fluorescente en cm.

Cepa	pH	Diámetro halo fluorescente (cm)	Desviación estándar
S	5	0.3	0.03
S	6	0.5	0.02
S	7	0.1	0.00
S	8	0	0.00
S	9	0	0.00
T	5	0.2	0.03
T	6	0.4	0.02
T	7	0.5	0.01
T	8	0	0.00
T	9	0	0.00
36	5	0.2	0.02
36	6	0	0.02
36	7	0.8	0.01
36	8	0.7	0.00
36	9	0.2	0.02
1R	5	0.4	0.03
1R	6	0.7	0.00
1R	7	0.8	0.00
1R	8	0.6	0.01
1R	9	0.4	0.02

En cuanto a los resultados obtenidos de actividad de lipasas a diferentes pH, éstos se presentan en la tabla VII, donde se aprecia que la mayor actividad para la cepa S se presentó a pH 6 con un diámetro del halo fluorescente de 0.5 cm, y a pH para las cepas T, 36 y 1R con 0.5, 0.8 y 0.8 cm de diámetro, respectivamente; tras 72 horas de incubación a 30 °C (temperatura óptima de actividad de lipasas).

VI. 2 Identificación fenotípica y molecular a nivel de género de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.

VI. 2.1 Caracterización fenotípica

De acuerdo a las características morfológicas de las cepas S, T, 36 y 1R, observadas mediante tinción de Gram (Fig. 6A) y tinción de spora con verde de malaquita (Fig. 6B) se distinguió que todas las cepas resultaron ser Gram positivas, con forma de bacilo y bajo condiciones ambientales adversas forman esporas, por lo tanto se deduce que pertenecen al género *Bacillus*.

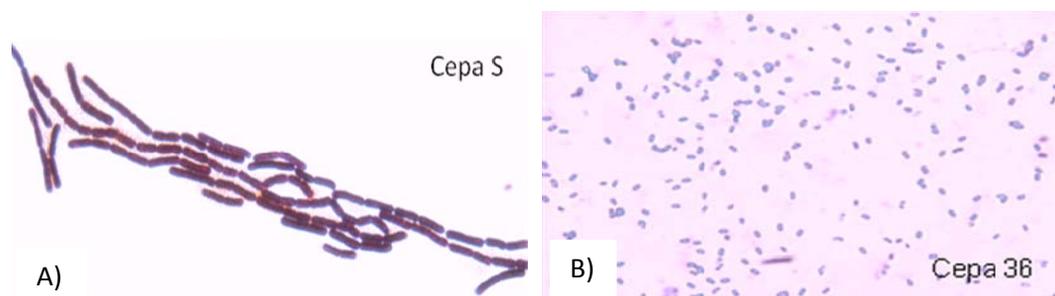


Figura 6. A) Tinción Gram de la cepa S, observada en microscopio compuesto a 100x. La cepa S muestra forma de bacilos y paredes teñidas de color violeta, es decir, Gram positiva. **B) Tinción de spora de la cepa 36, observada en microscopio compuesto a 100x.** Se observan las esporas generadas por la cepa 36, teñidas con verde de malaquita.

VI. 2.2 Caracterización molecular a nivel de género

Basados en la amplificación de fragmentos de tamaño esperado de 600 pb por PCR, se observó que el patrón de restricción práctico en la cepa BB80 $\Delta npr his A gly B$ perteneciente a *Bacillus* coincidió con el patrón de restricción presente en las cepas S, T, 36 y 1R analizadas (Fig.7), por lo tanto, se respaldó la caracterización fenotípica que determina a las cuatro cepas como parte del género *Bacillus*.

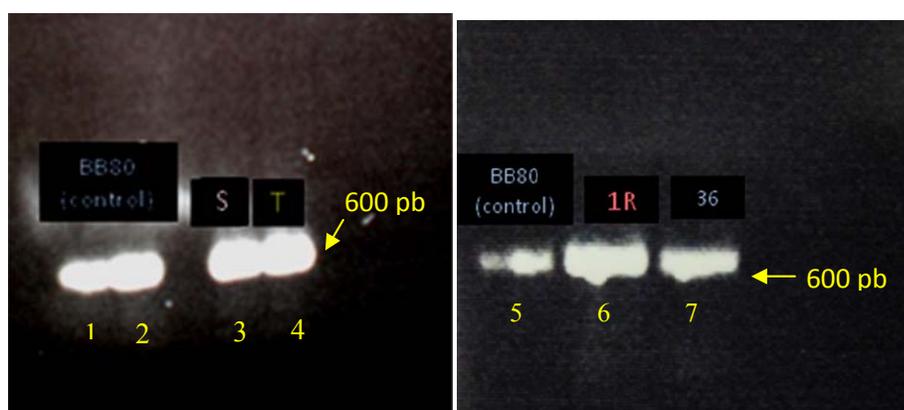


Figura 7. Identificación molecular de las cepas S, T, 1R y 36 mediante amplificación por PCR, observadas en gel de agarosa al 1.2%. Línea 1, 2 y 5. Cepa BB80 $\Delta npr his A gly B$, de *Bacillus subtilis* (control) 600pb. Líneas 3, 4, 6, y 7. Fragmentos de 600pb obtenido de las cepas S, T, 1R y 36.

VI. 2.3 Crecimiento celular

Se realizaron curvas de crecimiento con el fin de determinar el tiempo en que inicia la fase estacionaria, así como, determinar el momento en que se presentan los tiempos T_2 y T_4 (dentro de la fase estacionaria), donde se concentra la mayor producción y secreción de enzimas hidrolíticas al medio (Munguia, 2002)

Las curvas resultantes (Fig. 8) indicaron que las cepas S, T, 36 y 1R de *Bacillus* finalizaron su fase exponencial a las 4 horas de iniciado el cultivo y presentaron, consiguientemente, las fases T_2 y T_4 a las 6 y 8 horas respectivamente. Por lo tanto, se estableció el tiempo de

cultivo necesario de las cuatro cepas (determinado en horas) en el cual se presenta la fase T_4 , es de 8 horas, para así generar la producción y excreción de lipasas al medio de cultivo.

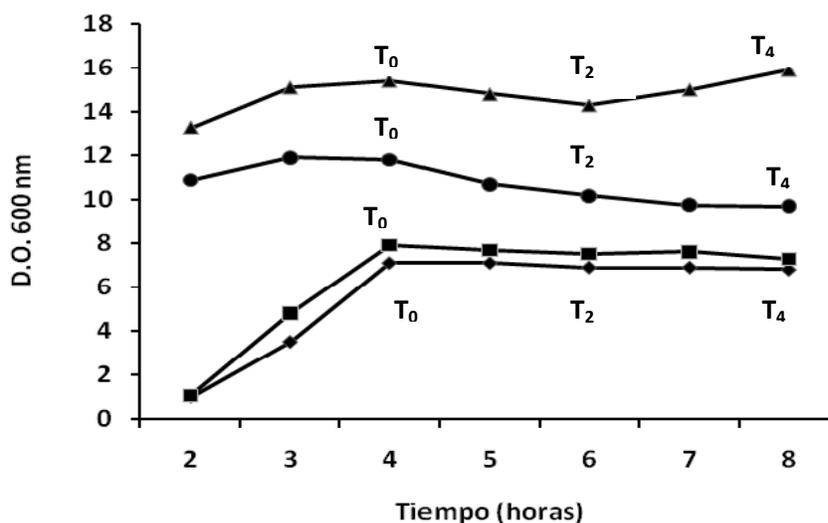


Figura 8. Curva de crecimiento de cepas de *Bacillus*, en medio PL: cepa S (◆) cepa T (■) cepa 36 (▲) y cepa 1R (●).

VI.3 Producción de lipasas

Se obtuvieron lipasas extracelulares extraídas del sobrenadante del cultivo de las cepas S, T, 36 y 1R en medio PL (específico para producción de lipasas), después de 8 horas de cultivo (en el tiempo T_4 de la fase estacionaria determinado mediante las curvas de crecimiento) a 30 °C y 250 rpm, cerciorando la extracción de lipasas mediante la degradación del sustrato lipídico en el cual se sembraron (ver metodología), indicado por la formación de fluorescencia en los puntos de inóculo tras 24 horas de incubación a 30 °C observada bajo luz UV (Fig. 9). Por lo tanto, se corrobora que se logró extraer exitosamente lipasas de las cuatro cepas seleccionadas y que estas no perdieron su actividad enzimática tras la extracción.

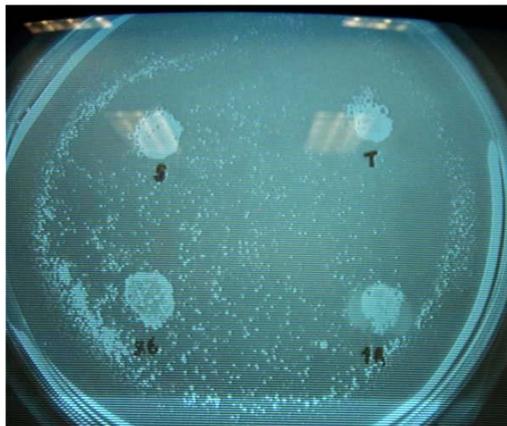


Figura 9. Lipasas extraídas de las cepas S, T, 36 y 1R de *Bacillus*, sembradas en medio agar con aceite de olivo y rodamina B. Se observa la presencia de fluorescencia en el punto de siembra de las lipasas extraídas (producto de la degradación del sustrato tras 24 horas de incubación a 30°C, con luz UV), el cual indica la presencia y actividad de lipasas.

VI. 4 Inmovilización enzimática de lipasas

Se inmovilizaron las lipasas producidas y extraídas de las cuatro cepas de *Bacillus* seleccionadas como productoras de lipasas (S, T, 36 y 1R) (Fig. 10) en perlas de quitosano; y se corroboró mediante la siembra de las perlas de quitosano en un sustrato lipídico la presencia de lipasas, así como la actividad de las mismas indicado por la formación de fluorescencia en torno a las zonas de siembra (generada por la degradación del medio lipídico) tras 24 horas de incubación; lo que valida la inmovilización y la actividad de las lipasas extraídas, sin que éstas se vean afectadas en su actividad por la inmovilización.

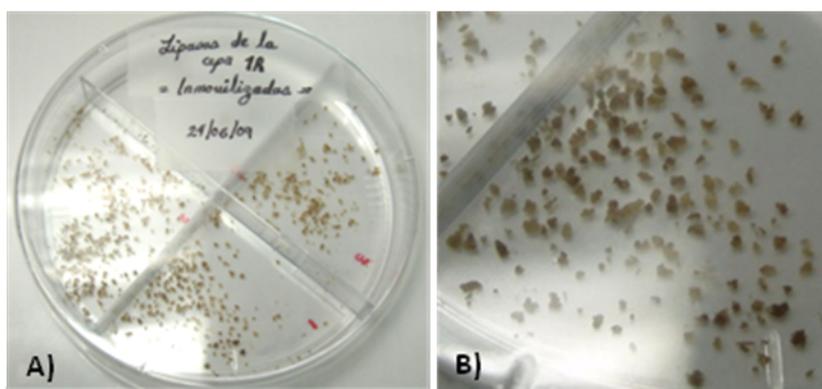


Figura 10. A) Perlas de quitosano con lipasas extracelulares inmovilizadas de la cepa 1R de *Bacillus* B) Imagen A, ampliada.

VI. 5 Cultivo de cepas de microalgas del género *Dunaliella*.

Una vez determinada la capacidad de *Bacillus spp* para generar lipasas y debido a que la producción de biodiesel se puede realizar en base al aceite de microalgas, se evaluó también el potencial de cuatro cepas de *Dunaliella* (CBO, DUT2, CCAP 19/30 y DUX1) para generar biomasa lipídica.

VI. 5.1 Descripción morfológica

Se observaron las características fenotípicas de las cepas de microalgas (CBO, CCAP 19/30, DUT 2 y DUX1) y visualizó que las cepas estudiadas presentaban las características morfológicas señaladas por Borowitzka y Siva (2007) (quienes describen las células del género *Dunaliella*), las cuales mostraron que son una especie de microalga unicelular, verde, fotosintética, piriforme (forma de pera), móvil, flagelada; con dos flagelos largos iguales insertados en el extremo anterior de la célula y que poseen un cloroplasto que ocupa la mayor parte posterior del volumen total de la célula (Fig. 11). Por lo cual, en base a la descripción de dichos autores, se confirma que las cepas estudiadas pertenecen al género *Dunaliella*.

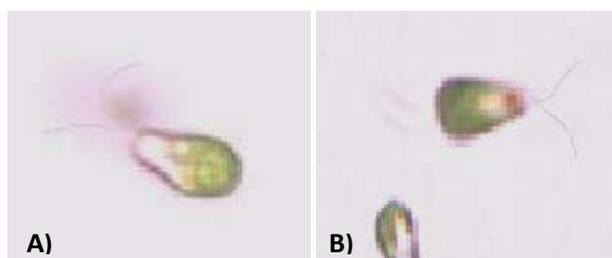


Figura 11. Características fenotípicas de *Dunaliella spp* observadas en microscopio compuesto a 40x. A) Cepa DUT2. B) Cepa CBO.

VI. 5.2 Crecimiento celular

Se evaluó el incremento en la concentración celular, la tasa de crecimiento y producción diaria de las cepas CBO, CCAP19/30, DUT2 y DUX1, sin embargo solo me muestran los resultados de los estudios preeliminares, por lo que no se describe un análisis estadístico, no obstante se recomienda aplicar dichos análisis en futuras investigaciones para determinar si hay diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de *Dunaliella* estudiadas.

VI. 5.2.1 Cepa CBO

La concentración celular de esta cepa mostró un continuo incremento a lo largo del tiempo de cultivo (Fig. 12), iniciando con una concentración celular de 0.36×10^6 células ml^{-1} hasta alcanzar una concentración de 1.78×10^6 células ml^{-1} a los 7 días. En cuanto a la tasa de crecimiento (μ), el máximo valor se presentó al segundo día de cultivo ($1.52 \text{ div. día}^{-1}$), y este descendió hasta el último con $0.02 \text{ div. día}^{-1}$. La producción diaria varió de entre 0.01 a 0.90×10^6 células ml^{-1} (Tabla VIII).

Tabla VIII. Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa CBO cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.

Tiempo (días)	Concentración (1×10^6 cel. ml^{-1})	μ (div. día^{-1})	Producción diaria (1×10^6 cel. ml^{-1})
0	0.36		
1	0.42	0.222	0.06
2	0.48	0.192	0.06
3	1.38	1.523	0.90
4	1.52	0.139	0.14
5	1.71	0.169	0.19
6	1.76	0.041	0.05
7	1.78	0.016	0.02

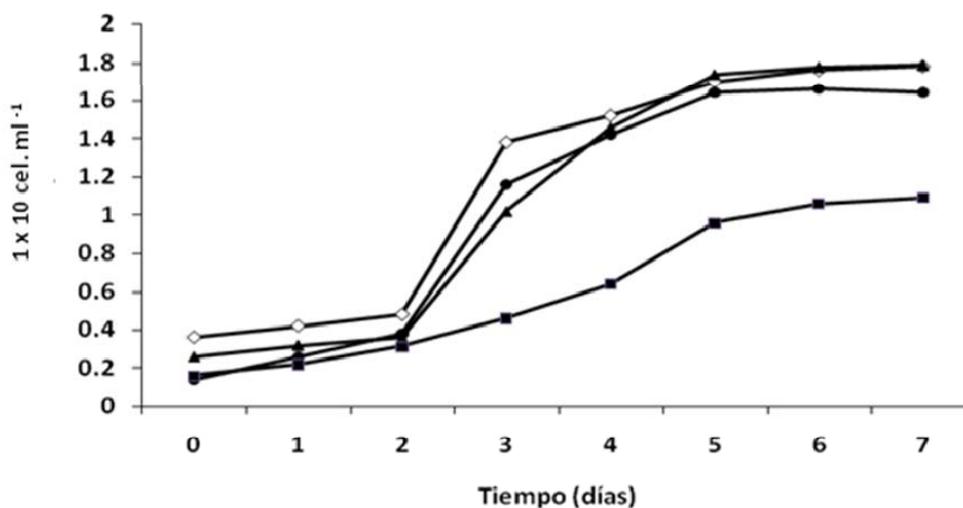


Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas de microalgas de *Dunaliella* spp, cultivadas en 100 ml de medio Guillard F/2: Cepa CBO (\diamond), cepa CCAP 19/30 (\bullet), cepa DUT2 (\blacktriangle) y cepa DUX1 (\blacksquare)

VI. 5.2.2 Cepa CCAP 19/30

Se observó que la cepa CCAP 19/30 incremento su concentración celular de 0.14 a 1.66×10^6 células ml^{-1} desde el día cero hasta el sexto día de cultivo, pero decayó en el ultimo día a 1.64×10^6 células ml^{-1} (Fig. 12). La tasa de crecimiento (μ) de esta cepa presento su valor máximo a los 3 días de iniciado su cultivo con 1.610 div. día^{-1} , mostrando un deceso al

séptimo día en donde ya no hubo división celular. La producción diaria máxima también se presentó al tercer día con 0.78×10^6 células ml^{-1} , e igual que los parámetros anteriores esta decayó al último día de cultivo (Tabla IX).

Tabla IX. Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa CCAP 19/30 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.

Tiempo (días)	Concentración (1×10^6 cel. ml^{-1})	μ (div. día $^{-1}$)	Producción diaria (1×10^6 cel. ml^{-1})
0	0.14		
1	0.26	0.893	0.12
2	0.38	0.547	0.12
3	1.16	1.610	0.78
4	1.42	0.291	0.26
5	1.64	0.207	0.22
6	1.66	0.017	0.02
7	1.64	-0.017	-0.02

VI. 5.2.3 Cepa DUT2

La cepa DUT2 presentó un continuo incremento de su densidad celular, desde el inicio hasta el término de su cultivo, con valores de 0.26 a 1.79×10^6 células ml^{-1} (Fig. 12). La tasa de crecimiento (μ), por su parte, mostro su valor máximo de divisiones por día, al tercer día de cultivo con 1.502 div. día $^{-1}$, y mostro su valor mínimo al séptimo día: La producción diaria presento sus mejores valores al tercer día con 0.66×10^6 células ml^{-1} , seguido por el cuarto día con 0.44×10^6 células ml^{-1} , el menor valor, sin embargo, se presentó al último día con 0.01×10^6 células ml^{-1} (Tabla X). Esta cepa fue la que alcanzo mayores valores de densidad celular y, por lo tanto, presento mayor crecimiento que las cepas CBO, CCAP 19/30 y DUX1.

Tabla X. Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa DUT2 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.

Tiempo (días)	Concentración (1×10^6 cel. ml^{-1})	μ (div. día^{-1})	Producción diaria (1×10^6 cel. ml^{-1})
0	0.26		
1	0.32	0.229	0.06
2	0.36	0.169	0.04
3	1.02	1.502	0.66
4	1.46	0.517	0.44
5	1.74	0.253	0.28
6	1.78	0.032	0.04
7	1.79	0.008	0.01

VI. 5.2.4 Cepa DUX1

El crecimiento de esta cepa fue el más lento del resto de las cepas estudiadas, presentó valores de concentración celular que van de 0.16, a 1.09×10^6 células ml^{-1} alcanzado al último día de cultivo (Fig. 12). Para la tasa de crecimiento (μ) se registraron valores, manteniéndose sin mucha variación, de entre 0.459 y 0.569 div. día^{-1} , siendo el valor mínimo 0.040 div. día^{-1} en el día final del cultivo. La producción diaria máxima se observó al quinto día con 0.32×10^6 células ml^{-1} , la menor producción, por su parte, se observó en los días primero y séptimo con 0.06 y 0.03×10^6 células ml^{-1} , respectivamente (Tabla XI).

Tabla XI. Valores de la densidad celular, tasa de crecimiento (μ) y producción diaria promedio, de la cepa DUX1 cultivada en 100ml de medio Guillard F/2.

Tiempo (días)	Concentración (1×10^6 cel. ml^{-1})	μ (div. día^{-1})	Producción diaria (1×10^6 cel. ml^{-1})
0	0.16		
1	0.22	0.459	0.06
2	0.31	0.494	0.09
3	0.46	0.569	0.15
4	0.64	0.476	0.18
5	0.96	0.584	0.32
6	1.06	0.142	0.10
7	1.09	0.040	0.03

VI. 6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel.

VI. 6.1. Transesterificación química

La cantidad de solución de NaCl necesaria en la valoración del aceite de maíz para que este obtenga un pH de 8, fue de 0.9 ml; y sumando este valor a los 3.5g de NaCl necesarios por cada litro de aceite que se va a transesterificar, se necesitó de 4.4 g en total de NaOH por cada litro de aceite, para llevar a cabo nuestra reacción.

Transcurrida la transesterificación se formaron dos capas en el tubo que contiene los productos derivados de la reacción, las cuales se pueden observar en la figura 13, y que conciernen al biodiesel (capa superior) y glicerol (capa inferior) determinado en base a la literatura; este último con un volumen del 20% del volumen total de la mezcla de reacción, lo que corresponde con el volumen de metanol agregado y por lo tanto, transformado.



Figura 13. Productos derivados de la transesterificación química entre aceite de maíz y metanol. Izquierda: Formación de dos capas en el tubo de reacción, biodiesel en la parte superior y glicerol en el fondo de color más oscuro (determinados en base a literatura). Derecha: imagen ampliada de las capas formadas.

VI. 6.2 Transesterificación enzimática

Tras realizar una serie de reacciones enzimáticas con las lipasas extraídas de las cepas S, T, 36 y 1R, a diferentes temperaturas y porcentaje de metanol; se logró consumar la reacción de transesterificación del aceite de maíz comercial y metanol utilizando como catalizador a las lipasas de la cepa 1R de *Bacillus* a 30 °C y con 20 % de metanol.

En la figura 14B se muestran las capas bien definidas que corresponden a los productos generados en la reacción de transesterificación enzimática: glicerol (concentrado en el fondo), lipasas (capa intermedia) y biodiesel (capa superior). Si comparamos la formación de estas capas con el blanco de reacción (Fig. 14A) se observa que el glicerol al ser más denso se concentro en el fondo de ambos tubos, y las capas de aceite y metanol presentes en el blanco se fusionaron en una capa tras ocurrir la reacción enzimática, esto como resultado de la transesterificación y la consecuente formación de biodiesel.

Por lo tanto, basados en la obtención de biodiesel y glicerol, determinamos que se logró seleccionar y obtener lipasas pertenecientes al género *Bacillus* capaces de realizar la reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para utilizarlas como catalizadores en la elaboración de biodiesel.

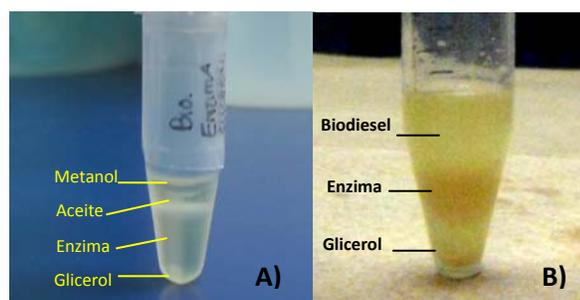


Figura 14. Productos derivados de la reacción de transesterificación enzimática con la lipasa 1R, a 30°C y 20% de metanol. A) Blanco de reacción donde el orden de los compuestos de abajo a arriba son: glicerol, lipasas, aceite, y metanol. B) Productos formados en la reacción enzimática de transesterificación (de abajo hacia arriba): glicerol, lipasas y biodiesel.

VI. 7 Análisis de los productos formados en la transesterificación por HPLC

VI. 7.1 Estandarización del método.

Basados en la metodología de Holcapek (1999), para el análisis de la producción de biodiesel mediante HPLC se logró obtener un método estandarizado en el equipo Agilent 1100A LC, que nos permitió visualizar el biodiesel formado en las reacciones químicas y enzimáticas, y por ende, favoreció en el monitoreo de las reacciones ensayadas. No se utilizaron estándares analíticos para la identificación de los compuestos formados, sin embargo la detección se determinó en base a la literatura (Holcapek, 1999) donde se señala que el orden de aparición de los componentes es ME < GL < AGs (ver Tabla XII).

Tabla XII. Tiempos promedio de retención de los principales componentes identificados en la transesterificación de aceite de maíz con metanol.

COMPONENTE	TIEMPO DE RETENCIÓN	DENOTACION
Metil éster (Biodiesel)	3.5 min.	ME
Glicerol	4.2 min.	GL
Ácidos grasos		AGs
Ácido linolénico	10.0 min.	ALn
Ácido linoleico	10.6 min.	AL
Ácido oleico	11.1 min.	AO
Ácido esteárico	11.6 min.	AE

VI. 7.2 Identificación de productos formados en las reacciones por HPLC.

Los productos formados en las reacciones químicas y enzimáticas, catalizadas con las lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R, realizadas a diferentes temperaturas y porcentaje de metanol, se analizaron mediante HPLC. Además, a manera de control, se examinó la composición del aceite de maíz comercial (utilizado como materia prima para nuestras reacciones).

Primeramente se analizó la composición del aceite de maíz para compararlo después con la transformación de sus componentes a metil ésteres en la transesterificación. En la figura 15 se puede observar el perfil cromatografico del aceite de maíz comercial, en donde se detecta (en base a la literatura) la presencia de una pequeña fracción de glicerol a los 4.4 minutos de iniciado el análisis, con 40 mAU (mili unidades de absorbancia); y la presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico y ácido esteárico) entre los 10 y 12 minutos, llegando hasta 800 mAU.

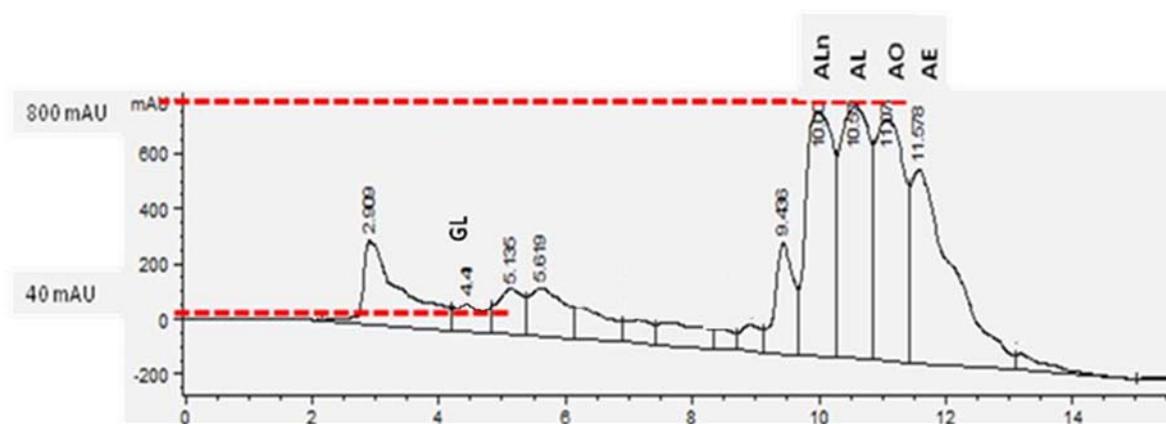


Figura 15. Perfil cromatografico por HPLC de los componentes presentes en el aceite de maíz comercial, con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20µl. Detección y tiempos de retención de los componentes determinados en base a la literatura.

Se analizaron también los productos obtenidos en la reacción de transesterificación química alcalina (catalizada con metóxido de sodio, tras una hora de reacción a 45 °C) mediante HPLC, y en el cromatograma resultante (Fig.16) se detectó en base a la literatura la presencia de biodiesel con un tiempo de retención de 3.5 minutos, con 780 mAU (mili unidades de absorbancia), así mismo se detectaron residuos de ácidos grasos con 50 mAU, los cuales señalan que éstos se transformaron a metil ésteres, es decir a biodiesel, con un alto porcentaje de conversión del 92.8%.

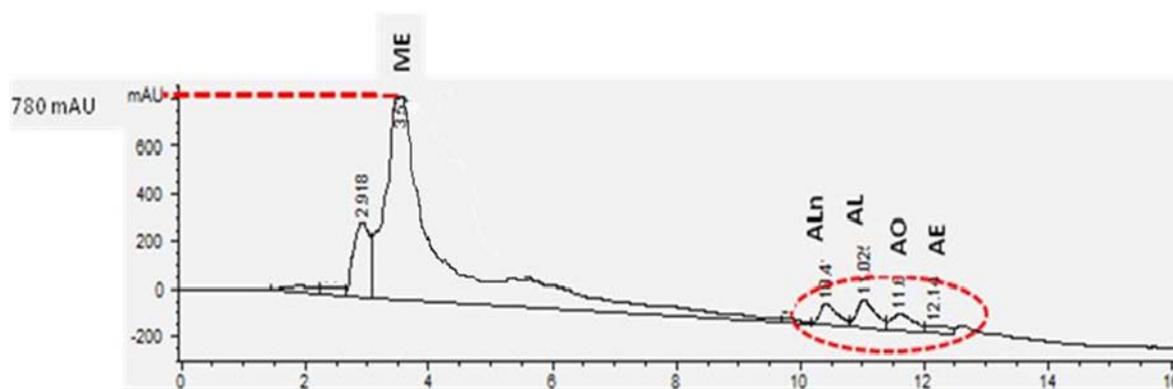


Figura 16. Perfil cromatográfico por HPLC, de los productos obtenidos tras la transesterificación química, con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20µl. Detección y tiempos de retención de los componentes determinados en base a la literatura.

Por último, en la figura 17, se puede observar el perfil cromatográfico de los productos formados en la mezcla de reacción de aceite de maíz comercial y metanol, mediante catálisis enzimática con lipasas obtenidas de *Bacillus*, cepa 1R, a 30 °C y con 20% de metanol (metanol/aceite, v/v). En el cual, se diferencia la presencia de biodiesel (detectado en base a la literatura), con un tiempo de retención de 3.5 minutos y 220 mAU (mili unidades de absorbancia); la presencia de glicerol (producto secundario en la transesterificación) determinado a los 4.4 minutos con 220 mAU; así como, la presencia de ácidos grasos no transformados con 650 mAU. Este cromatograma nos señala que se realizó la reacción de transesterificación del aceite de maíz a biodiesel, sin embargo, el porcentaje de conversión fue relativamente bajo, es decir, del 25.2%, quedando el 74.8% del aceite sin reaccionar; se cree que esto se debe a que las condiciones de reacción no son favorables para las lipasas ya que están inmersas en un medio con viscosidad alta (por el aceite) y esto provoca su saturación o inactivación.

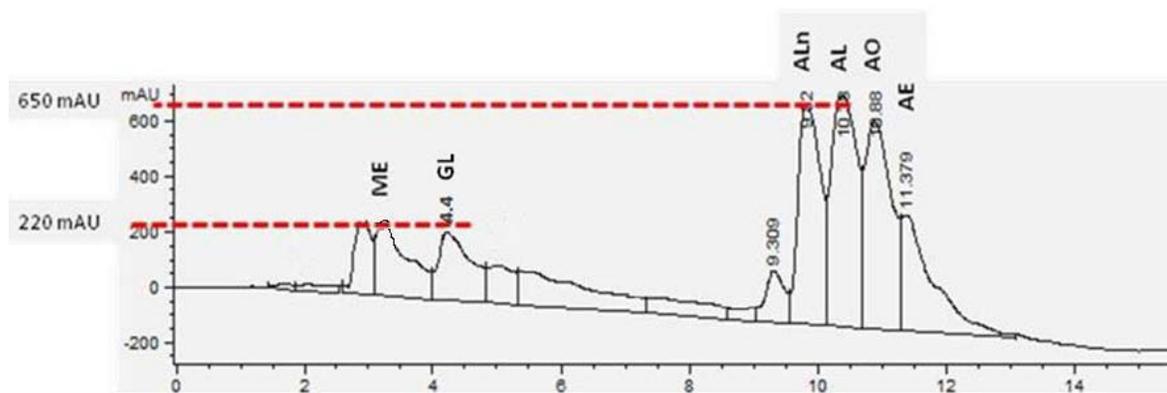


Figura 17. Perfil cromatográfico por HPLC, de los productos obtenidos tras la transesterificación enzimática, con lipasas de *Bacillus*, cepa 1R; con detección de UV a 205 nm, velocidad de flujo de 0.6ml/min, y volumen de inyección de muestra de 20 μ l. Detección y tiempos de retención de los componentes determinados en base a la literatura.

VI. 8 Comparación de características físico-químicas de los metil ésteres obtenidos, con los del Biodiesel Estándar

Al biodiesel producido en esta investigación, se le midió la densidad, viscosidad y punto de escurrimiento, con el objetivo de determinar si cumple con los parámetros físico-químicos estándares de calidad para el biodiesel que se señalan en la Norma EN14214, establecida por el C.E.N. Los valores resultantes de la medición de densidad, viscosidad y punto de escurrimiento del biodiesel generado mediante transesterificación química y enzimática, al igual que los valores establecidos por la Norma EN14214 se muestran en la tabla XIII, en la cual se puede apreciar que el biodiesel generado tanto por catálisis química como enzimática cumplió con los estándares de calidad señalados.

Tabla XII. Comparación entre los valores físico-químicos estándares establecidos en la norma EN14214 para Biodiesel y los valores obtenidos del Biodiesel Químico y Enzimático producido en el laboratorio.

DATOS FÍSICO-QUÍMICOS	UNIDAD	ESTANDARES BIODIESEL	BIODIESEL QUÍMICO	BIODIESEL ENZIMÁTICO
Densidad a 15°C	g cm ⁻³	0.86- 0.90	0.89	0.87
Viscosidad cinemática a 40°C	mm ² s ⁻¹	3.5 - 5.0	5.0	4.9
Punto de escurrimiento	°C	-15/ -20	-15	-17

VII. DISCUSIONES

VII.1 Origen y selección de cepas de *Bacillus spp* productoras de lipasas

En base a lo señalado por Ferrari *et al.*, 1993; Godfrey y West, 1996; Olmos, 2003; Ochoa, 2005, con respecto a que las especies de *Bacillus* son productores importantes de una cantidad grande y diversa de metabolitos secundarios; se realizó la selección de cepas de *Bacillus* que fuesen capaces de sintetizar lipasas extracelulares, y se seleccionaron las cepas S, T, 36 y 1R, siendo esta última quien mostró mayor producción; por lo tanto nuestros resultados respaldan a *Bacillus spp* como una importante fuente de enzimas entre las que se hallan las lipasas extracelulares.

Schallmey y colaboradores (2004), señalan también que es importante determinar parámetros como la temperatura y pH óptimos porque en base a esto, se pueden desarrollar catalizadores enzimáticos que operen bajo condiciones óptimas de reacción; es por ello que se determinó la temperatura y pH óptimos para la actividad de las lipasas seleccionadas la cual fue de 30 °C para las lipasas de las cuatro cepas, pH 6 para las lipasas de la cepa S y pH 7 para las lipasas de las cepas T, 36 y 1R. La temperatura óptima de reacción de las lipasas de la cepa 1R de *Bacillus*, seleccionadas en esta investigación como catalizadoras de la transesterificación para la elaboración de biodiesel, se comparó con la temperatura óptima a la cual operan otras lipasas microbianas utilizadas en la producción de biodiesel a nivel laboratorio; según Al-Zuhair (2007) la temperatura óptima de las lipasas de *Candida antártica* es de 40 °C, y de 60 °C para las lipasas de *Pseudomonas fluorescens*. Por lo tanto, la temperatura óptima de las lipasas de la cepa 1R (de 30 °C), es la temperatura más baja reportada, esta característica es importante ya que el demandar temperaturas bajas para la operación óptima de las enzimas resulta favorable para la catálisis de reacciones enzimáticas a nivel industrial ya que requieren de menor gasto de energía, además de que, una temperatura menor que las enzimas altamente termoestables facilita su inactivación en el término del proceso en un régimen de calentamiento aceptable (Godfrey y West, 1996).

VII.2 Caracterización fenotípica y molecular a nivel de género de cepas bacterianas productoras de lipasas y su crecimiento.

Las características fenotípicas de las cuatro cepas bacterianas productoras de lipasas (S, T, 36 y 1R), exhiben las mismas características morfológicas descritas por Slepecky (1992), quien especifica que el género *Bacillus* está integrado por bacterias Gram positivas, que poseen una morfología de barra o bacilo, y que bajo condiciones ambientales adversas forman endosporas; por lo que las cepas en estudio, se ubicaron dentro de éste género.

La caracterización molecular a nivel de género, se realizó con el fin de corroborar la identificación fenotípica de las cepas seleccionadas. Dado que el patrón de amplificación práctico (por PCR) en la cepa BB80 $\Delta npr his A gly B$ de *Bacillus subtilis* coincidió con el patrón de amplificación teórico en las cepas S, T, 36 y 1R, significo que los oligonucleótidos específicos para género de *Bacillus* empleados (BSQ1 5' y *Bacillus* 3') actuaron correctamente amplificando un fragmento de tamaño esperado (600 pb) lo que ratifica la caracterización de las cepas seleccionadas dentro del género *Bacillus*.

En cuanto a las curvas de crecimiento de las cepas S, T, 36 y 1R, estas indicaron que las cuatro cepas presentaron la degradación de los ingredientes utilizados en el medio para la producción de lipasas (medio PL) mostrando un crecimiento rápido debido a su gran capacidad de asimilación del medio enriquecido con aceite de maíz comercial, a causa de la producción de lipasas extracelulares, es por esta razón las cepas S, T, 36 y 1R se seleccionaron como productoras de lipasas; sin embargo cabe agregar que las cepas S y T presentaron ciertas ventajas metabólicas con respecto a las demás, puesto que los valores de densidad óptica alcanzados (seis y siete veces su densidad inicial, al final de la fase exponencial) superaron el crecimiento de las cepas 36 y 1R. Un dato notable es que pese al poco crecimiento de la cepa 1R reflejado en este medio, la actividad y producción de lipasas fue alta en el medio luminoso (MSL) en comparación con el resto de las cepas estudiadas, que presentaron una producción de lipasas menor bajo las mismas condiciones de crecimiento, este comportamiento puede deberse a las lipasas de distintas clases de *Bacillus* presenten diferentes especificidades de sustratos.

VII.3 Producción de lipasas

Shariff y colaboradores (2007) señalan que la producción de lipasas depende directamente de la temperatura y el pH óptimos en el medio en el cual se producen, ya que de lo contrario se podría generar una inhibición total de la producción debido a que la fisiología bacteriana obedece a las condiciones ambientales; es por esta razón que la producción de lipasas de las cepas S, T, 36 y 1R se efectuó a la temperatura y pH óptimos (30 °C, pH 6 y 7) estimados mediante la formación de un halo fluorescente en el medio luminoso, y de esta manera se asume que se obtuvo la mayor producción de lipasas extracelulares en medio de cultivo bajo las condiciones óptimas establecidas. Aunque se sugiere en futuras investigaciones cuantificar la producción de lipasas y relacionarla con las condiciones empleadas en el medio de cultivo en el cual se producen.

VII.4 Inmovilización enzimática de lipasas

Bornscheuer *et al.*, 2002; Palomo, 2004; y Sánchez *et al.*, 2005 mencionan que la inmovilización enzimática confiere ventajas en relación con las enzimas en forma libre (son reutilizables, fáciles de separar y estables); motivo por el cual se inmovilizaron las lipasas extraídas de las cepas S, T, 36 y 1R en un polímero de quitosano lo que permitió su reutilización en las reacciones ensayadas, facilitó su recuperación, mantuvieron estabilidad al manifestar actividad tras la inmovilización (por su capacidad de degradar el aceite de maíz en su sustrato lipídico), pero aun no se logró detectar que aumentara su desempeño. Se reveló en este trabajo que las lipasas obtenidas de *Bacillus* se lograron inmovilizar sin presentar inhibición en su actividad, no obstante, se recomienda realizar estudios de actividad catalítica de estas lipasas una vez inmovilizadas para precisar si la inmovilización causa un aumento en la actividad.

VII. 5 Cultivo de cepas de microalgas del género *Dunaliella*

Debido a que la producción de biodiesel se puede realizar en base al aceite extraído de microalgas, se evaluó el potencial de *Dunaliella* (cepas CBO, DUT2, CCAP 19/30 y DUX1) para generar biomasa.

Las condiciones de cultivo inducidas para el crecimiento de las cepas CBO, DUT2, CCAP 19/30 y DUX1 fueron a 25 °C, con iluminación por lámparas fluorescentes con fotoperiodo de 14-10 horas luz/obscuridad, en donde al evaluar el crecimiento se obtuvo una densidad celular mayor en la cepa DUT2 de 1.79×10^6 células ml^{-1} , seguida por la cepa CBO con 1.78×10^6 células ml^{-1} a los 7 días de cultivo (168 horas). Estos valores de densidad celular resultaron similares a los obtenidos por Weldy y Huesemann con *Dunaliella salina* quienes obtuvieron una concentración celular de 1.7×10^6 células ml^{-1} a los 7 días de cultivo (168 horas), a 28 °C, con una iluminación continua (24 horas) y con una concentración alta de nitrógeno en el medio (20 mM de NO_3). Weldy y Huesemann reportaron también que el contenido de biomasa lipídica de *D. salina*, cepa CCAP1918, es de 15 a 45 % de su peso seco, dependiendo de las condiciones y de la fase de crecimiento en la que se hallen, del mismo modo encontraron que las condiciones óptimas para la mayor producción de lípidos (46 mg lípidos L^{-1} *día) se observaron con una concentración alta de nitrógeno (20 mM de NO_3) y con alta intensidad de luz ($800 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{seg.}$) bajo 24 horas de exposición; obtuvieron también porcentajes mayores de lípidos al inicio de la fase estacionaria que al inicio de la fase exponencial y observaron que decreció la producción dramáticamente al final de la fase estacionaria, por lo que dedujeron que se produce un incremento en la producción de lípidos durante el crecimiento celular.

Huntley y Redalje realizaron sus cultivos de la microalga *H. pluvialis* en estanques cerrados bajo condiciones de esterilidad, lo que económicamente no resulta rentable para la producción de biomasa lipídica a gran escala. *Dunaliella salina* por su parte no requiere de condiciones estériles para su crecimiento por lo que puede cultivarse en estanques abiertos, lo que reduce significativamente los costos de producción. Otra especie de microalga considerada como potencial productos de lípidos es *Botryococcus braunii*, debido a su alto contenido de lípidos en relación a su peso seco (Metzger y Laargeu, 2005), pero enfrenta la

misma limitante que *H. pluvialis* puesto que requiere de condiciones estériles para su crecimiento y por lo tanto para la producción de lípidos.

Es debido a que *Dunaliella* puede crecer bajo condiciones no estériles, a que presenta un crecimiento rápido, y a que genera un contenido alto de lípidos, que se considera un recurso potencial para la producción de biomasa lipídica a gran escala para la fabricación de biodiesel.

VII.6 Reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol para la producción de biodiesel

La reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol mediante catálisis química con NaOH se efectuó con un alto porcentaje de conversión a biodiesel del 92.8 %, no obstante a pesar del rendimiento de este tipo de catálisis, se planteo en esta investigación la realización de la reacción de transesterificación mediante catálisis enzimática con lipasas de *Bacillus spp*, con el fin de superar los obstáculos de la reacción química como lo es principalmente la contaminación del biodiesel por los catalizadores químicos empleados (Liu, 1994; Basu y Norris,1996).

Las lipasas extraídas de las cepas seleccionadas como productoras de lipasas (cepas S, T, 36 y 1R) se probaron como catalizadores de la reacción de transesterificación entre el aceite de maíz y metanol para emplearlas en la elaboración de biodiesel, sin embargo las lipasas de la cepa 1R de *Bacillus* fueron las únicas que mostraron la capacidad de efectuar la transesterificación. Esta lipasa se suma a las ya reportadas como enzimas utilizadas para la elaboración de biodiesel a nivel laboratorio como lo son *Candida antárctica*, *Psuedomonas fluprescens*, *Rhizopus orizae*, *Aspergillus niger*, *Thermomycetes lanuginosa* y *Rhizomocur miehei* (Al-Zuhair, 2007), y es la primera enzima reportada perteneciente al género *Bacillus* con la capacidad de catalizar la formación de biodiesel a partir de aceite vegetal y alcohol. El siguiente paso, no obstante, es incrementar la eficiencia de las lipasas en la reacción, para lo cual se recomienda continuar con la búsqueda de las condiciones óptimas que favorezcan la actividad enzimática de las lipasas seleccionadas.

VII. 7 Análisis de los productos formados en la transesterificación por HPLC

La estandarización del método de detección por HPLC de metil ésteres, glicerol y ácidos grasos libres, presentes en el transcurso de la reacción de transesterificación de aceite de maíz y metanol se realizó en base al propuesto por Holcpek (1999) (no se utilizaron estándares analíticos) quien señala que el orden de aparición de los componentes es ME<GL<AGs. El perfil cromatografico del aceite de maíz comercial, el biodiesel obtenido mediante transesterificación química y el biodiesel obtenido mediante transesterificación enzimática, mostraron el mismo orden de retención de los componentes, así mismo se logro detectar la presencia de biodiesel a los 3.5 minutos lo que concuerda con el patrón observado por Holcpek (1999) quien señala la detección de biodiesel entre los 2.5 y 3.5 minutos. La diferencia en el patrón cromatografico de los componentes del biodiesel químico y enzimático se debió únicamente a la proporción de los mimos, ya que el análisis de la reacción de transesterificación química mostro mayor porcentaje de conversión de triglicéridos a metil esterres (del 92.8%) en relación con la transesterificación enzimática (de 25.2%). No existen muchos reportes sobre el análisis de productos formados en la transesterificación de aceite vegetal y alcohol por HPLC, por lo que se recomienda realizar más estudios sobre el tema.

VII.8 Comparación de características físico-químicas de los metil ésteres obtenidos, con las del Biodiesel Estándar.

Basándose en los parámetros físico-químicos medidos al biodiesel producido por catálisis química y enzimática, se encontró que éste cumplió con los estándares de calidad para el biodiesel que se señalan en la Norma EN14214, establecida por el C.E.N (Comité Europeo de Normalización). El primer parámetro determinado fue la Densidad, la cual es importante porque da idea del contenido de energía en el combustible, esto es que a una densidad mayor existe mayor energía térmica y una economía de combustible más favorable. La densidad del biodiesel químico y enzimático presento valores de 0.89 y 0.87 g/cm³ respectivamente; ambos biocombustibles, por lo tanto, se encuentran dentro de los límites

establecidos por la norma EN14214, que señala un rango de 0.86 a 0.90 gcm^{-3} (Tabla XIII). Por otro lado, la viscosidad del biodiesel confiere características de lubricidad al sistema de combustible para prevenir el desgaste entre superficies en movimiento. La norma EN14214 especifica que la viscosidad del biodiesel debe rondar los valores de entre 3.5 y 5.0 mm^2s^{-1} , valores entre los que se encuentra la viscosidad del biodiesel químico y enzimático producido en el laboratorio (Tabla XIII). En cuanto al punto de escurrimiento, que se refiere a la temperatura en el que el biodiesel deja de fluir y toma un estado sólido, se debe presentar a las temperaturas más bajas posibles, ya que es una medida importante a tomar en cuenta cuando se utiliza el motor en climas fríos o en temporadas invernales, la norma señalada, indica que debe oscilar este punto entre -15 y -20 °C, temperaturas entre las que se ubica el punto de escurrimiento del biodiesel químico y enzimático, siendo el biodiesel enzimático quien presento menor temperatura de congelamiento con respecto al biodiesel químico (Tabla XIII). Por lo que, finamente constatamos, que además de generar biodiesel mediante catálisis enzimática con lipasas de *Bacillus*, este cumplió con los estándares de calidad señalados por el Comité Europeo de Normalización.

VIII. CONCLUSIONES PUNTUALES

- ✚ En base a los resultados de selección de cepas productoras de lipasas pertenecientes al género *Bacillus*, se hallaron cuatro cepas capaces de producir y excretar lipasas extracelulares, las cuales fueron las cepas S, T, 36 y 1R, siendo ésta última la que mostró mayor producción y actividad de lipasas.

- ✚ Se determinaron los parámetros de temperatura y pH óptimos de actividad de las lipasas extracelulares seleccionadas, las cuales corresponden a 30 °C para las lipasas de las cuatro cepas; pH 6 para las lipasas de la cepa S, y pH 7 para las lipasas de las cepas restantes (T, 36 y 1R).

- ✚ Se logro extraer lipasas extracelulares del medio de cultivo específico para su producción, de las cepas S, T, 36 y 1R tras 8 horas de cultivo; y se consiguió su inmovilización en quitosano, logrando preservar la actividad de las lipasas.

- ✚ En cuanto a las reacciones de transesterificación, estas se lograron completar mediante catálisis química y enzimática, con las lipasas de la cepa 1R a 30 °C y con 20 % (v/v aceite- alcohol) de metanol, sin embargo, se obtuvo mayor porcentaje de conversión a biodiesel, en la reacción química (del 92.8 %), en relación con la reacción enzimática (del 25.2%). Por lo tanto, se concluye que la cepa 1R de *Bacillus* produce lipasas extracelulares capaces de realizar la reacción de transesterificación para su uso en la producción de biodiesel. Sin embargo, es necesario continuar realizando ensayos de catálisis enzimática a diferentes condiciones (temperatura, porcentaje de alcohol, cantidad de enzima, solventes, pH etc.) a manera que permitan incrementar el porcentaje de conversión en la reacción.

- ✚ El biodiesel producido por catálisis química y enzimática cumplió con los estándares de densidad, viscosidad y punto de escurrimiento, para el biodiesel que se señalan en la Norma EN14214, establecida por el C.E.N (Comité Europeo de Normalización); por lo cual, se confirma que se logro producir biodiesel de calidad.

- ✚ Se encontró en los estudios preeliminares que las cepas de microalgas CBO y DUT2 de *Dunaliella*, presentaron un rápido crecimiento (de 0.36 a 1.78×10^6 células ml^{-1} y de 0.26 a 1.79×10^6 células ml^{-1} respectivamente, después de siete días de cultivo), sin embargo, se recomienda continuar con evaluaciones acerca de la tasa de crecimiento y cuantificar la producción de biomasa lipídica para la producción de aceite de microalga, respaldados mediante análisis estadísticos.

PERSPECTIVAS

- ✚ Efectuar ensayos de catálisis enzimática con las lipasas de la cepa 1R de *Bacillus*, con diferentes condiciones (temperatura, porcentaje de alcohol, cantidad de enzima, solventes, pH), para incrementar el porcentaje de conversión en la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel, así como realizar estudios sobre la actividad catalítica de las lipasas inmovilizadas y comparar con la actividad de las lipasas libres.
- ✚ Caracterizar a nivel de especie las cepas del género *Bacillus* seleccionadas como productoras de lipasas.
- ✚ Determinar el porcentaje de biomasa lipídica producido por las cepas CBO y DUT 2 pertenecientes al género *Dunaliella* mediante un proceso inductivo, determinar la composición de ácidos grasos de dichos lípidos, y realizar estudios sobre los componentes del medio de cultivo a fin de determinar las condiciones óptimas que permitan una producción mayor de lípidos de estas microalgas.
- ✚ Aplicar un análisis estadístico paramétrico y no paramétrico a fin de determinar si existen diferencias significativas en la actividad de las lipasas seleccionadas, así como en el crecimiento y producción de biomasa lipídica de las microalgas estudiadas bajo diferentes condiciones inducidas de cultivo.
- ✚ Probar el aceite de microalgas como sustrato para la reacción de transesterificación, y comparar la calidad del biodiesel obtenido, con el biodiesel producido de aceites vegetales terrestres.
- ✚ Utilizar estándares analíticos para la identificación de compuestos formados en la transesterificación de aceite de maíz y metanol en HPLC.

LITERATURA CITADA

1. Agarwal A.K., y Das L.M. 2001. Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines. *J Eng Gas Turbines Power* 123:440–447.
2. Alvarez Arrellano H. 2003. Cultivo de microalgas: Manual de uso para Acuicultura Tropical. Centro de Difusión y Publicaciones ESPOL. 1ª ed. Guayaquil, Ecuador. 46 pp.
3. Al-Zuhair S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1:57-66
4. Al-Zuhair S., Jayaraman K.V., Krishnan S., and Chan YH. 2006. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochem Eng J* 30:212–217.
5. Arroyo M., Sánchez J., y Sinisterra J. 2000. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb Technol* 24:3–12.
6. Basu H.N., y Norris M.E. 1996. Process for production of esters for use as a diesel fuel substitute using a non-alkaline catalyst. US Patent 5525126.
7. Bligh E.G. y Dyer W.J. 1959. Rapid Method of total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917
8. Bornscheuer U.T., Bessler C.; Srinivas R., y Krishna S.H. 2002. Optimized lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology* 20: No. 10, 433-437.
9. Bradoo S., Saxena R.K. y Gupta. 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:87-91
10. Carriquiry M. 2007. Biodiesel production: Recent developments and prospects. *Iowa Ag Rev* 13:8,9,11.
11. Castilho L.R., Polato C.M., Baruque E.A., Sant´Anna J.L., y Freire DM. 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem Eng J* 4:239–247.

12. Castro P., Coello J., y Castillo L. 2007. Opciones para la producción y uso del biodiesel en Perú. Soluciones prácticas- ITDG. Primera ed. Perú. 173pp.
13. Connemann J. y Fischer J. 1998. Biodiesel in Europe 1998: Biodiesel processing technologies. Paper presented at the International Liquid Biofuels Congress, Brazil, 15 pp.
14. Chang H.M., Liao H.F., Lee C.C. y Shieh C.J. 2005. Optimised synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *J Chem Technol Biotechnol* 80:307–312.
15. Cifuentes Ali D., y Maritza Rojas D. 2005. Inmovilización de lipasa *Candida rugosa* en soporte de quitosano. Universidad Nacional de Colombia. 34-35p.
16. Collymore Rodríguez A., Arencibia Jorge R., Blanco García A., y Araújo Ruiz J.A. 2008. Producción científica mundial sobre biodiesel. *Acimed* 18(5).
17. Doy R.H. 1992. *Biology of Bacilli: Applications to Industry*. Butterworth-Heinemann. 384pp
18. Drown K., y Harper E. 2001. Frame: Screening vegetable oil alcohol esters as fuel lubricity enhancers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 579-584.
19. Du W., Xu Y.Y., Liu D.H. y Li Z.B. 2005. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *JMolCatalB: Enzymatic* 37:68–71.
20. Du W., Xu Y.Y., Liu D.H. y Zeng J. 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J Mol Catal B: Enzymatic* 30:125–129.
21. Ferrari E., Jarnagin A.S., y Schmidt B.F. 1993. Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein AL, Hoch JA., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and others Gram-Positive Bacteria. American Society For Microbiology, Washington, DC, pp.917-937.
22. Fukuda H., Kondo A. y Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92:405–416.
23. Freedman B., Butterfield R.O., y Pryde E.H. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 63:1375–1380.
24. Lopez Munguia. 2002. Producción de enzimas microbianas. En Garcia Garibay, Quintero Ramirez y Lopez Munguia (eds.) *Biología alimentaria*. Editorial.Limusa. Mexico. 609 p.

25. Guillard R. R. L. 1973. Division rates. En: J. R. Stein (eds.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, New York. 289-311 p.
26. Godfrey T., y West S. 1996. Industrial Enzymology. Macmillan Publisher Inc. New York, NY, pp.3-10
27. Guvipta R, Gupta N y Rati P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763-781
28. Gunstone. 2001. Yields of oilseeds and of oils and fats. *Inform* 12, 1093-1096.
29. Harrington, C.A. d'Arcy-Evans. 1994. Comparison of conventional and *in situ* methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 16, 109-1013.
30. Herrera J. 1993. Investigación y ciencia. La Quitina.
31. Holcapek M., Jandera P., Fischer J. y Borijov P. 1999. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*, 858,13-31
32. Hoydonex H.E., De Vos D.E., Chavan S.A., y Jacobs P.A. 2004. Esterification and transesterification of renewable chemicals. *Topic Catal* 27(1-4):83-96
33. http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0019/noticia_biodiesel.htm
34. Huntley M.E. y Redalje D.G. 2006. CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. *Mitigation and Adaption Strategies for Global Change*.
35. Iso M., Chen B., Eguchi M., Kudo T., y Shrestha S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal B: Enzymatic* 16:53-58.
36. Jaeger K, Dijkstra B, y Reetz M. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular, Biology, Three- dimensional structures and Biotechnological Applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-51
37. Jeromin L., Peukert E., y Wollmann G. 1987. Process for the pre-esterification of free fatty acids in fats and oils. US Patent 4698186.

38. Jimenez C., Cossio B. R. y Niell F.X. 2003. Relationship Between Physiochemical variables and productivity in open ponds for the production of Spirulina: A predictive model of algal yield. *Acuaculture* 221,331-345.
39. Khyami-Horani H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 399-401.
40. Knothe G. 2002. Current perspectives on biodiesel. *Infor.* 13:900-903.
41. Korbitz W. 1999. Biodiesel production in Europe and North America. An encouraging prospect. *Renewable Energy* 16:1078-1083.
42. Köse Ö., Tüter M., y Aksoy H.A. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free médium. *Bioresour Technol* 83:125-129
43. Kouker G. y Jaeger K.E. 1986. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53,211-213.
44. Krawcsyk T. 1996. Biodiesel: alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *Inform* 7:800-815.
45. Kreutzer U.R. 1984. Manufacture of fatty alcohols based on natural fats and oils. *J Am Oil Chem Soc* 61:343-3487
46. Kumar N.V. 2000. A review of chitin and chitosan application. Department of chemistry, University of Roorke, India. *Reactive and Functional Polymers.* 46 1-27
47. Lee S. Y. y Rhee J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology.* 15,617-623.
48. Lepper H. y Friesenhagen L. 1986. Process for the production of fatty acid esters of short-chain aliphatic alcohols from fats and/or oils containing free fatty acids. *US Patent* 4608202.
49. Lesuisse E., Schanck K., y Colson C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216, 155-160.
50. Liu K.S. 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gaschromatographic analysis of lipids in biological materials. *J Am Oil Chem Soc* 71:1179-1187.
51. Lotti M. y Alberghina L. 2007. Lipases: Molecular Structure and Function. En: Polaina J, and MacCabe A. (eds). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.* Springer, The Netherlands, 641pp.

52. Lutz S. 2004. Engineering lipase B from *Candida Antarctica*. *Tetrahedron-Asymmetr* 15:2743-2748
53. Ma F., y Hanna M.A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technol* 70:1-15.
54. Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., y Gokhale D.V. 2002. Production of acid lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem* 38:715-721
55. Metzger P. y Largeau C. 2005. *Brotriococcus brauni*: a rich source for the hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:486-496.
56. National Standard for Biodiesel, Environment Australia. March 2003
57. Nthangenia M., Pattertonb H., Tondera A., Vergeerc W. y Litthauera D. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on Bacillus lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 705-712.
58. O'Brien R. 1993. Food service use of fats and oils. *Inform* 4, 913-921.
59. Ochoa S.L. 2005. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23:519-525
60. Olmos S.J. 2003. Molecular characterization and phylogenetic identification of marine microorganism. X Congreso Nacional of Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
61. Palligarnai T., Vasudevan, Michael B. 2008. Biodiesel production- current state of the art and challenges. *J and Microbiol Biotechnol.* 35:421-430
62. Palomo, J.M., Segura, R.L., Fernández-Lorente G., Pernas M., Rúa, M.L., Guisán J.M. y Fernández-Lafuente R. 2004. Simple Purification, Immobilization and Stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic support. *Biotechnol Prog.* 20: 630-635.
63. Pandey A. 2003. Solid state-fermentation. *Biochem eng J* 13:81-84
64. Pouilloux Y., Abro S., Vahoe C. y Barrault J. 1999. Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion exchange resins. *Journal of Molecular catalysis A: Chemical* vol 149: 243 - 254.

65. Reyes J.F. y Sepulveda M.A. 2006. PM-10 emissions and power of a Diesel engine fueled with crude and refined Biodiesel from salmon oil. *Fuel* 85:1714–1719.
66. Sanchez F. y Vasudevan P.T. 2006. Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Appl Biochem Biotechnol* 135:1–14.
67. Sánchez M., Valerio G., García H., y Oliart. 2005. Inmovilización de la lipasa termoalcalina producida por *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Instituto tecnológico de Veracruz.
68. Shariff F.M., Chor L.T., Mukred A.D., Salleh A. B., Basri M. y Rahman. 2007. Production of L2 lipase by *Bacillus sp.* stain L2: nutritional and physical factors. *Journal of Basic Microbiology*. 47:407-412.
69. Fierro Reséndiz S. 2004. Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes de efluentes de cultivos acuícolas (no publicado).
70. Schallmey M., Singh A., y Ward O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50(1): 1–17.
71. Sharma R, Chisti Y y Banerjee UC. 2001. Production, purification, characterization, and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627-662
72. Sims B. 2007. Biodiesel: A global perspective: Biodiesel Magazine.
73. Slepecky R A. 1992. “What is a Bacillus?”. In: Doi H.R. McGloughlin M (eds). *Biology of Bacillus: Applications to industry*. Butterworth-Hinerman, Boston. 1-21p.
74. Sonnenschein A.L., Losick R. and Hoch J.A. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram- Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, 987 pp.
75. Tan T., Wang F. y Zhang H. 2002. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* vol 18: 325 – 331.
76. Tornabene T.G. Holzer G. y Peterson S.L. 1980. Lipid profile of the Halophilic Alga *Dunaliella salina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 96:1349-1356.
77. Vasudevan P. y Briggs M. 2008. Biodiesel production- current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:421 -430.

78. Vicente G., Martínez M. y Aracil J. 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technol* 92:297–305.
79. Von W. R. 1999. Technical handbook for marine biodiesel in recreational boats. Prepared for National Renewable Energy Laboratory, US Department of Energy, Subcontract No. ACG- 7-16688-01 under Prime Contract No. DE-AC36-83CH10093, pp 32.
80. Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A. y Tominaga Y. 2001. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed bed bioreactor. *J Am Oil Chem Soc* 78:703–707.
81. Wardle D.A. 2003. Global sale of green air travel supported using biodiesel. *Renewable Sustainable Energy Rev* 7:1–64.
82. Wei D., Wei L., Ting S., Xin C. y Dehua L. 2008. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:331-337.
83. Weldy C.S. y Huesemann M. Not published. Lipid Production by *Dunaliella salina* in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity. U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research.
84. Yusaf T., Al-Zuhair S. y Al-Atabi M. 2005. Performance of diesel engine using an emulsion of biodiesel–conventional diesel fuel. *J Mech Eng* 56: 137–142.
85. Zhang Y., Dube M.A., McLean D.D. y Kates M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment *Bioresource Technol* 89:1–16.

ANEXOS

I. Tinción Gram

1. Preparar frotis bacterianos.
2. Teñir con cristal violeta por 1 min.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Cubrir con lugol por 1 min.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Decolorar con alcohol-acetona por 30 segundos.
7. Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
8. Teñir con safranina por 1 min.
9. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
10. Dejar secar la preparación.
11. Examinar al microscopio fijándose sobre todo en el color de cada preparación (color violeta-Gram positiva y color rosa-Gram negativa).

II. Tinción de espora

1. Prepara frotis bacterianos.
2. Teñir con verde malaquita. Con unas pinzas colocar la muestra encima de una vaso con agua hirviendo para que el vapor humee el colorante, pero sin que hierva, durante 5 min. Añadir más colorante si la muestra se seca.
3. Lavar con agua el resto de colorante.
4. Teñir con safranina por 1 min.
5. Lavar con agua el resto de colorante.
6. Dejar secar la preparación.
7. Observar las esporas en la preparación al microscopio.

III. Extracción de cDNA de bacterias por el método Fenol / Cloroformo.

1. Crecer la cepa de interés en 3 ml de medio Luria (LB) durante 12h.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 12,000 rpm por 3 minutos hasta obtener un pellet compacto, eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 567 μ l de buffer TE. Agregar 5 μ l de lisozima e incubar a 37°C por 10 minutos.
4. Agregar 10 μ l de RNAasa e incubar por 20 minutos a 37 °C.
5. Adicionar 30 μ l de SDS y 3 μ l de proteinasa K e incubar 1 hora a 37°C.
6. Adicionar 100 μ l de NaCl 5M y mezclar.

7. Adicionar 80 μ l de CTAB/NaCl, incubar 10 minutos a 37°C.
8. Agregar 0.7 ml de cloroformo/alcohol isoamílico, agitar y centrifugar 5 minutos.
9. Transferir el sobrenadante (600 μ l) a un tubo nuevo.
10. Agregar 360 μ l de isopropanol, agitar el tubo y centrifugar 10 minutos y decantar el sobrenadante.
11. Lavar con 1 ml de etanol al 70%, centrifugar 5 minutos y decantar el sobrenadante.
12. Dejar secar sobre papel secante con los tubos invertidos.
13. Disolver el pellet en 100 μ l de buffer TE, almacenar a -20°C.
14. Verificar en gel de agarosa al 1.2%, utilizando 5 μ l de DNA resuspendido.