

CIENTÍFICA



Depósito Legal ppi 201502ZU4668

Vol. 23, N° 4
Octubre - Diciembre 2015



**An International Refereed Scientific Journal of
the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia
Maracaibo - Venezuela**

Esta publicación científica en formato digital
es continuidad de la revista impresa
Depósito Legal: pp 199302ZU47
ISSN:1315-2076

CIENCIA 23 (4), 198 - 205, 2015
Maracaibo, Venezuela

Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel) a partir de grasa de pollo usando lipasas bacterianas

James Zambrano¹, Luis Medina², Arnaldo Armado³, José Jiménez⁴ y Oscar Valbuena^{1,}*

¹Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología.

²Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA), Facultad de Ciencias de la Salud. ³Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM); ⁴Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación (LABSAI), Departamento de Química. Facultad de Ciencias y Tecnología.

Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

Resumen

La contaminación de ambientes naturales por el uso de combustibles fósiles y variados procesos industriales ha alcanzado niveles que atentan contra la calidad y sustentabilidad de la vida en el planeta. A tal efecto, investigaciones biotecnológicas centran sus actividades en la búsqueda de fuentes energéticas alternas. Entre ellas, los biocombustibles (bioetanol y biodiesel), obtenidos de materiales biológicos provenientes del medio ambiente, actividades agrícolas o industriales parecieran ser los más indicados. Este trabajo describe una metodología relativamente rápida y de bajo costo para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante catálisis enzimática usando como substrato grasa de pollo. La grasa, con 10±2% de ácidos grasos libres, se obtuvo por calentamiento a 70 °C de residuos grasos de pollo y la transesterificación, en presencia de metanol, se efectuó a 40 °C durante 24 h, mediante lipasas producidas por un consorcio bacteriano obtenido de residuos grasos industriales en estado de descomposición. La actividad específica de las lipasas, usando aceite de oliva como substrato, fue de 190 U x mg⁻¹ x min⁻¹. La cromatografía de gases, detectó seis señales, las cuales se asignaron a los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolenico.

Palabras clave: grasa de pollo; lipasas bacterianas; ésteres metílicos; ácidos grasos; transesterificación.

Synthesis of fatty acid methyl esters (biodiesel) from chicken fat using bacterial lipases

Abstract

Pollution of natural environments due to the use of fossil fuels and industrial activities has reached levels which threaten the quality and sustainability of life in the planet. Thus, biotechnological researches are currently involved in looking for alternate energetic sources. Among them, biofuels (bioethanol and biodiesel) obtained from natural biological materials, agricultural and industrial processes seem to be the most appropriate sources. This study describes a simple and low cost method for synthesizing fatty acid methyl esters through enzymatic catalysis by using chicken fat as substrate. The fat, containing 10±2% of free fatty acids, was prepared from chicken fatty residues after heating at 70 °C. The transesterification reaction, with methanol, was carried out at 40 °C for 24h, using lipases yielded by a bacterial consortium isolated from industrial spoiled fatty residues.

* Autor para la correspondencia: valbuenavilchez@gmail.com

The specific activity of the lipases, determined on olive oil as substrate, was 190 U x mg⁻¹ x min⁻¹. The gas chromatography detected six species which were assigned to the methyl esters of the palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids.

Keywords: chicken fat; bacterial lipases; methyl esters; fatty acids; transesterification.

Introducción

El creciente desarrollo tecnológico de las comunidades humanas, particularmente lo inherente a los sectores automotor e industrial, ha provocado una producción excesiva y consecuente acumulación de desechos sólidos, líquidos y gaseosos, que atentan contra los ecosistemas y ambientes naturales. El parque automotor se caracteriza por el uso de combustibles fósiles no renovables, es decir gasolina, diesel, gas y carbón, los cuales mediante combustión generan gases de efecto invernadero, acumulándose en la atmósfera; entre ellos los óxidos de azufre y nitrógeno, que finalmente y mediante las lluvias, se incorporan a los suelos, acidificándolos y ejerciendo efectos negativos sobre áreas dedicadas a labores agropecuarias (1, 2, 3). Adicionalmente, entre las variadas actividades industriales, la industria alimentaria también contribuye al deterioro ambiental al producir residuos que son almacenados en depósitos o descargados en ríos, lagunas y suelos, lo cual a corto plazo y debido a su descomposición, originan compuestos tóxicos, muchos de ellos pestilentes y atrayentes de plagas, contaminando regiones muy alejadas de los sitios donde son descargados y generando problemas de salud pública (4, 5). Consecuentemente, en la actualidad se trabaja en el desarrollo y la implementación de estrategias que tiendan a detener, reducir o eliminar el deterioro ambiental mediante la producción de biocombustibles (6), utilizando residuos orgánicos provenientes de actividades industriales (7, 8, 9, 5). El bioetanol y biodiesel se producen por utilización de materiales vegetales (10, 11, 12, 13) o animales (14, 15, 16, 17), muchos de ellos considerados como residuos de poco valor económico y utilidad. En particular, la producción de biodiesel, mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos provenientes de aceites y grasas, pareciera satisfacer las inquietudes señaladas. Para abordar y consolidar la producción de biocombustibles se debe considerar el costo de las materias primas a ser utilizadas (15, 16, 18). Este aspecto pudiese ser alcanzado en la producción de

biodiesel a partir de grasas animales: los residuos grasos suministrarían el sustrato a convertirse en biodiesel y el catalizador utilizado en el proceso, pudiese ser enzimas lipolíticas provenientes de bacterias aisladas de residuos grasos industriales en procesos de descomposición (19). Ambos insumos, sustrato (15, 16) y catalizador son de bajo costo, fácil adquisición y cumplen la función dual de reducir/minimizar el uso de combustibles fósiles y la acumulación de residuos biológicos no amigables para el medio ambiente. Adicionalmente, el uso de grasas animales para la obtención de biodiesel no implica comprometer grandes extensiones de suelos agrícolas, situación indispensable para obtener el biocombustible de aceites vegetales. En este trabajo se describe una metodología sencilla y rápida que permite la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos usando desechos grasos de pollo y una preparación enzimática producida por un consorcio bacteriano con capacidad lipolítica.

Materiales y Métodos.

1.- Material biológico.

1.1.- Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas, fueron suministradas por el Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA) como un consorcio bacteriano (CB), constituido por cinco cepas bacterianas aisladas de residuos grasos de pollo, dos pertenecientes al género *Pseudomonas*, dos del género *Bacillus* y una del género *Enterobacter*, todas con actividad lipolítica (19).

1.2.- Grasa animal.

Los residuos grasos de pollo fueron adquiridos de expendios de carne ubicados en Valencia, estado Carabobo, Venezuela.

2.- Obtención de grasa de pollo.

Inmediatamente de su ingreso al laboratorio los residuos grasos se licuaron durante 10 min, en

una licuadora doméstica a velocidad máxima, hasta obtener una pasta homogénea, la cual se trasvasó a un vaso de precipitados, incubándose el sistema a 70 °C durante 24 h. La grasa líquida, amarillenta y de olor característico, se separó de los residuos sólidos por filtración a través de gasa y finalmente fue almacenada a -20 °C, en recipiente tapados.

3.-Caracterización de la grasa de pollo.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos empleados para determinar la calidad de la grasa fueron índice de acidez (IA), porcentaje de ácidos grasos libres (%AGL), índice de saponificación (IS) índice de éster (IE) y porcentaje de glicerol, de acuerdo a los procedimientos indicados en la bibliografía (20).

4.-Crecimiento bacteriano.

El CB se reactivó en caldo nutritivo (HIMEDIA) y luego de su crecimiento, estimado por la turbidez desarrollada, se agregó 2 mL del cultivo a 200 mL de un medio mínimo mineral estéril (MMM) constituido por: 0,1 mL de CuSO_4 1% m/v; 0,5 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1% m/v; 2 mL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5% m/v; 0,5 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1% m/v; 0,5 mL de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1% m/v; 0,5 mL de NaCl 1% m/v; 0,1 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% m/v en un litro de tampón fosfato 0,1 M, pH 7 y 2 g de grasa. El sistema se incubó a temperatura ambiente (20-24 °C), con agitación constante (120 rpm) y el crecimiento bacteriano se estimó por turbidimetría a una longitud de onda de 540 nm, realizándose mediciones cada 24 h. La población bacteriana obtenida se utilizó en los siguientes experimentos.

5.- Consumo de grasa por el CB.

En matraces de 250 mL se adicionó 50 mL de MMM y 5 g de grasa, estableciéndose dos cultivos, un Control sin inóculo bacteriano y otro denominado Digestión al cual se agregó 1 mL de CB. Ambos sistemas se incubaron durante 96 h a 37 °C bajo agitación constante. Cada 24 h se retiraron alícuotas de 10 mL, las cuales se sometieron a la extracción de la grasa remanente mediante dos ciclos de extracción con 2 mL de *n*-hexano. El hexano se evaporó a 80 °C y la grasa extraída se determinó por gravimetría. El ensayo se realizó por triplicado.

6.- Preparación de lipasas extracelulares.

Alícuotas de 1 mL de CB se adicionaron a 50 mL de MMM suplementados con 0,5 g de grasa. El sistema se incubó a temperatura ambiente con agitación constante (160 rpm). Luego de 48 h de incubación el cultivo se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante libre de células (SLC) conteniendo las enzimas lipolíticas se conservó sobre hielo hasta su uso. El contenido de proteínas se determinó de acuerdo al método de Bradford (21).

7.- Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica.

La actividad lipolítica se determinó por titulación de los ácidos grasos liberados utilizando una emulsión de aceite de oliva como sustrato (22). El sustrato contenía aceite de oliva 10% v/v, goma arábiga 5% m/v y tampón fosfato 0,1 M, pH 7. La emulsión se estabilizó por agitación en una licuadora, aplicando cinco ciclos de agitación (1 min c/u) seguidos de reposo durante 2-3 min sobre hielo. La mezcla de reacción enzimática contenía 100 μL de SLC y 5 mL de la emulsión, incubándose a 37 °C, con agitación constante y retirándose alícuotas de 1 mL cada 2 min, hasta completar 8 min. Las alícuotas fueron mezcladas con 1 mL de una solución de acetona/etanol (1:1) y seguidamente la solución fue titulada con NaOH 0,5 M, usando fenolftaleína como indicador. Cada ensayo se realizó por triplicado. La unidad de actividad lipolítica (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido graso por minuto (23).

8.- Reacción de esterificación (producción de biodiesel).

La reacción se efectuó al mezclar 5 g de grasa con 7,6 mL de metanol (equivalentes a 6,9 g), y adicionando 2 mL de SLC. El sistema se incubó en baño de agua a 40 °C y agitación constante (300 rpm) y luego de 24 h la mezcla se trasvasó a un embudo de decantación y se dejó reposar por 24 h para permitir la separación de fases (24, 25, 26). La fase acuosa inferior, conteniendo glicerol, se descartó y la fase orgánica superior, conteniendo presumiblemente los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se conservó a -20 °C, en recipientes tapados, hasta su posterior análisis.

9.- Cromatografía de gases.

Alícuotas de 20 μL de la fase orgánica, provenientes de la transesterificación, se adicionaron a 80 μL de *n*-hexano, y la solución se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 680 N, utilizando una columna DB Waxetr de 100% polietilenglicol, 60 m de longitud, diámetro de 0,25 mm y grosor de película 0,25 μm (Agilent Technologies) bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial del horno 165 $^{\circ}\text{C}$; gradiente de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 270 $^{\circ}\text{C}$, manteniéndose por 2 min y con un flujo de helio de 1 mL/min como gas de arrastre; el tiempo total de corrida fue de 25 min; como sistemas de comparación, una muestra de grasa sin esterificar y una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos fue también analizada.

Resultados y Discusión.

La grasa obtenida de 200 g de residuo graso, después del licuado y calentamiento, fue de 82,19 g, representando un 41,2% del residuo inicialmente procesado, valor similar a lo reportado por otros autores (26). La temperatura (70 $^{\circ}\text{C}$) para obtener la grasa fue elegida para asegurar la fusión de los ácidos grasos presentes en la muestra (27), la cual presentó estado líquido a temperatura ambiente. Los análisis de la grasa se detallan en la tabla 1.

Tabla 1
Parámetros químicos de la grasa de pollo.

Índice de Acidez (IA)	20 \pm 2 mg KOH/g
Índice de Saponificación (IS)	226 \pm 2 g/mol
Índice de Éster (IE)	206 \pm 2 mg KOH/g
Contenido de Glicerol	11 \pm 1 %
Contenido de Ácidos Grasos Libres (%AGL)	10 \pm 2 %

Los valores de IA de 20 \pm 2 mg/g, equivalente a 10 \pm 2% de AGL fueron similares a los reportados por otros laboratorios (28,29,16), valores de 10-15% de AGL, en grasa animales, son usualmente considerados altos. Estos índices permiten determinar la integridad química de las grasas. Altos valores son indicativos de procesos de deterioro por factores ambientales (oxidación, peroxidación)

o por ataques microbiológicos. El contenido relativamente alto de AGL en la muestra podría ser debida al calentamiento utilizado para la obtención de la grasa, lo cual tiende a degradar los triglicéridos. El IS, define la cantidad de KOH necesaria para neutralizar los ácidos grasos e hidrolizar un gramo de grasa y suministra un estimado del peso molecular medio de los ácidos grasos constituyentes de la grasa, estableciéndose una relación inversa entre IS y el peso molecular de los ácidos grasos. En nuestro caso se obtuvo un IS de 226 \pm 2 g/mol, otros laboratorios han reportados valores de 196,9 - 275,95 g/mol y un contenido mayoritario (37-44%) de ácido oleico (29, 30, 31). El índice IE representa la cantidad de glicerol por gramo de grasa luego de la saponificación, obteniéndose un valor de 206 \pm 2 mg de KOH/g equivalente a 11 \pm 1% de glicerol en la muestra. De acuerdo al IS y calculándose el peso molecular de la grasa (715 g/mol) teóricamente se ha debido obtener un 12,85% de glicerol, un valor similar al obtenido en nuestras determinaciones. Este parámetro es alto en grasas que han sufrido procesos hidrolíticos en los cuales se genera glicerol por acción, entre otros factores de temperaturas relativamente altas. Asumiendo que un mol de ácido graso medio reacciona con 56 g de KOH y que un IA de 19,78 mg representa 80,6 mg de ácidos grasos, los AGL equivaldrían a 8,06% en la grasa, de nuevo valor similar al obtenido en este trabajo (10 \pm 2%). En conjunto estos datos indican un estado aceptable de la grasa a utilizarse para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos. En la figura 1 se muestra el comportamiento del cultivo en presencia de grasa de pollo como única fuente de carbono. Inicialmente, el cultivo transparente, se tornó blanquecino, observándose a las 24 h un incremento importante de la turbidez (equivalente a 0,72 unidades de absorbancia) para luego estabilizarse hasta las 72 h (0,75-0,8 ua) y disminuir a las 96 y 120 h de incubación a valores de 0,3 ua. La turbidez no desapareció, ni se detectó separación de fases al dejar el cultivo en reposo. La turbidez se debe fundamentalmente a la emulsificación de la grasa por la actividad bacteriana, de tal manera, durante el progreso de la reacción, las lipasas bacterianas generan mono y diglicéridos y sales de los ácidos grasos (jabones), moléculas surfactantes (32,33). Adicionalmente a partir de las 24 h se observó una capa espumosa sobre la superficie del cultivo, la cual

persistió durante toda la incubación, corroborando la producción de surfactantes por el CB. Ninguno de estos cambios se detectó en el sistema Control, el cual permaneció transparente, mostrando gotas de grasa en su superficie. Bajo tales circunstancias, el aumento en biomasa bacteriana, debida a turbidez, fue enmascarado por la emulsificación de la grasa, no obstante el sedimento bacteriano obtenido de alícuotas del cultivo, incrementó respecto al tiempo de incubación (datos no mostrados). El desarrollo de turbidez puede ser considerado como una medida indirecta de actividad lipolítica bacteriana. Estas consideraciones se demostraron al determinar la grasa remanente en los sistemas Control y Digestión, datos que se tabulan en la tabla 2.

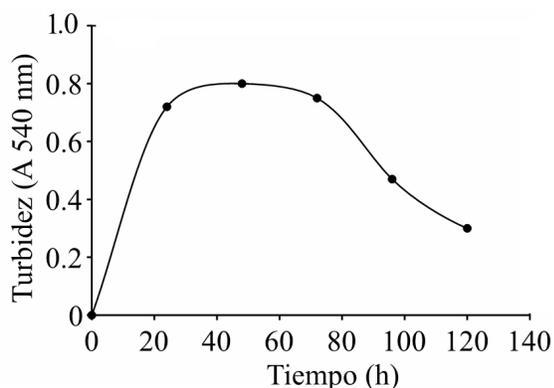


Figura 1: Comportamiento del cultivo mixto bacteriano

En el sistema Control la grasa remanente permaneció constante respecto al tiempo de incubación (aproximadamente 1 gramo), mientras que en el sistema Digestión se detectó una disminución progresiva de la grasa remanente, a las 24 h se determinaron 0,87 g de grasa (0,133 g consumidos) disminuyendo a valores de 0,06 g a las 96 h de incubación (0,950 g consumidos), lo cual representó una degradación equivalente al 94%. La variación de pH fue de 0,1 unidades de pH hacia el lado alcalino o ácido, manteniéndose prácticamente constante a pH 7 durante el tiempo de incubación (ver tabla 2). Esta situación es importante debido a que pH alcalinos tienden a inhibir la reacción de esterificación cuando el catalizador empleado es una base fuerte, KOH, NaOH (28). Una vez corroborada la capacidad lipolítica del CB, se

procedió a determinar la actividad de lipasas en un sistema in vitro mediante la titulación de los ácidos grasos liberados, usando aceite de oliva como sustrato (19, 22, 32). Los resultados se muestran en la figura 2. La acidez generada incrementó linealmente desde 0,032 mmoles de ácidos grasos a los 2 min de incubación hasta 0,07 mmoles a los 8 min. La recta de actividad, calculada por regresión lineal, respondió a la ecuación $Y = 0,0061X + 0,02$ ($R^2 = 0,9864$). La pendiente, 0,0061 mmoles/min, representa la tasa de reacción de las lipasas producidas y excretadas al medio de cultivo por el CB. La determinación de proteínas en el SLC indicó 320 μg de proteína por mL, lo que permitió el cálculo de la actividad específica de las lipasas, la cual se ubicó en 0,19 $\mu\text{moles} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. En términos de unidades, el extracto enzimático posee 6,1 $\text{U} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. Una comparación de la actividad específica del SLC con preparaciones bacterianas comerciales, cuyas actividades oscilan entre 15 y 300 U/mg (34), indicó una alta actividad, 190 U/mg . Si se considera que el SLC no fue sometido a ningún paso de purificación, es posible suponer que preparaciones de esta mezcla enzimática pudiesen ofrecer mayores actividades específicas. En la figura 3 se muestra los resultados de la cromatografía de gases de la muestra de grasa antes (figura 3A) y después (figura 3B) de la reacción de transesterificación mediada por SLC. En el sistema sin tratamiento la única señal detectada, con un tiempo de retención de 2,64 min, correspondió al *n*-hexano, solvente usado para analizar los ésteres metílicos, de tal manera que los ácidos grasos y triglicéridos presentes en la muestra de grasa, con elevados puntos de fusión, no pueden ser volatilizados a las temperaturas de la cromatografía de gases y por tanto no se detectan, solo los ésteres de los ácidos grasos son volatilizados (35) cuyos puntos de ebullición se ubican entre 84 y 125 $^{\circ}\text{C}$ dependiendo de la longitud de la cadena carbonada. En la muestra transesterificada se detectaron fundamentalmente seis señales en el intervalo de 8,87 y 13,78 min, que presumiblemente corresponden a ésteres metílicos de ácidos grasos. Las señales, indicándose su tiempo de retención y abundancia relativa, fueron asignadas a los ácidos palmítico (8,87 min, 22,4%), palmitoleico (9,18 min, 5,2%), esteárico (11,91 min, 7,6%), oleico (12,27 min, 35,7%), linoleico (12,92 min, 26,5%) y linolénico (13,78 min, 2,5%). Las diferencias

en términos de abundancia podrían indicar las proporciones en que se encuentran los diferentes ácidos grasos en la grasa, las cuales pueden variar de acuerdo a la raza del pollo, su alimentación, sexo, edad y medio ambiente (30). Otras posibilidades, considerando que las lipasas pueden presentar diferentes tasas de reacción de acuerdo a la longitud de la cadena carbonada de los ácidos grasos (36) y que la preparación enzimática proviene de cinco cepas bacterianas, serían un reflejo de la heterogeneidad de la población de lipasas presentes en el SLC y/o a un tiempo insuficiente para la total hidrólisis y transesterificación de la muestra de grasa. Es relevante indicar ventajas que ofrece la catálisis enzimática sobre la catálisis química en la transesterificación con grasas. La catálisis alcalina se ve reducida cuando la grasa presenta contenidos relativamente altos (10-15%) de AGL (15, 16, 28) y la catálisis ácida ha sido reportada lenta en transesterificaciones usando triglicéridos como

substrato (28), en ambos casos los rendimientos de la reacción son bajos. Además, para la transesterificación de grasas con elevados niveles de AGL, se han diseñado protocolos experimentales orientados a reducir los AGL, lo cual incrementa los costos en la producción de biodiesel (16,28). Esta problemática no es inherente a la catálisis enzimática, la cual transcurre adecuadamente aún en presencia de altos niveles de AGL, pues las lipasas catalizan la reacción usando triglicéridos y/o mezclas de triglicéridos/ácidos grasos libres (15). Adicionalmente, aunque las grasas animales, y particularmente la de pollo, son de bajo costo (15, 16) y fácil adquisición, su uso para la producción de biodiesel es reducido (16). Finalmente, la producción de biodiesel por vía enzimática ha sido ejecutada generalmente con enzimas purificadas y/o inmovilizadas (17,37) y de origen fúngico, siendo escasa la información sobre el uso de enzimas bacterianas.

Tabla 2
Cantidad de grasa y variación de pH respecto al tiempo de incubación.

Tiempo (h)	Grasa Remanente* y pH		Grasa Consumida*			
	Control	pH	Digestión	pH	(g)	%
0	1,04 ± 0,04	7,0	1,06 ± 0,04	7,0	0	0
24	1,00 ± 0,03	7,1	0,87 ± 0,02	7,0	0,133	13,3
48	1,01 ± 0,04	7,1	0,35 ± 0,08	7,0	0,663	65,4
72	0,96 ± 0,04	7,0	0,17 ± 0,01	6,9	0,786	82,2
96	1,01 ± 0,06	7,1	0,06 ± 0,02	6,9	0,950	94,0

*Los valores corresponden a alícuotas de 10mL de cultivos de 50mL

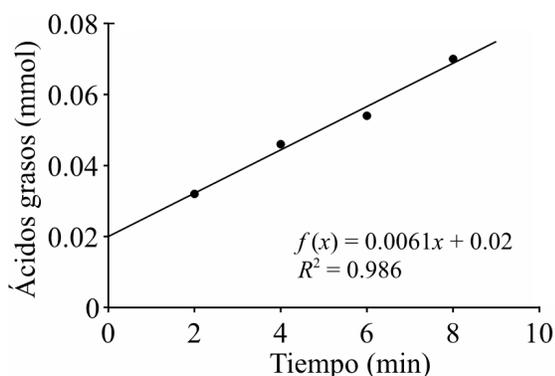


Figura 2: Actividad lipolítica del sobrenadante libre de células

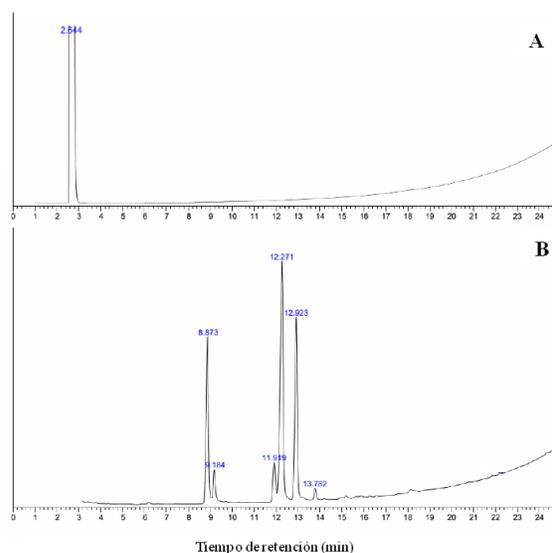


Figura 3: Cromatograma de productos obtenidos por la transesterificación de la grasa de pollo con metanol.

Conclusión.

La transesterificación de la grasa de pollo con un alto contenido ($10\pm 2\%$) de ácidos grasos libres fue catalizada por un extracto crudo de lipasas obtenidas de un consorcio bacteriano aislado de residuos grasos industriales. Los productos de la reacción, efectuada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, se identificaron como los ésteres metílicos de los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linoléico (C18:3).

Referencias Bibliográficas.

- MAKI ML, LEUNG KT, QIN W. *Int J Biol Sci* 5(5):500-516. 2009.
- SONG YS. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37:333-339. 2009.
- SUN N, WANG H, LIN J, QI Y. *Env Sci Inf Applicat Technol* 1:162-166. 2009.
- CIRNE DG, PALOUMET X, BJÖRNSSON L, ALVES MM, MATTIASSON B. *Renew Energy* 32(6):965-975. 2007.
- CHIN SP, ISMAIL NS, AL ASHRAF AA, YAHY ARM. *J Bioremed Biodegrad* 1(3):1-6. 2010.
- DUTTA K., DAVEREY A., LIN JG. *Renew Energy* 69:114-122. 2014.
- KUSHWAHA P, SRIVASTAVA V, MALL I. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(5):442-452. 2011.
- SANTOS-CORREA IN, DE SOUSA SL, CATRAN M, BERNANDES OL, PORTILHO MF, PEREIRA-LANGONE MA. *Enzyme Res* 2011. ID 814507:1-8. 2011.
- DEMIRBAS A: *Energy Convers and Manag* 49(1):125-130. 2007.
- DIZGE N, KESKINLER B. *Biomass Bioenergy* 32:1274-1278. 2008.
- RASHID U, ANWAR F. *Fuel* 86:265-271. 2007.
- XUEJUN LP, XIANGLAN P, YUJUN W, SHENLIN Z, HUAYANG H. *Fuel* 87:1076-1082. 2008.
- ZHANG Z, GUAN C. *Front Agri China* 4(2):129-136.2010.
- CUNHA Jr A, FEDDEM V, MARINA C, HIGARASHI MM, DE ABREU PG, COLDEBELLA A. *Fuel* 105:228-234. 2013.
- RIVERA I, VILLANUEVA G, SANDOVAL G. *Grasas y Aceites* 60(5):468-474. 2009.
- ALPTEKIN E, CANAKCI M. *Fuel* 90:2630-2638. 2011.
- LEE KT, FOGLIA TA, CHANG K. *J Amer Oil Chem Soc* 79(2):191-195. 2002.
- HAAS MJ, MCALOON AJ, YEE WC, FOGLIA TA. *Bioresour Technol* 97:671-678. 2006.
- GONZÁLEZ D, AMAÍZ L, MEDINA L, VARGAS R, IZZEDDIN N, VALBUENA O. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(2):105-118. 2012.
- ZUMBADO H. *Análisis Químico de los Alimentos: Métodos Clásicos*. Editorial Universitaria, La Habana, Cuba. 249-251. 2004.
- BRADFORD MM. *Anal Biochem* 72 (1-2):248-254. 1976.
- SIRISHA E, RAJASEKAR N, NARASU ML. *Adv Biol Res* 4(5):249-252. 2010.
- JENSEN RG. *Lipids* 18:650-657. 1983.
- VIEIRA AP, DA SILVA MAP, LANGONE MAP. *Lat Amer Appl Res* 36:283-288. 2006.
- HEMMAT Y, GHOBADIAN B, LOGHAV M, KAMGAR S, FAYYAZI E. *Intl Res J Appl Basic Sci* 5(1):84-91. 2013.
- AMBER A, FAKHRA A, AMMARA S. *Int Res J Environment Sci* 3(6):67-74. 2014.
- NELSON D, COX MM. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman. New York. USA. 364. 2004.
- CANAKCI M, VAN GERPEN J. *Trans ASAE* 44(6):1429-1436. 2001.
- MATA TM, MENDES AM, CAETANO NS, MARTINS AA. *Chem Enginer Transac* 38:175-180. 2014.
- MING CC, GIOIELLI LA, SOLIS VS. *Grasas y Aceites* 53(3):298-303. 2002.
- VAN GERPEN J. *Farm Energy*. Enero 31. 2014.

32. DANIELE A, AMAÍZ L, MEDINA L, VALBUENA O. *Ciencia* 19(3):173-180. 2011.
33. BECKER P, ABU-REESH I, MARKOSSIAN S, ANTRANIKIAN G, MÄRKEL H. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(2):184-190. 1997
34. SIGMA-ALDRICH. *Aldrich Handbook. A catalogue of fine chemicals and laboratory equipment*. Sigma Aldrich. pp 587-590. 2014.
35. REY FJ, CHAMORRO O, MARTIN-GIL FJ, MARTIN-GIL G. *J Thermal Analysis Calorim* 40:463-473. 1993.
36. GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(6):763-781. 2004.
37. JAGANNATHAN KR, ABANG S, PONCELET D, CHAN ES, RAVINDRA P. *Cri Rev Biotechnol* 28:253-264. 2008.



CIENCIA

Vol. 23. N°4, Diciembre 2015 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en Diciembre de 2015, por el **Fondo Editorial Serbiluz**, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve