

Comparison of Different Latex Fractions of *Carica Papaya* L., and Novozyme 435® in the Methanolysis of Canola Oil

Viviana Ortega Afanador
Universidad del Atlántico

Miriam Fontalvo Gómez
Universidad del Atlántico

Dary Mendoza Meza
Universidad del Atlántico

Received: March 2, 2018

Accepted: Jun 22, 2018

Pag. 75-90

Abstract

The activity of crude (P_3) and protease-free (CPL-p) fractions of latex from *Carica papaya* in the lipolysis and methanolysis of canola oil were investigated. P_3 and CPL-p fractions were extracted from *C. papaya* fruits collected in the department of Atlántico (Colombia), obtaining extraction yields of 26.89 ± 0.26 and 4.85 ± 0.04 g/100 g of fresh latex, respectively. The lipase activity of the CPL-p, determined by titration of the fatty acids was 58.4% greater than P_3 . Both fractions were evaluated as catalysts in the production of fatty acid methyl esters (FAME). The lipase B from *Candida antarctica* (Novozyme 435®) was used as a reference catalyst. All reactions were carried out in a batch-type bioreactor for 48 h, at 200 rpm and 50 °C. The conditions of reaction with P_3 and CPL-p were: 6 g oil, 20 %w/w n-hexane, 15 %w/w catalyst, methanol/oil molar ratio of 3:1. The conversions obtained were: $P_3 = 31.55 \pm 1.01$ %, CPL-p = 38.48 ± 0.76 % and Novozyme 435 = 62.96 ± 0.63 %. These results demonstrate the potential of CPL-p for the hydrolysis of vegetable oils used in the food industry. However, under the experimental conditions used in the present study, its application in the production of FAME is limited. It is concluded that the latex of the papaya's fruit, from the trees that are grown in the Colombian Caribbean region, is an agroindustrial by-product with a high potential in lipid bioconversion.

Keywords: *C. papaya*; P_3 ; CPL-p; Novozyme 435; Enzymatic methanolysis.

DOI: 10.25100/rc.v22i1.7102

Comparación de diferentes fracciones del látex de *Carica papaya* L., y Novozyme 435® en la metanólisis del aceite de canola

Resumen

Se investigó la actividad de las fracciones crudas (P_3) y libres de proteasas (CPL-p) del látex de *Carica papaya* en la lipólisis y metanólisis del aceite de canola. Las fracciones P_3 y CPL-p fueron extraídas de frutos de *C. papaya* colectados en el departamento del Atlántico (Colombia), obteniéndose rendimientos de extracción del $26,89 \pm 0,26$ y $4,85 \pm 0,04$ g/100 g de látex fresco,

respectivamente. La actividad lipasa de CPL-p, determinada mediante titulación de ácidos grasos fue 58,4% mayor con respecto a P_3 . Ambas fracciones fueron evaluadas como catalizadores en la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). Como catalizador de referencia se usó la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme 435®). Las reacciones se llevaron a cabo en un bioreactor tipo batch durante 48 h, a 200 rpm y 50 °C. Las condiciones de reacción con P_3 y CPL-p fueron: 6g de aceite, 20 %p/p de n-hexano, 15 %p/p del catalizador y relación molar metanol/aceite de 3:1. Los porcentajes de conversión obtenidos fueron: P_3 = 31,55±1,01 %, CPL-p = 38,48±0,76 % y Novozyme-435 = 62,96±0,63 %. Estos resultados demuestran el potencial de CPL-p en la hidrólisis de aceites de interés en la industria de los alimentos. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales usadas en el presente estudio, su aplicación en la producción de EMAG fue limitada. Se concluye que el látex del fruto de *C. papaya*, de los árboles que se cultivan en la región del Caribe colombiano, es un subproducto agroindustrial con un alto potencial en la bioconversión de lípidos.

Palabras clave: *C. papaya*; P_3 ; CPL-p; Novozyme 435; Metanólisis enzimática; Lipasa.

1 Introducción

El uso masivo de combustibles fósiles como fuente principal de energía se ha asociado con el aumento en la emisión de gases invernadero y la contaminación ambiental ⁽¹⁾; por tal motivo, se ha intensificado la búsqueda de fuentes energéticas más limpias y amigables con el ambiente. El biodiesel es considerado un combustible limpio y renovable, su producción a escala industrial se realiza mediante la transesterificación química de triacilglicéridos (TAG) con un alcohol de cadena corta, para obtener ésteres mono-alquílicos de cadena larga ⁽²⁾. Este proceso requiere de reactantes de alta pureza y condiciones de procesamiento a temperaturas y presiones altas, así como pasos complejos de purificación que permitan obtener un producto que cumpla con las especificaciones de las normas internacionales para el biodiesel (EN14214 y ASTM 6751-09) ^(3,4). Por lo anterior, actualmente un área de intensa investigación es la búsqueda y/o desarrollo de catalizadores novedosos que sean económicos y que no generen sub-productos.

Las lipasas EC. 3.1.1.3. se utilizan como catalizadores en reacciones de esterificación, alcoholisis, acidólisis e inter-esterificación en ambientes no acuosos y/o con muy baja actividad de agua ^(5,6); además, son quimio, regio y/o enantio-selectivas al sustrato ⁽⁷⁾, lo que las hace atractivas para la síntesis de biodiesel mediante transesterificación enzimática. Actualmente, la transesterificación enzimática se realiza principalmente con lipasas microbianas, provenientes de hongos como *Mucor miehei* (Lipozym IM 60® y Lipozyme TL IM®), *Candida antarctica* (Novozym 435®), *Pseudomonas cepacia* (PS 30) y *Rhizopus oryzae*, obteniendo porcentajes de conversión > 90%, usando metanol como aceptor de acilos ^(8,9). A pesar de sus ventajas, la mayoría de las lipasas microbianas son inestables en presencia de alcoholes de cadena corta como metanol y etanol ⁽¹⁰⁾, por lo que suelen usarse en forma inmovilizada, generando un incremento en los costos de producción del biodiesel, haciéndolas poco atractivas a nivel comercial. A la fecha, China es el primer país del mundo que incursiona en la producción industrial de biodiesel usando lipasas como catalizadores, con una capacidad de producción de 20.000 toneladas por año ⁽¹¹⁾.

Por otra parte, diferentes estudios reportan que las lipasas vegetales pueden usarse en la transesterificación enzimática de aceites, reportándose resultados prometedores con lipasas provenientes del látex del fruto de *C. papaya* L. (familia: Caricaceae) ^(12,13,14). El

látex del fruto de *C. papaya* presenta un complejo de enzimas lipolíticas (denominado CPL), que se encuentran naturalmente inmovilizadas en una matriz polimérica insoluble en agua, lo que las hace muy estables a la desnaturalización en un rango amplio de valores pH y temperatura y/o en presencia de solventes orgánicos, comparadas con las lipasas microbianas libres ^(15, 16); además, pueden recuperarse y reutilizarse en futuros ciclos de reacción. CPL ha sido utilizado en la bioconversión de lípidos, principalmente en reacciones de lipólisis, alcoholisis e interesterificación. Sin embargo, para que CPL genere procesos económicamente viables, es necesario identificar las materias primas que permitan obtener buenos rendimientos en los procesos de bioconversión.

Previamente se demostró que en las reacciones de lipólisis ⁽¹⁷⁾ e interesterificación ⁽¹⁸⁾, las lipasas del látex de *C. papaya* exhiben estereoselectividad *sn*3 y selectividad por TAG de cadena corta. Estudios posteriores demostraron que fracciones del látex de *C. papaya* también presentan diferencias de especificidad por TAG, lo cual sugiere la existencia de por lo menos tres enzimas lipolíticas con propiedades catalíticas diferentes ⁽¹⁹⁾. Rivera y Sandoval ⁽²⁰⁾ demostraron que la fracción cruda del látex exhibe preferencia por TAG de cadena corta, mientras que la fracción libre de proteasas (denominada CPL-p) y otra fracción libre de estereasas (denominada CPL-e) son más activas sobre TAG de cadena mediana y larga, respectivamente. Adicionalmente, estas fracciones exhiben condiciones en lo relacionado con la temperatura y pH óptimo de reacción, así: 40 °C y pH 8,5 para la hidrólisis de TAG de cadena corta; 50° C y pH 9,0 para TAG de cadena larga ⁽²⁰⁾. A la fecha, el mejor conocimiento de las lipasas parcialmente purificadas del látex de *C. papaya* se refiere a su actividad lipolítica.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Colombia es uno de los principales países productores del fruto de papaya en América ⁽²¹⁾, siendo la región Caribe colombiana una de las zonas con mayor cultivo ⁽²²⁾. No obstante, su principal uso en el país es el consumo del fruto, siendo subestimada la utilización del látex como subproducto agroindustrial. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como propósito investigar el uso de las fracciones P₃ y CPL-p del látex del fruto de *C. papaya*, cultivado en el departamento del Atlántico (Colombia), en la lipólisis y metanólisis del aceite de canola. La selección del aceite de canola se basó en el contenido mayoritario de TAG de cadena larga, mono y poliinsaturados ⁽²³⁾. Para evaluar la eficiencia de la reacción de metanólisis, los porcentajes de conversión del aceite se compararon con los obtenidos con una enzima de referencia, la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina acrílica, cuyo nombre comercial es Novozyme 435. Los resultados mostraron que CPL-p presenta mayor actividad lipolítica del aceite de canola comparado con P₃; sin embargo, la actividad de esta fracción en la reacción de metanólisis fue significativamente menor al obtenido con Novozyme 435. En consecuencia, se hace necesario realizar estudios para incrementar el rendimiento de la reacción de transesterificación, así como explorar el uso de estas fracciones en otras áreas diferentes al sector energético.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

Metanol $\geq 99,9$ % de pureza (CAS 67-56-1), n-hexano (CAS 110-53-3) y Triton® X-100 (CAS 9036-19-5) fueron adquiridos en Merck® (Darmstadt, Germany). Para la reacción de metanólisis se utilizó aceite de canola tipo comercial marca WESSON®. La lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme 435®) fue adquirida con Sigma-Aldrich.

2.2 Látex de *C. papaya*

El látex de *C. papaya* fue obtenido de un cultivo ubicado en el municipio de Ponedera, departamento del Atlántico (Colombia), previa confirmación botánica de la especie en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Colección # 676924). El látex se recolectó en horas de la mañana, directamente desde frutos verdes, siguiendo el procedimiento descrito por Madrigal y colaboradores en 1980⁽²⁴⁾. El látex fresco se obtuvo realizando incisiones longitudinales de 2 mm de profundidad sobre la epidermis del fruto, usando una cuchilla de acero inoxidable (Figura 1). El látex exudado se recolectó en recipientes de plástico limpios que se transportaron rápidamente al laboratorio, en condiciones refrigeradas (4 – 8° C).



Figura 1. Recolección del látex de *C. papaya*. Autor: Viviana Ortega Afanador

2.3 Obtención de las fracciones del látex de *C. papaya*

El látex fresco se secó durante 48 h a 42° C en un horno Thermolab TH240–Dies, luego se pulverizó hasta obtener un material fino de color blanco, que corresponde a la fracción cruda P₃. La fracción CPL-p se obtuvo a partir de P₃, siguiendo un protocolo descrito previamente^(20, 25). La mitad del material P₃ obtenido se lavó cinco veces con agua destilada a una temperatura de 4° C, usando una relación peso/volumen del 0,15 %. El material insoluble en agua, que contiene la lipasa activa, se recuperó después de cada lavado mediante centrifugación a 5,000 rpm durante 20 min en un equipo Beckman modelo GPR, luego se liofilizó en un equipo LABCONCO® Freeze Dryer de 2,5 L, por

72 h, a -46°C y 0,098 mbar de presión. Las fracciones P_3 y CPL-p se almacenaron a -20°C en un congelador Panasonic (Biomedical Freezer Serie MDF-U5412).

2.4 Actividad lipolítica de las fracciones P_3 y CPL-p

La actividad lipolítica de las fracciones P_3 y CPL-p fue determinada mediante la reacción de hidrólisis de los TAG contenidos en el aceite de canola. Los ácidos grasos (AG) liberados se determinaron mediante titulación ácido-base, siguiendo el procedimiento descrito por Rivera y colaboradores en 2014 ⁽²⁰⁾, con pocas modificaciones. La reacción se inició en una incubadora con agitación orbital (Shel Lab SSI2-2 Mini Shaker®) a 50°C y 500 rpm, durante 60 min. La mezcla de reacción consistió en: 2.5 g de aceite de canola, 5 μL de Tritón X-100, 1 mL de Tris-HCl 50 mM (pH: 9) y 5% del catalizador (con relación al peso del aceite). Finalizado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con la adición de 5 mL de una mezcla neutra de acetona/etanol (1:1, v/v). Los ácidos grasos liberados del proceso anterior fueron titulados con una solución de NaOH (0,0969 M) previamente valorada. La mezcla de reacción en ausencia del catalizador fue usada como referencia. Los resultados fueron expresados en unidades de actividad lipolítica específica (U. g⁻¹), definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de AG por minuto por gramo (g) de enzima inmovilizada (Ecuación 1).

$$1\text{U} = \frac{\mu\text{mol AG libres}}{\text{min de reacción} \times \text{g de enzima}} \quad (1)$$

2.5 Caracterización del aceite de canola

Se determinó la acidez del aceite de canola, usando el procedimiento descrito en la norma Icontec 5555-95: “Metodología estándar para la determinación de ácidos grasos libres contenidos en grasas animales, aceites marinos y vegetales” ⁽²⁶⁾. El perfil de AG del aceite de canola se determinó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), en un equipo CG-EMD HP-7890B/MSD-5977 Agilent, con un inyector automático ALS Agilent 7693 *Autosampler*. Un volumen de 1 μL de muestra disuelta en éter de petróleo se inyectó en modo Split (relación 50:1) en el puerto de inyección del equipo a una temperatura de 140°C . La separación se llevó a cabo en una columna capilar (30 m x 250 μm , 0.25 μm de espesor, compuesta de difenilpolidimetilsiloxano AT-5). El gas de corrida fue helio, con flujo constante de 50 mL/min y presión de cabeza de 12,775 psi. La temperatura de la columna fue programada desde 140°C a 240°C a una tasa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, aumentando la temperatura a razón de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 260°C y $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 300°C . El tiempo de corrida total fue de 32 min. El detector selectivo de masa MSD-5977 fue ajustado para escanear en el intervalo m/z 45,00 a 550,00. Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con los reportados en la base de datos NIST (*Mass spectral library* NIST11).

2.6 Metanólisis del aceite de canola con KOH

La metanólisis del aceite de canola se llevó a cabo en un reactor tipo batch, siguiendo el procedimiento descrito por Fontalvo y colaboradores en 2013 ⁽²⁷⁾. Se calentó 10 g de aceite de canola a una temperatura máxima de 45°C en un equipo Thermo Scientific

Cimarec 25-540° C AG083. Se adicionó a la mezcla 1,5 % de KOH (con respecto al peso del aceite) y metanol del 99,9 % de pureza, en una relación molar 6:1 de metanol/aceite, seguido se mezcló en un agitador orbital vórtex 2,500 rpm durante 90 min. Finalizada la reacción, los EMAG se separaron del glicerol mediante decantación en un embudo; la fase superior, conteniendo los ésteres y otros contaminantes, se lavó varias veces con H₂O destilada y luego con HCl 0.5 % v/v hasta obtener un pH 6-7 en las aguas de lavado. La mezcla de ésteres de metilo obtenida se secó con Na₂SO₄ sólido anhidro (CAS 7757-82-6), luego se filtró al vacío, se pesó y posterior se almacenó. El rendimiento de la producción de biodiesel se calculó con la Ecuación 2.

$$\frac{(\text{Peso del biodiesel de canola (g)})}{(\text{Peso del aceite de canola (g)})} \times 100 \quad (2)$$

2.7 Metanólisis del aceite de canola con Novozyme 435

Se realizó siguiendo las condiciones descritas por Winayanuwattikun y colaboradores en 2008⁽²⁸⁾, con algunas modificaciones. La reacción se llevó a cabo en un reactor tipo batch a una temperatura de 40° C y 55° C, agitación constante de 200 rpm y tiempo de reacción de 24 h. La mezcla de reacción consistió en: 6 g de aceite de canola, 30 % de n-hexano (con respecto al aceite), 13 % de Novozyme 435 (con respecto al aceite) y relación molar 3:1 metanol/aceite. El metanol se adicionó en tres etapas con el propósito de minimizar la inactivación de la enzima. Finalizado el tiempo de reacción, se adicionaron 3 mL de n-hexano a la mezcla, seguido de agitación suave por 5 min y filtración al vacío para separar la enzima Novozyme. El filtrado, conteniendo los EMAG, se dejó en campana de extracción durante 5 días para garantizar la evaporación completa del solvente. El producto se almacenó a 4° C en viales de vidrio color ámbar.

2.8 Metanólisis con las fracciones del látex de *C. papaya*

Con el propósito de evaluar cuál de las fracciones estudiadas del látex del fruto de la *C. papaya* presentaba mayor actividad enzimática en la reacción de metanólisis del aceite de canola, se realizó un diseño experimental²², considerando los siguientes factores: tipo de enzima (P₃ y CPL-p) y relación molar metanol : aceite (3:1 y 6:1). La reacción se llevó a cabo en un reactor tipo batch a una temperatura de 50° C, 200 rpm y un tiempo de reacción de 48 h. La mezcla de reacción consistió en: 6 g de aceite de canola, 20 % n-hexano (respecto al peso del aceite) y 15 % del catalizador (respecto al peso del aceite). Para detener la reacción se añadieron 3 mL de n-hexano, seguido de filtración al vacío para separar la enzima. El solvente se evaporó en campana y el producto se almacenó a 4° C en viales de vidrio color ámbar.

2.9 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los productos de las reacciones de metanólisis se analizaron por CCF siguiendo la metodología descrita por Fedosov y colaboradores, 2011⁽²⁹⁾ con algunas modificaciones. Brevemente, un volumen de 2μL de cada muestra se sembró en cromatoplasmas de Silica gel (TLC Silica gel 60 F254, 25 *Aluminum sheets* 20 X 20 cm, Merck Millipore®). La fase

móvil consistió en una mezcla de n-hexano/acetato de etilo/ácido acético (90:10:1). Las cromatoplasmas se revelaron en una cámara saturada con vapores de yodo. Posteriormente, se realizó el análisis de las cromatoplasmas con el software JustQuantifyFree (<http://justquantify.eu/DefaultHD.aspx>), para determinar el valor de Rf y la densidad óptica de la señal correspondiente a los EMAG en el biodiesel de referencia (biodiesel de canola obtenido con KOH) y en los productos de la metanólisis enzimática. Se realizó una aproximación al cálculo de la productividad de la metanólisis, usando la Ecuación 3.

$$\text{Productividad (\%)} = \frac{(\text{Densidad óptica de la señal de EMAG en la muestra})}{(\text{Densidad óptica de la señal de EMAG en el biodiesel referencia}) \times 100} \quad (3)$$

2.10 Análisis de los datos

Las reacciones de lipólisis y metanólisis se realizaron por duplicado. Los datos obtenidos se tabularon en una hoja de cálculo del programa Excel 2011 de Microsoft® para Mac, versión 14.4.0. Luego, fueron exportados al software de acceso libre “R studio” Versión 0.99.473–©2009-2015, para los análisis estadísticos. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm 1 desviación estándar (DE). Para establecer una diferencia significativa entre los tratamientos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, previa comprobación de los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad de los datos.

3. Resultados y discusión

3.1 Fracciones del látex de *C. papaya*

Después del secado, el látex crudo de *C. papaya* adquirió un color amarillo pálido que luego se tornó blanco al pulverizarlo. El rendimiento de la obtención de la fracción P₃ fue de 26,89 \pm 0,26 %, mientras que el rendimiento de obtención de la fracción CPL-p fue de 4,85 \pm 0,04 %, con respecto al peso de látex fresco inicial (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de obtención de las fracciones P₃ y CPL-p del látex de *C. papaya*.

Muestra	Látex (g)	P ₃		CPL-p	
		Peso (g)	Rendimiento (%)	Peso (g)	Rendimiento (%)
1	29,569	8,036	27,178	1,423	4,813
2	35,254	9,395	26,649	1,705	4,837
3	42,467	11,398	26,839	2,078	4,893
Media	35,763	9,609	26,889	1,735	4,847
DE	6,464	1,691	0,268	0,328	0,041

3.2 Actividad lipolítica de las fracciones del látex de *C. papaya*

La actividad lipolítica de las fracciones P₃ y CPL-p en la reacción de lipólisis del aceite de canola fue $77,09 \pm 1,52$ U.g⁻¹ y $185,29 \pm 2,59$ U.g⁻¹ respectivamente, a pH 9 y temperatura de 50° C. El análisis de ANOVA con un $\alpha = 5$ %, demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las actividades de estas dos fracciones ($F = 233$; $\text{valor-}p = 0,0004$), siendo CPL-p la que presenta mayor actividad. Se plantea que la eliminación de las proteasas concentra las lipasas presentes en el látex crudo de *C. papaya*, causando un incremento significativo (58,4 %) en la capacidad de CPL-p para hidrolizar los TAG de cadena larga (C16 y C18) presentes en el aceite de canola. Previamente, Rivera y colaboradores (2014) habían comparado la actividad lipolítica de las fracciones P₃ y CPL-p, usando como sustratos Tributirina (C4:0), Trioctanoína (C8:0) y aceite de oliva extra virgen con un contenido mayoritario de trioleína (C18:1), encontrando que CPL-p incrementa la hidrólisis de trioctanoína (AG de cadena mediana) pero no la del aceite de oliva⁽²⁰⁾. Adicionalmente, Campillo-Alvarado & Tovar-Miranda (2013) reportaron mayor actividad lipolítica de las lipasas del látex de *C. papaya* sobre TAG de cadenas corta y mediana⁽³⁰⁾. En nuestro estudio la fracción CPL-p fue más activa en la hidrólisis del aceite de canola, comparada con la fracción P₃; en consecuencia, CPL-p sería más útil para la biotransformación de aceites ricos en AG de cadena larga; por ejemplo, para producir TAG estructurados nutricionalmente, bajos en calorías o enriquecidos con ácidos grasos esenciales poliinsaturados omega-3 y 6.

3.3 Caracterización del aceite de canola y metanálisis química con KOH

El porcentaje de acidez del aceite de canola fue $0,0491 \pm 0,0037$ %, valor que se encuentra en el rango adecuado para la síntesis de biodiesel, debido a que se requiere un porcentaje bajo de AG libres ($< 0,05$ %) para evitar la formación de sales que podrían interferir con la purificación de los ésteres metílicos⁽³¹⁾. La tabla 2 ilustra el resultado del perfil de AG en el aceite de canola y su abundancia relativa, determinada por CG-EM. Los AG mayoritarios fueron el ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2), no se detectaron AG de cadenas corta o mediana y la relación de AG saturados/AG insaturados fue 10,06/89,85. Estas características corresponden a lo reportado en la literatura para este aceite⁽²³⁾.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos del aceite de canola.

Ácido graso	t _R ^a	Abundancia Relativa (%) ^b
C16:0	10,223	1,15 ± 0,15
C16:1 [9]	10,227	3,89 ± 0,17
C18:0	11,885	8,91 ± 0,09
C18:2 [9,12]	11,828	18,04 ± 0,43
C18:1 [cis-9]	11,880	68,01 ± 0,21

a. Tiempo de retención.

b. Media aritmética de 2 determinaciones ± desviación estándar.

El rendimiento de producción de EMAG obtenido a partir de la metanólisis básica del aceite de canola fue $93,594 \pm 0,865$ %. La Figura 2 ilustra los productos de la reacción de la metanólisis básica, separados por CCF. En esta figura se observa una señal cuyo valor de Rf corresponde al biodiesel de referencia B100 ($R_f = 0,78$). También se observaron otras señales minoritarias que corresponden a diferentes subproductos como diacilglicéridos (DAG) y monoacilglicéridos (MAG), con valores $R_f = 0,28$ y $0,2$ respectivamente. Mediante este método analítico no se detectaron triacilglicéridos (TGA) sin convertir.

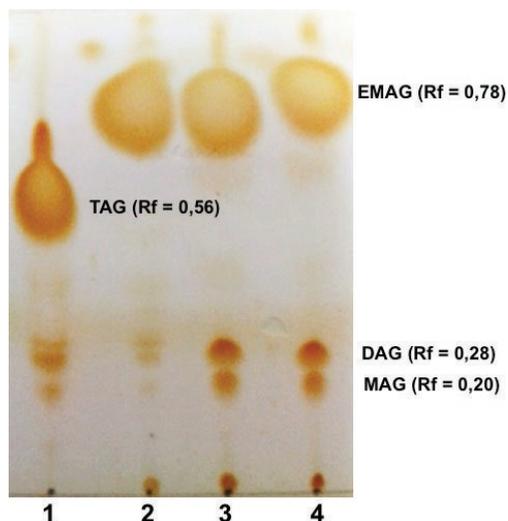


Figura 2. Cromatografía de capa fina de los productos de la metanólisis del aceite de canola con KOH. 1: Aceite de canola; 2: Biodiesel de referencia B100; 3 y 4: Biodiesel de canola. EMAG = Ésteres metílicos de ácidos grasos; TAG = Triacilglicéridos; DAG = Diacilglicéridos; MAG = Monoacilglicéridos.

3.4 Metanólisis enzimática del aceite de canola con Novozyme 435®

La Figura 3 ilustra el análisis por CCF de los productos de la metanólisis enzimática del aceite de canola a temperaturas de 40°C y 55°C y relación molar 3:1 de metanol/aceite. Todas las reacciones mostraron transformación del aceite de canola en EMAG, observándose una señal con $R_f = 0,714 \pm 0,007$ que corresponde a la del biodiesel de canola usado como referencia en la misma placa cromatográfica ($R_f = 0,717$). Además, se detectaron TAG no convertidos ($R_f = 0,564 \pm 0,004$), ácidos grasos libres (AGL) ($R_f = 0,333 \pm 0,010$), DAG ($R_f = 0,239 \pm 0,006$) y MAG ($R_f = 0,192 \pm 0,007$). La tabla 3 presenta las productividades de la metanólisis en las reacciones catalizadas por Novozyme 435 (expresada como % EMAG). A 55°C se produjo la mayor conversión de EMAG ($62,967 \pm 0,631$). El análisis de ANOVA de una vía ($\alpha = 5$ %) demostró que la temperatura no influye significativamente en la actividad catalítica del Novozyme 435 ($F = 14,79$; $\text{valor-}p = 0,0614$), en el rango de temperaturas evaluado y bajo las condiciones experimentales desarrolladas.

Tabla 3. Productividades de la metanólisis del aceite de canola con la enzima inmovilizada de *Candida antártica* (Novozyme 435).

Catalizador	Vol. Señal ^a	% EMAG	Media ± 1DE
KOH	2217,2	-	-
Novozyme 435® (40° C)	1187,7	53,568	50,307 ± 4,611
Novozyme 435® (40° C)	1043,1	47,046	
Novozyme 435® (55° C)	1406,0	63,413	62,967 ± 0,631
Novozyme 435® (55° C)	1386,2	62,520	

a. Densidad óptica de la señal de EMAG calculados por el Software JustQuantifyFree.

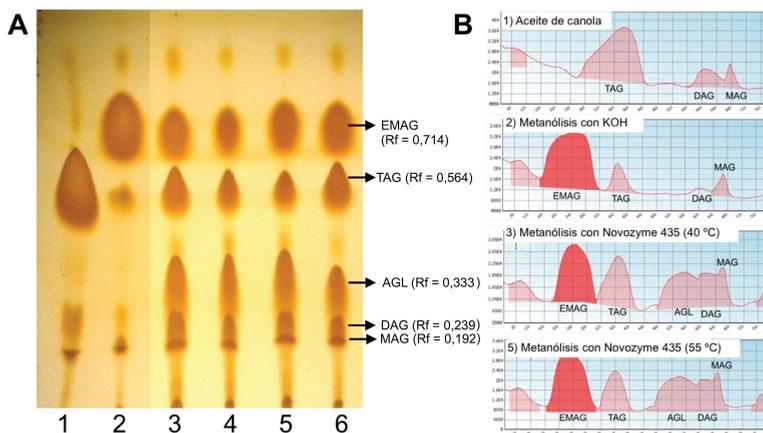


Figura 3. Cromatografía de capa fina (CCF) de la reacción de transesterificación con Novozyme 435. A) Separación de los productos de la metanólisis del aceite de canola en la placa de CCF. B) Gráficos de densidades ópticas de las manchas individuales detectadas en la misma placa, cada gráfico de densidad corresponde a una línea de corrida en la cromatopla. 1) Aceite de canola; 2) Metanólisis con KOH; 3 y 4) Metanólisis con Novozyme 435 a 40° C; 5 y 6) Metanólisis con Novozyme 435 a 55° C. EMAG = Ésteres metílicos de ácidos grasos; TAG = Triacilglicéridos; DAG = Diacilglicéridos; MAG = Monoacilglicéridos; AGL = ácidos grasos libres.

La transesterificación de aceites vegetales usando metanol como aceptor de acilo y Novozyme 435 como catalizador ha sido ampliamente investigada, reportándose porcentajes de conversión mayores a los logrados en este trabajo (> 90 %) (32). Varios factores pueden influir en la eficiencia de esta reacción, Chang y colaboradores publicaron en 2005 (33) un estudio de optimización de la metanólisis del aceite de canola usando Novozyme 435, logrando identificar que la concentración de enzima, la temperatura de reacción y la relación molar metanol/aceite son los factores con mayor influencia en la conversión de este aceite, reportándose 97.9 % de conversión experimental al usar 42.3 % de enzima, temperatura de 38° C y relación molar metanol/aceite de 3,5. De acuerdo con este estudio, es posible que la cantidad de enzima utilizada en nuestros experimentos (13 % en peso con relación al aceite) sea la causa del menor porcentaje de conversión. Respecto al factor temperatura, se ha observado que en procesos batch, temperaturas entre 30° C – 50° C, son óptimas para la transesterificación enzimática usando aceites vegetales. Por otra parte, se ha descrito que cuando Novozyme 435 se trata previamente con los

sustratos o reactivos análogos, se obtienen conversiones más altas de EMAG, al mejorar la tolerancia de la enzima al metanol y mantener la conformación de la enzima en su forma activa ⁽³⁴⁾. En este estudio no se realizó tratamiento previo a la Novozyme 435, lo que podría haber afectado la eficiencia de la reacción.

3.5 Metanólisis enzimática del aceite de canola con las fracciones del látex de *C. papaya*

Los productos de reacción de la metanólisis enzimática del aceite de canola, usando las fracciones P₃ y CPL-p como catalizadores, presentaron una apariencia turbia, la cual fue mayor a la observada en los productos de la metanólisis con Novozyme 435. Esto sugiere una posible conversión incompleta de los TAG en EMAG. El análisis por CCF (Figura 4), ilustra cualitativamente una mayor conversión a ésteres metílicos cuando se usa una relación molar metanol/aceite de 3:1, separándose un producto con Rf = 0,785 ± 0,045, que es comparable al biodiesel de canola usado como referencia en la misma cromatoplaaca (Rf = 0,775 ± 0,062). También se observó la señal de los TAG que no se convirtieron (Rf = 0,592 ± 0,054) y los productos de su hidrólisis parcial: AGL (Rf = 0,390 ± 0,016), DAG (Rf = 0,294 ± 0,011) y MAG (Rf = 0,218 ± 0,009).

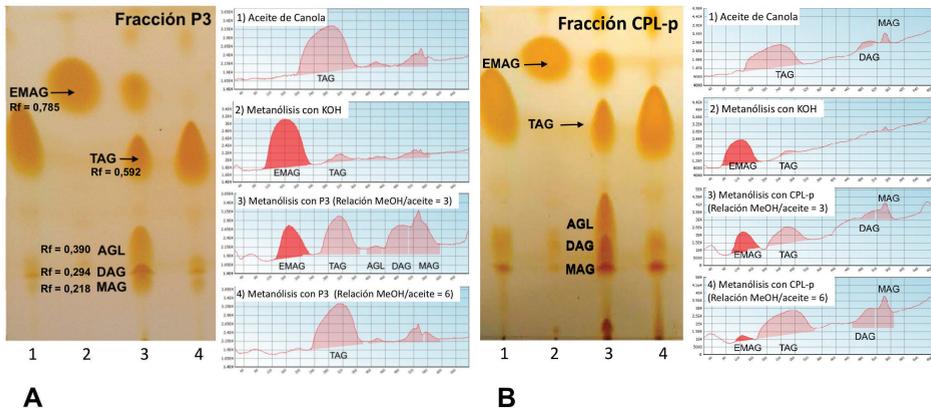


Figura 4. Cromatografía de capa fina (CCF) de la reacción de transesterificación del aceite de canola con las fracciones del látex de *C. papaya*. Se muestra la separación de los productos de las reacciones en la placa de la CCF y al lado los gráficos de densidades ópticas de las manchas detectadas en los carriles de cada cromatoplaaca. A) CCF de la metanólisis con la fracción P₃; B) CCF de la metanólisis con la fracción CPL-p. 1) aceite de canola; 2) metanólisis con KOH; 3) metanólisis con las fracciones de *C. papaya* usando una relación molar metanol/aceite de 3:1; 4) metanólisis con las fracciones de *C. papaya*, usando una relación molar metanol/aceite de 6:1. EMAG = Ésteres metílicos de ácidos grasos; TAG = Triacilglicéridos; DAG = Diacilglicéridos; MAG = Monoacilglicéridos; AGL = ácidos grasos libres.

La Tabla 4 muestra las productividades de la metanólisis del aceite de canola en las reacciones catalizadas por P₃ y CPL-p (expresada como % EMAG). El análisis ANOVA de una vía demostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($F = 993,1$; $\text{valor-}p = 5,18\text{e-}05$), bajo las condiciones experimentales realizadas, obteniéndose un mayor porcentaje de conversión al usar la fracción CPL-p como catalizador de la reacción de metanólisis. El análisis post. hoc de diferencias de medias pareadas de Tukey HDS indica que la producción de EMAG es influenciada por el tipo de fracción del látex de *C. papaya*, cuando se usa una relación molar metanol/aceite de 3:1 (Diferencia de Medias = 6,933; LCI = 3,051; LCS = 10,815 y valor $p = 0,009$).

Tabla 4. Productividades de la metanólisis del aceite de canola con las fracciones del látex de *C. papaya*.

Catalizador	Relación Metanol/Aceite	Vol. Señal ^a	% EMAG	Media ± IDE
KOH	6:1	1109,300		
Fracción P ₃	3:1	342,050	30,835	31.550 ± 1,012
Fracción P ₃	3:1	357,920	32,265	
Fracción P ₃	6:1	Sin señal	-	-
Fracción P ₃	6:1	Sin señal	-	
KOH	6:1	1028,400		
Fracción CPL-p	3:1	390,210	37,943	38,484 ± 0,764
Fracción CPL-p	3:1	401,320	39,024	
Fracción CPL-p	6:1	64,010	6,224	6,131 ± 0,132
Fracción CPL-p	6:1	62,090	6,038	

a. Densidad óptica de la señal de EMAG calculados por el Software JustQuantifyFree.

A pesar de que la fracción CPL-p produjo mayor conversión que P₃ en la metanólisis del aceite de canola, la productividad de EMAG con cualquiera de las fracciones fue menor a la obtenida en la metanólisis con Novozyme 435 (*valor-p* < 0,0001). Caro et al. ⁽³⁵⁾ observaron que factores como el origen geográfico de la planta, el tiempo de reacción y la actividad termodinámica del agua (a_w), influyeron significativamente sobre la actividad catalítica de lipasas de *C. papaya*; estos autores reportaron actividades específicas diferentes en la metanólisis del aceite de Copra, obteniendo conversiones máximas de 57,5 % y 36,0 % (a 50° C), al usar como catalizadores una preparación comercial de papáina cruda y CPL, respectivamente. En otro estudio, Rodrigues et al. ⁽³⁶⁾, informaron sobre porcentajes de conversión cercanos al 50 %, usando como sustrato el aceite de semillas de *Jatropha curcas* L., y como catalizador una lipasa recombinante de *C. papaya* inmovilizadas sobre la resina Lewatit® VP OC 1600, lo cual confirma que el tipo de lipasa influye el porcentaje de conversión.

Adicionalmente, se observó que al incrementar la cantidad de metanol en la reacción (relación metanol/aceite = 6) la conversión del aceite de canola se redujo significativamente (84 % más baja). Esto sugiere que, en las condiciones experimentales desarrolladas, el metanol afecta el proceso de transesterificación catalizado por CPL-p y P₃. Este hallazgo es consistente con lo reportado previamente en estudios previos, en los cuales utilizan las lipasas del látex de *C. papaya* como catalizadoras y los alcoholes de cadena corta como aceptores de acilos ^(37, 38). Igual como sucede con las lipasas microbianas, los alcoholes de cadena corta pueden desactivar la lipasa CPL al promover el cambio conformacional de la enzima a su forma inactiva ⁽³⁴⁾. Previamente, Su & Wei ⁽¹³⁾ habían demostrado la susceptibilidad de las lipasas del látex de *C. papaya* al metanol, etanol e isopropanol en la alcoholisis del aceite de soja, obteniendo conversiones < 37 %, en preparaciones con una relación molar metanol/aceite de 4 y un tiempo de reacción de 24 h. Por otra parte, cuando se usaron alcoholes de 4 y 5 carbonos, las conversiones fueron mayores (entre 42.7 % - 58.4 %), bajo las mismas condiciones de reacción; conversiones > 90% fueron posibles con diferentes tipos de aceites de cadena larga, al usar n-butanol como aceptor de acilo,

en un proceso batch bajo condiciones de reacción optimizadas (55° C, 150 rpm, 15 % de CPL-p, radio molar alcohol/aceite de 12 y $a_w = 0.225$)⁽¹³⁾. A pesar de que el n-butanol puede obtenerse por fermentación, su costo es más elevado comparado con el metanol, lo que constituiría un limitante para la producción de biodiesel mediante este proceso a escala industrial, por lo que es necesario seguir explorando procesos de optimización de la metanólisis de aceites vegetales, usando la lipasa CPL-p como catalizador.

4. Conclusión

El presente estudio demostró que el látex obtenido de las plantas de *C. papaya* cultivada en la región Caribe colombiana presentan fracciones con actividad lipolítica, siendo la fracción libre de proteasas (CPL-p) la de mayor potencial para la bioconversión de aceites y grasas compuestas por TAG de cadena larga. Igualmente, se encontró que, bajo las condiciones del estudio, la eficiencia de los catalizadores P₃ y CPL-p en la síntesis de EMAG, reflejaron una conversión incompleta del aceite de canola. Este resultado conduce a la necesidad de optimizar las condiciones de esta reacción para lograr mayores porcentajes de conversión o desarrollar estudios futuros con la fracción CPL-p para la producción de glicéridos parciales con potencial uso en las industrias de alimentos, farmacéutica o cosmética. Sin embargo, estos hallazgos preliminares, pueden contribuir a la caracterización de la materia prima (látex) con miras a la obtención de catalizadores “verdes” en la bioconversión de grasas y aceites.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Jorge Roper Vega por su asesoría para el diseño experimental del estudio. Esta investigación fue financiada con el apoyo de la Universidad del Atlántico, Resolución de Vicerrectoría de Investigaciones, Extensión y Proyección Social No. 002627 de 2015.

Referencias bibliográficas

1. Patel N. Environmental and economical effects of fossil fuels. *J Recent Res Eng Tech.* 2014; 1:1-12.
2. Al-Zuhair S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioproducts and Biorefining.* 2007; 1: 57-66.
3. Knothe G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2006; 83: 823-833.
4. American Society of Testing Materials Standard. D6751-09a standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuel. West Conshohocken, PA: ASTM International. <http://dx.doi.org/10.1520/D6751-09>. 2009.
5. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger, N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999; 29: 119-131.
6. Sharma R, Chioti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotech Adv.* 2001; 19: 627-662.

7. Sharma S, Kanwar SS. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal* 2014; 625258. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/625258>. 2014.
8. Luković N, Knežević-Jugović Z, Bezbradica D. Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives. En: Manzanera M. *Alternative Fuel*. Vol 1. Intech; 2011. Pp 47-72. <http://dx.doi.org/10.5772/21905>.
9. Ghaly AE, Dave D, Brooks MS, Budge S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2010; 6: 54-76.
10. Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002; 17: 133-142.
11. Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impact. *App Microbiol Biotechnol*. 2008; 79: 331-337.
12. Villeneuve P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal Lipid Science Technology*. 2003; 105: 308-317.
13. Su E, Wei D. Production of fatty acid butyl esters using the low cost naturally immobilized *Carica papaya* lipase. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014; 62: 6375-6381.
14. Caro Y, Villeneuve P, Pina M, Reynes M, Graille J. Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2000; 77: 349-354.
15. Caro Y, Villeneuve P, Pina M, Reynes M, Graille J. Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2000; 77: 891-902.
16. Domínguez de MP, Sinisterra JV, Tsai SW, Alcántara AR. *Carica papaya* lipase (CPL): an emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology advances*. 2006; 24: 493-499.
17. Villeneuve P, Pina M, Montet D, Graille J. *Carica papaya* latex lipase: sn-3 stereoselectivity or short-chain selectivity? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1995; 72: 753-755.
18. Villeneuve P, Pina M, Skarbek A, Graille J, Foglia TA. Specificity of *Carica papaya* latex in lipase-catalyzed interesterification reactions. *Biotechnology Techniques*. 1997; 11: 91-94.
19. Campillo-Alvarado G, Tovar-Miranda R. Recent advances and applications of the lipolytic activity of *Carica papaya* latex. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013; 90: 49-60.
20. Rivera I, Sandoval G. Caracterización de diversas fracciones del látex *Carica papaya* como biocatalizadores en la hidrólisis de triglicéridos. *Grasas y aceites*. 2014; 65: e003.

21. De La Cruz Medina J, Vela Gutiérrez G, García HS. Papaya: Post-harvest Operation. Instituto Tecnológico de Veracruz (ITV); 2003. 25/09/2018. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendum_-_Pawpaw_Papaya_.pdf.
22. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria: El cultivo de la papaya (Carica papaya L.) y sus principales enfermedades en época de lluvias; . 2016. 25/09/2018. http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11438/8279/1/Bol_Insumos_may_2016.pdf
23. Orsavova J, Misurcova L, Ambrozova JV, Vicha R, Mlcek J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 12871-12890.
24. Madrigal LS, Ortiz AN, Cooke RD, Fernández RH. The dependence of crude papain yields on different collection (“Tapping”) procedures for Papaya latex. *J Sci Food Agric*. 1980; 31:279-285.
25. Rivera I, Mateos-Diaz JC, Sandoval G. Plant Lipases: Partial Purification of Carica papaya Lipase. In: Sandoval G. (ed). *Methods in molecular biology, lipases and phospholipases*. Springerlink; 2012; pp. 115–122.
26. Icontec. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de acidez y de la acidez. Norma Técnica colombiana NTC-218. Icontec: Colombia; 1999:
27. Fontalvo-Gómez M, Colucci JA, Velez N, Romañach RJ. In-Line Near-Infrared (NIR) and Raman Spectroscopy Coupled with Principal Component Analysis (PCA) for In Situ Evaluation of the Transesterification Reaction. *Applied spectroscopy*. 2013; 67: 1142-1149.
28. Winayanuwattikun P, Kaewpiboon C, Piriyananon K, Tantong S., Thakernkarnkit W, Chulalaksananukul W, Yongvanich T. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy*. 2008; 32: 1279-1286.
29. Fedosov SN, Brask J, Xu X. Analysis of biodiesel conversion using thin layer chromatography and nonlinear calibration curves. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 2785–2792.
30. Campillo-Alvarado G, Tovar-Miranda, R. Recent advances and applications of the lipolytic activity of Carica papaya latex. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013; 90: 49-60.
31. Boey PL, Ganesan S, Maniam GP, Khairuddean M, Lim SL. A new catalyst system in transesterification of palm olein: Tolerance of water and free fatty acids. *Energy Convers Manag*. 2012; 56: 46–52.
32. Habibi A, Fahim S, Shirvani N, Rahimi M. Enzymatic methanolysis reaction of canola oil using capillary channel reactor: Determination of the kinetic constants-involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016; 132: 47-53.

33. Chang HM, Liao HF, Lee CC, Shieh CJ. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005; 80: 307-312.
34. Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Fukuda H. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2000; 90: 180-183.
35. Caro Y, Villeneuve P, Pina M, Reynes M, Graille J. Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varietices for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2000; 77: 891-902.
36. Rodrigues J, Canet A, Rivera I, Osório NM, Sandoval G, Valero F, Ferreira-Dias S. Biodiesel production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases. *Bioresource technology*. 2016; 213: 88-95.
37. Gandhi NN, Mukherjee KD. Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 566-70.
38. Gandhi NN, Mukherjee KD. Specificity of papaya lipase in esterification of aliphatic alcohols a comparison with microbial lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001; 78: 161-165.

Dirección de los autores

Viviana Ortega Afanador

Programa de Química, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia – Atlántico, Colombia
vivortegaf@gmail.com

Miriam Fontalvo Gómez

Programa de Química, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia – Atlántico, Colombia
miriamfontalvo@mail.uniatlantico.edu.co

Dary Mendoza Meza

Programa de Química, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia – Atlántico, Colombia
darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co