UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Programa de Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales

PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS UTILIZANDO ACEITES RESIDUALES DE FRITURA EN MEZCLA CON ACEITE DE RAPS COMO MATERIA PRIMA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
DE RECURSOS NATURALES

Laura Haydée Azócar Ulloa
Temuco- Chile
2010

AGRADECIMENTOS

- Proyecto de Tesis en la Industria PBCT-CONICYT TPI-16. Incremento de la productividad en la producción de biodiesel con catalizadores enzimáticos, incorporando lípidos residuales en mezcla con aceite de raps.
- Proyecto FONDEF D05I10391. Utilización de *Brassica napus* para la producción de biodiesel: Desarrollo y optimización del proceso.
- Proyecto FONDECYT 3080021. Biofilm whole cell bioreactor to produce biodiesel from rapeseed oil.
- Proyecto FONDECYT 1090382. Development of an enzymatic membrane reactor (EMR) for high refined biodiesel production.
- Beca de mantención de CONICYT.
- Beca de pasantía por gestión propia CONICYT.
- Beca Erasmus Mundus External Cooperation Window.
- Beca de pasantía doctoral en el extranjero de BECAS CHILE.
- Industrias Novozymes A/S Dinamarca.
- Dr. Hermann Heipieper. Department of Environmental Biotechnology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Leipzig, Alemania.
- Paper and Fibre Research Institute-PFI, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Noruega.
- Laboratorio central de combustibles COPEC, Santiago, Chile.

PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS UTILIZANDO MEZCLAS DE ACEITES RESIDUALES DE FRITURA CON ACEITE DE RAPS COMO MATERIA PRIMA

Laura Haydée Azócar Ulloa

Dr. Rodrigo Navia D.
Tutor

Dra. Maria de La Luz Mora
Directora Postgrado en Ciencias
de Recursos Naturales

Dr. Juan Carlos Parra
Director de Postgrado
Universidad de La Frontera

Dra. María Cristina Diez

Dr. Cristian Bornhardt B.

Dra. María Elvira Zuñiga

Dr. Rolando Chamy M.

Temuco-Chile
2010

RESUMEN GENERAL

RESUMEN

Los procesos catalizados por lipasas han sido ampliamente investigados como alternativa para la producción de metil ésteres de ácidos grasos (fatty acid methyl ester, FAME) o biodiesel. El interés en este proceso radica en que a diferencia de los procesos convencionales catalizados con sales alcalinas, los procesos catalizados con lipasas permiten el uso de materias primas alternativas y de menor costo, tales como el aceite residual de fritura (waste frying oil, WFO). Pese a los logros alcanzados hasta la fecha, la catálisis enzimática no ha llegado a ser competitiva con el proceso químico convencional. Esto se debe principalmente a los altos tiempos de reacción de hasta 48 horas, la pérdida de la actividad enzimática por el metanol usado en la reacción y los altos costos del proceso, asociados entre otros, a que las enzimas no puedan ser reutilizadas. En la presente investigación se optimizó el proceso enzimático de producción de FAME utilizando aceite de raps y WFO como materias primas, con metanol como aceptor acilo. La reacción fue catalizada por la enzima comercial lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina de acrílico (Novozym 435). En una primera etapa se desarrolló una matriz superficie respuesta (MSR) con las variables: razón metanol/aceite (mol/mol), dosis de lipasa (% p/p de Novozym 435), temperatura (°C) y el contenido de WFO en la mezcla con aceite de raps (% p/p). Los resultados obtenidos permitieron generar un modelo, el cual predijo rendimientos de hasta un 100 % de FAME en 12 horas de reacción utilizando un 100 % de WFO. De acuerdo al modelo, la adición de WFO incrementó el rendimiento de FAME, lo cual podría estar asociado a su mayor contenido de monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres (en comparación al aceite de raps), los cuales son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática. Posteriormente, utilizando sólo WFO como materia prima, se realizó una segunda etapa para optimizar el proceso eliminando el agua de la reacción, a través del uso de tamices moleculares de tamaño de poro de 3 Å. La adición de los tamices moleculares generó un medio anhidro que evitó las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación, llevando a cabo la producción de FAME principalmente a través de la transesterificación de triglicéridos. Este proceso en medio anhidro permitió disminuir la acidez del producto e incrementar el rendimiento de la reacción. En una tercera etapa, se investigó la posibilidad de reutilizar las enzimas bajo las condiciones de operación resultantes de las dos etapas previas. Se probaron solventes hidrofílicos e

hidrofóbicos para el lavado de las enzimas y su posterior reutilización. Sin embargo, los mejores resultados fueron obtenidos utilizando *tert*-butanol como co-solvente durante la transesterificación, el cual tiene la característica de ser medianamente polar. En esta etapa fue posible llevar a cabo 17 ciclos sucesivos de producción de FAME usando *tert*-butanol como co-solvente de la reacción, mostrando que Novozym 435 puede ser reutilizada en un medio anhidro. Finalmente, se estudió la cinética de la reacción enzimática de producción de FAME utilizando WFO como materia prima en un sistema con *tert*-butanol como co-solvente y medio anhidro. Los resultados se ajustaron a un modelo Ping Pong con inhibición competitiva por metanol y sin inhibición por sustrato. Con los resultados se pudo establecer la factibilidad de usar altas dosis de metanol de hasta 8/1 moles de metanol/moles de WFO que permitieron desplazar el equilibrio hacia la formación de producto, acelerando la reacción sin inhibir la actividad enzimática. Utilizando esta dosis de metanol se implementó un reactor enzimático semi-continuo para la producción de FAME. Las condiciones de operación del reactor fueron establecidas de acuerdo a los resultados de la primera etapa (100 % p/p WFO, 15 % p/p de Novozym 435 y 44,5 °C a 200 rpm). El reactor fue operado reutilizando las enzimas durante ciclos consecutivos de 4 horas, en un sistema con *tert*-butanol como co-solvente y recirculando la mezcla de reactantes a través de una columna con tamices moleculares para extraer el agua. Los resultados mostraron rendimientos sobre un 80 % de FAME durante 7 ciclos sucesivos, sin evidenciar pérdida de actividad enzimática. A diferencia de los trabajos reportados hasta la fecha, los cortos tiempos de reacción de este proceso y la reutilización de las enzimas generan una alternativa factible de ser utilizada a escala industrial. Este proceso presenta importantes ventajas en comparación al proceso convencional con catalizador químico. Esto se debe a que a pesar de que el proceso químico requiere solo 1 hora de reacción de transesterificación, luego del proceso es necesaria una etapa de lavado para eliminar los residuos del catalizador químico. Esta etapa anexa no es necesaria en el proceso propuesto debido a la utilización de un catalizador sólido. Además, el proceso enzimático propuesto tiene la ventaja de ser flexible permitiendo el uso de materias primas alternativas y de menor costo para la producción de FAME. Por lo tanto, los resultados de este trabajo han generado un proceso con catalizador enzimático que puede llegar a ser no solo ambientalmente sino que también económicamente competitivo con la catálisis química convencional.

ABSTRACT

Lipase-catalyzed processes have been widely investigated for biodiesel of fatty acid methyl ester (FAME) production. The interest in this process is that, unlike the alkaline process, lipase-catalyzed processes allow free fatty acid (FFA) esterification to FAME avoiding the saponification reaction when alternative raw materials, such as waste frying oils (WFO) are used. Although interesting results have been reached up to date, the enzymatic catalysis has not become competitive compared to the conventional chemical process. The main reasons explaining this issue are the long reaction time (until 48 h), the loss of enzymatic activity due to methanol use in the reaction and the high operational costs because the lipases cannot be reused. The enzymatic FAME production process was optimized in the present investigation using WFO and rapeseed oil as raw material, with methanol as an acyl acceptor. The reaction was catalyzed by the commercial lipase of *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin (Novozym 435). In the first step a response surface methodology (MSR) to analyze and optimize the interaction effects of four variables on FAME production yield was developed: final methanol-to-oil ratio (mol/mol), WFO content in the feedstock mixture (% wt), temperature (°C) and Novozym 435 dosage (% wt based on oil weight). With the results obtained an empiric model was generated, which predicted until 100% of FAME yield after 12 hours of reaction time, using 100% of WFO. According to the model, the addition of WFO increased FAME yield, which is largely due to its higher contents of monoacylglycerols, diacylglycerols and FFA (in comparison to rapeseed oil), which are more available substrates for the enzymatic catalysis. Subsequently, a second step to optimize the process producing an anhydrous medium by the addition of molecular sieves of 3 Å to the reaction using only WFO as raw material was carried out. Using this anhydrous medium, FAME yield was improved by avoiding hydrolysis and esterification reactions, producing also a decrease in both the acid value and the diglycerides content in the product. Enzymes reuse in the anhydrous medium using WFO as raw material was studied in a third step. Hydrophilic and hydrophobic solvents were tested to wash the enzyme and to recover the activity. However, better results were obtained using the moderate polar solvent *tert*-butanol as a co-solvent, which led to a stable catalysis using Novozym 435 even after 17 successive cycles of FAME production in anhydrous medium. Finally, the enzymatic transesterification kinetics in a *tert*-butanol system

and anhydrous medium was investigated regarding FAME production using WFO as raw material. The results were adjusted to a Ping Pong model with inhibition by methanol and without inhibition by WFO. With these results, the feasibility of using high methanol dosage until a methanol/WFO ratio of 8/1 (mol/mol) was established, allowing the reaction to move to the product side, and improving the reaction rate without enzymatic activity loss. Using this methanol dosage an enzymatic reactor for FAME production was set-up. The operational conditions were established according to the first step (100 wt % WFO, 15 wt % of Novozym 435, 44.5°C and 200 rpm). The reactor was operated reusing the enzymes during consecutives cycles of 4 hours in a *tert*-butanol system and recycling the mixture of reactants through a column containing the molecular sieves of 3 Å for water removal. The results showed 80% of FAME yield during 7 successive cycles of reaction, without loss of enzymatic activity. The short reaction time of the proposed process and the reuse of the enzymes generate a feasible alternative to be implemented at industrial scale. This process has several advantages compared to the chemical process. Although the chemical process requires only 1 hour of reaction time, after the process a washing step to remove catalyst residues is necessary. This washing step is not necessary in the enzymatic process because Novozym 435 is a solid catalyst. In addition, the enzymatic process has the advantage to be flexible allowing the use of alternative and low cost raw materials. Therefore, the results obtained in this work have generated an enzymatic process that could become not only environmentally friendly but also economically competitive with the chemical-catalyzed process.

ÍNDICES

1. ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN GENERAL 4

RESUMEN 5
ABSTRACT 7

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 16

1.1 INTRODUCCIÓN 17
1.2 HIPÓTESIS 19
1.3 OBJETIVOS 20
1.3.1 OBJETIVO GENERAL 20
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES GENERALES 21

2.1 BIODIESEL 22
2.1.1 CONTEXTO 22
2.1.2 TRANSESTERIFICACIÓN Y PROCESO CONVENCIONAL DE PRODUCCIÓN 23
2.1.3 CATÁLISIS ÁCIDA Y BÁSICA 24
2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 25
2.2.1 MATERIAS PRIMAS CONVENCIONALES Y ALTERNATIVAS 26
2.2.2 LÍPIDOS RESIDUALES Y ACEITES RESIDUALES DE FRITURA PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 28
2.3 BIOCATÁLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 30
2.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME USANDO BIOCATÁLISIS 31
2.4.1 TEMPERATURA DE REACCIÓN 33
2.4.2 TIPOS DE ALCOHOL Y USO DE SOLVENTES 33
2.4.3 PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE LAS LIPASAS Y REGENERACIÓN 36
2.4.4 EFECTO DE LOS FFA Y EL AGUA EN LA REACCIÓN 37
2.4.5 CINÉTICA DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA 38

CAPÍTULO III. INCORPORACIÓN DE WFO EN LA PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS 39

3.1 RESUMEN 40
3.2 INTRODUCCIÓN 40
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS 42
3.3.1 MATERIALES 42

3.3.2 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA 42
3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 44
3.3.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS 45
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
3.4.1 ADICIÓN DE METANOL 46
3.4.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE METANÓLISIS 48
3.4.3 PROPIEDADES DE LA MATERIA PRIMA QUE AFECTAN LA METANÓLISIS 55
3.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO III 59

CAPÍTULO IV. PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS EN MEDIO ANHIDRO 60

4.1 RESUMEN 61
4.2 INTRODUCCIÓN 61
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS 63
4.3.1 MATERIALES 63
4.3.2 BIOCATÁLISIS EN MEDIO ANHIDRO 63
4.3.3 EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN 65
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 66
4.4.3 EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN 72
4.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO IV 73

CAPÍTULO V. REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 75

5.1 RESUMEN 76
5.2 INTRODUCCIÓN 76
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS 78
5.3.1 MATERIALES 78
5.3.2 REACCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 78
5.3.3 RECUPERACIÓN DE LAS ENZIMAS 79
5.3.4 TRATAMIENTOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS 80
5.3.5 PRODUCCIÓN DE FAME EN MEDIO ANHIDRO USANDO *TERT*-BUTANOL COMO CO-SOLVENTE 81
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 83
5.4.1 REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME EN MEDIO ANHIDRO 83
5.4.2 TRATAMIENTOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 EN MEDIO ANHIDRO 84
5.4.3 REACCIONES SUCESIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME EN MEDIO ANHIDRO USANDO *TERT*-BUTANOL COMO CO-SOLVENTE 88
5.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO V 92

CAPÍTULO VI. CINÉTICA Y PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL 94

6.1 RESUMEN 95

6.2 INTRODUCCIÓN **95**
6.3 MATERIALES Y MÉTODOS **97**
6.3.1 MATERIALES 97
6.3.2 MODELO CINÉTICO 98
6.3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS 98
6.3.4 CONDICIONES DE REACCIÓN 100
6.3.5 PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR SEMI-CONTINUO PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 101
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN **102**
6.4.1 EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN EL RENDIMIENTO DE FAME Y EN LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCIÓN 102
6.4.2 EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE WFO EN LA TASA INICIAL DE REACCIÓN 105
6.4.3 MODELO CINÉTICO PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA 108
6.4.4 PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR SEMI-CONTINUO PARA LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE FAME 112
6.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO VI **115**

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL 116

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES 120

NOMENCLATURA 123

REFERENCIAS 125

ANEXO 1. PUBLICACIONES 132

ANEXO 2. METODOLOGÍA ANALÍTICA 158

A2.1 CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS **159**
A2.2 METILACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN EN GC **160**
A2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACILGLICÉRIDOS **161**
A2.4 ÍNDICE DE ACIDEZ Y CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES (FFA) **163**
A2.5 ÍNDICE DE PERÓXIDO **164**
A2.6 ÍNDICE DE YODO **166**
A2.7 VISCOSIDAD CINEMÁTICA **168**
A2.8 DENSIDAD A 15 °C **169**
A2.9 AGUA Y SEDIMENTOS **170**
A2.10 PUNTO DE INFLAMACIÓN **171**
A2.11 CONTENIDO DE AZUFRE **172**
A2.12 PUNTO DE ESCURRIMIENTO **173**

2. ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES GENERALES 21

FIGURA 2.1 REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN 23

CAPÍTULO III. INCORPORACIÓN DE WFO EN LA PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS 39

FIGURA 3.1 (A) RENDIMIENTO Y (B) PRODUCTIVIDAD DE FAME DURANTE LA REACCIÓN 47

FIGURA 3.2 GRÁFICO DE CONTORNO DE RENDIMIENTO DE FAME PREDICHO POR EL MODELO A 45 °C Y RAZÓN METANOL/ACEITE 3:1 (MOL/MOL) 52

FIGURA 3.3 GRÁFICOS DE CONTORNO DE RENDIMIENTO DE FAME PREDICHO POR EL MODELO PARA 50 (% P/P) WFO 54

FIGURA 3.4 GRÁFICO DE CONTORNO DE RENDIMIENTO DE FAME PREDICHO POR EL MODELO PARA 50 (% P/P) DE WFO A 45 °C 55

FIGURA 3.5 COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA ENTRADA Y EN LA SALIDA DE LA REACCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 58

CAPÍTULO IV. PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS EN MEDIO ANHIDRO 60

FIGURA 4.1 EFECTO DE LA EXTRACCIÓN DE AGUA CON SÍLICA GEL EN EL RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN 66

FIGURA 4.2 ÍNDICE DE ACIDEZ DURANTE LA REACCIÓN EN MEDIO ANHIDRO Y EN EL CONTROL 68

FIGURA 4.3 RENDIMIENTO DE FAME DURANTE LA REACCIÓN EN MEDIO ANHIDRO Y EN EL CONTROL 69

FIGURA 4.4 CONTENIDO DE MG Y DG EN EL PRODUCTO DURANTE LA REACCIÓN EN MEDIO ANHIDRO Y EN EL CONTROL 71

FIGURA 4.5 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL RENDIMIENTO DE FAME 73

CAPÍTULO V. REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 75

FIGURA 5.1 ESQUEMA DEL SISTEMA DE FILTRACIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE LAS ENZIMAS 80

FIGURA 5.2 REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 EN CICLOS SUCESIVOS DE PRODUCCIÓN DE FAME 84

FIGURA 5.3 COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 EN CICLOS SUCESIVOS DE PRODUCCIÓN DE FAME 86

FIGURA 5.4 REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 EN CICLOS SUCESIVOS DE PRODUCCIÓN DE FAME UTILIZANDO *TERT*-BUTANOL PARA EL LAVADO DE LA ENZIMAS ENTRE CICLOS 88

FIGURA 5.5 TASA DE LA REACCIÓN DE METANÓLISIS EN UN MEDIO ANHIDRO PARA DIFERENTES DOSIS DE *TERT*-BUTANOL COMO CO-SOLVENTE 89

FIGURA 5.6 RENDIMIENTO DE FAME DURANTE 17 CICLOS SUCESIVOS DE PRODUCCIÓN 91

FIGURA 5.7 PRODUCCIÓN DE FAME Y MASA DE LIPASAS AL INICIO Y AL TÉRMINO DE LOS CICLOS SUCESIVOS DE PRODUCCIÓN 92

CAPÍTULO VI. CINÉTICA Y PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL 94

FIGURA 6.1 ESQUEMA DEL REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 101

FIGURA 6.2 RENDIMIENTO DE FAME PARA DIFERENTES MOLES EQUIVALENTES DE METANOL Y WFO CONSTANTE (1 MOL) 103

FIGURA 6.3 DETERMINACIÓN DE LA TASA INICIAL DE REACCIÓN PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE METANOL Y CONCENTRACIÓN INICIAL CONSTANTE DE WFO [300 MOL/L] (R > 0,9) 105

FIGURA 6.4 DETERMINACIÓN DE LA TASA INICIAL DE REACCIÓN PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE WFO Y CONCENTRACIÓN INICIAL CONSTANTE DE METANOL [1400 MOL/L] (R > 0,96) 106

FIGURA 6.5 CAMBIO DE LA TASA INICIAL DE REACCIÓN PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE WFO Y METANOL CONSTANTE [1400 MOL/L] 108

FIGURA 6.6 GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DE LOS RECÍPROCOS DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL Y DE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCIÓN 109

FIGURA 6.7 COMPARACIÓN ENTRE LA TASA INICIAL DE REACCIÓN PREDICHA POR EL MODELO Y LA TASA EXPERIMENTAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METANOL Y WFO CONSTANTE 111

FIGURA 6.8 COMPARACIÓN ENTRE LA TASA INICIAL DE REACCIÓN PREDICHA POR EL MODELO Y LA TASA EXPERIMENTAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE WFO Y METANOL CONSTANTE 112

FIGURA 6.9 REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 113

FIGURA 6.10 RENDIMIENTO DE FAME DURANTE LA PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ENZIMÁTICO SEMI-CONTINUO EN MEDIO ANHIDRO CON REUTILIZACIÓN DE ENZIMAS 114

3. ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES GENERALES 21

TABLA 2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME 27

TABLA 2.2 CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN USANDO MATERIAS PRIMAS ALTERNATIVAS Y BIOCATALIZADORES 32

CAPÍTULO III. INCORPORACIÓN DE WFO EN LA PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS 39

TABLA 3.1 VARIABLES Y NIVELES USADOS EN LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA 42

TABLA 3.2 DISEÑO DE LA MATRIZ CENTRAL COMPUESTA Y RESPUESTAS OBTENIDAS 43

TABLA 3.3 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL MODELO CUADRÁTICO POLINOMIAL 49

TABLA 3.4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN DEL MODELO POLINOMIAL DE SEGUNDO ORDEN PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN 50

TABLA 3.5 PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS 56

CAPÍTULO IV. PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS EN MEDIO ANHIDRO 60

TABLA 4.1 COMPOSICIÓN SUSTRATO SINTÉTICO 65

CAPÍTULO V. REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435 75

TABLA 5.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN 79

TABLA 5.2 DOSIS DE *TERT*-BUTANOL INVESTIGADAS 82

CAPÍTULO VI. CINÉTICA Y PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL 94

TABLA 6.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE RESIDUAL DE FRITURA (WFO) 98

TABLA 6.2 COMPARACIÓN ENTRE LOS VALORES DE $V_{MÁX}$, K_M, K_S Y K_{IS} DE DIFERENTES REFERENCIAS 110

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

El biodiesel o metil ésteres de ácidos grasos (fatty acid methyl ester, FAME) de cadena larga, es un biocombustible que ha sido propuesto como una alternativa para sustituir parcialmente el diesel. El FAME es producido convencionalmente a través de la reacción de transesterificación, en donde aceites vegetales y metanol reaccionan en presencia de un catalizador básico para producir FAME y glicerol como residuo o subproducto (Fjerbaek *et al.*, 2009).

A pesar de que el proceso convencional de producción de FAME ha sido ampliamente utilizado, éste presenta falencias tanto ambientales como económicas. En la producción convencional de FAME se utilizan sales alcalinas tales como KOH o NaOH, las cuales reaccionan con el metanol para generar metóxido como catalizador. El uso de estos catalizadores genera residuos líquidos debido a que se requiere una etapa de lavado del FAME al final del proceso, necesaria para eliminar las sales alcalinas utilizadas. En este proceso se generan alrededor de 20 L de residuos líquidos por cada 100 L de FAME producido, los cuales requieren un tratamiento de neutralización que incrementan los costos de producción. Además, el glicerol producido contiene residuos del catalizador perdiendo su potencial como subproducto. Por otro lado, los aceites vegetales utilizados en este proceso que provienen mayormente de soya, maravilla y raps, presentan un costo elevado, incrementando el valor del producto final por sobre los del combustible fósil. Los costos del aceite vegetal corresponden a alrededor de un 80 % de los costos totales de producción. El reemplazo de estos aceites por otros de menor costo, tales como los aceites residuales de fritura (waste frying oil, WFO) no es factible utilizando el proceso convencional. Esto se debe a que el catalizador básico utilizado reacciona con los ácidos grasos libres (free fatty acid, FFA) comúnmente presentes en aceites residuales o alternativos, generándose jabón en reacciones paralelas de saponificación (Fjerbaek *et al.*, 2009).

La utilización de lipasas inmovilizadas como catalizador permite el uso de materias primas alternativas en la producción de FAME (Fukuda *et al.*, 2001). Esto se debe a que junto con llevar a cabo la transesterificación de triglicéridos (TG), estas enzimas catalizan la esterificación de los FFA para producir FAME. Además, el uso de lipasas inmovilizadas evita la etapa de lavado al final del proceso permitiendo la recuperación y reutilización de las

enzimas, evitando así la generación de residuos líquidos y generando glicerol libre de impurezas.

Pese a la gran cantidad de estudios realizados con lipasas, existen pocas investigaciones relacionadas con la producción de FAME utilizando WFO como materia prima y lipasas como catalizador (Al-Zuhair *et al.*, 2009). Usando *Rhizopus oryzae* como bicatalizador, los FFA de un WFO sintético fueron esterificados para producir FAME, lo cual incrementó el rendimiento de la reacción en hasta un 20 % (Li *et al.*, 2007). Por otro lado, Watanabe *et al.* (2001) testearon la enzima comercial lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina de acrílico (Novozym 435), obteniendo un rendimiento 5,5 % menor cuando se utilizó WFO como materia prima en vez de un aceite vegetal. Estas contradicciones demuestran que a pesar del alto potencial de incorporar en la materia prima un aceite residual en un proceso catalizado con lipasas, no existe claridad acerca de los efectos que pueden tener diferentes materias primas en el rendimiento de la reacción. En este estudio se plantea que considerando el estado degradado de los WFO, que contienen mayor cantidad de FFA, monoglicéridos (MG) y diglicéridos (DG) que un aceite vegetal, podrían ser una materia prima más disponible para ser catalizada por las lipasas, a través de la transesterificación y esterificación, acelerando la reacción.

Por otro lado, ha sido establecido que junto con la transesterificación y dependiendo de las condiciones del medio (inorgánico u orgánico y presencia de FFA), las enzimas pueden catalizar las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación. En este sentido, no existe claridad acerca de los mecanismos de acción de las enzimas y de las consecuencias en el producto y en el rendimiento al producir FAME a través de una u otra ruta. Algunos autores han establecido que el contenido de agua en la reacción permitiría incrementar su rendimiento al favorecer el funcionamiento de las enzimas a través de la formación de una interface agua-aceite (Yu et al., 2010). Sin embargo, la adición de agua a la reacción también puede favorecer la hidrólisis disminuyendo el rendimiento y afectando negativamente las propiedades del producto al hacerlo más ácido. Investigaciones recientes han planteado que la lipasa Novozym 435 se encuentra hidratada (presenta agua ligada en su matriz), por lo que la adición de agua no sería necesaria (Ognjanovic *et al.*, 2009; Tamalampudi *et al.*, 2008). Esto genera la alternativa de investigar la producción enzimática de FAME en un medio libre de agua

(anhidro) para analizar los posibles efectos en las características del producto y en el rendimiento de la reacción.

El proceso de producción de FAME catalizado con lipasas inmovilizadas debería tener la ventaja de permitir la reutilización de las enzimas para disminuir los costos de producción. Sin embargo, problemas de inhibición y pérdida de actividad producidos por el contacto de las enzimas con alcoholes de cadena corta, han imposibilitado su reuso. Junto a lo anterior, para alcanzar un proceso competitivo a mayor escala, es necesario implementar un reactor que funcione bajo condiciones óptimas. Sin embargo, existe una falencia en los estudios cinéticos realizados, debido a que no se realizan bajo condiciones óptimas de operación con co-solventes adecuados y condiciones que puedan ser extendidas a mayor escala (Al-Zuhair *et al.*, 2009). Además, en los estudios realizados tales como los de Al-Zuhair *et al.* (2007) y Al-Zuhair *et al.* (2009), las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación podrían interferir en los resultados de velocidad de reacción y constantes cinéticas, por lo que sería necesario investigar la cinética enzimática evitando estas reacciones secundarias. Por lo tanto, es de interés realizar un estudio de la cinética enzimática de la transesterificación evitando las reacciones paralelas, para proponer y llevar a cabo la puesta en marcha de un reactor bajo condiciones óptimas de operación, que sea factible de ser implementado a escala industrial.

1.2 HIPÓTESIS

1. La incorporación de aceites residuales de fritura en la producción de metil esteres de ácidos grasos, usando Novozym 435 como catalizador y aceite de raps como materia prima, incrementa el rendimiento de la reacción.

2. El uso de un medio anhidro en la producción de metil ésteres de ácidos grasos usando Novozym 435 como catalizador y aceite residual de fritura, incrementa el rendimiento de la reacción evitando las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso enzimático de producción de metil ésteres de ácidos grasos, utilizando Novozym 435 como catalizador y mezclas de aceite residual de fritura y aceite de raps como materia prima.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Establecer la influencia de la incorporación de aceites residuales de fritura en el rendimiento de metil ésteres de ácidos grasos usando Novozym 435 como catalizador enzimático y aceite de raps como materia prima

2. Establecer el efecto de usar un medio anhidro en el rendimiento de metil ésteres de ácidos grasos con Novozym 435 como catalizador enzimático y aceites residuales de fritura como materia prima.

3. Establecer un tratamiento para la reutilización de Novozym 435 durante procesos sucesivos de producción de metil ésteres de ácidos grasos en medio anhidro, utilizando aceites residuales de fritura como materia prima.

4. Validar el modelo cinético Ping Pong para la reacción de producción de metil ésteres de ácidos grasos en medio anhidro con *tert*-butanol como co-solvente, utilizando Novozym 435 como catalizador y aceites residuales de fritura como materia prima.

El desarrollo de cada objetivo específico de esta tesis fue escrito en un capítulo por separado. Previo a estos capítulos se incluyó un capítulo de antecedentes generales.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES GENERALES

Capítulo basado en artículo publicado:

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Navia R (2010) Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. Appl Microbiol Biotechnol 88:621-636 (Anexo 1).

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 BIODIESEL

2.1.1 Contexto

La crisis energética mundial es un resultado del crecimiento de la población y del incremento del consumo de energía en países desarrollados y en vías de desarrollo (Pérez-Lombard *et al.*, 2008). De 1973 a 2007, el consumo mundial de energía primaria fue casi duplicado desde 256 a 505 millones de GJ (IEA, 2009). Mientras tanto, la población mundial estimada para el año 2010 fue de 6,8 billones (US Census Bureau, 2010). Además, ha sido reportado que el *peak* de la producción de petróleo, incluyendo los yacimientos que aún no han sido encontrados, pudo haber sido alcanzada durante 2010 (Owen *et al.*, 2010).

Este escenario ha llevado a la necesidad de buscar alternativas para reemplazar el petróleo por otras fuentes energéticas más sustentables. Una promisoria alternativa es el biodiesel o metil ésteres de ácidos grasos (fatty acid methyl ester, FAME). La producción de FAME se justifica debido a que éste puede ser usado para reemplazar parcialmente el diesel, decreciendo la dependencia de países importadores de petróleo y reduciendo las emisiones de CO_2 (Carraretto *et al.*, 2004). Además, el FAME es biodegradable, no tóxico y generalmente libre de sulfuros y compuestos aromáticos (Demirbas, 2009). Pese a las ventajas mencionadas, más del 95 % del FAME en el mundo es producido de aceites vegetales comestibles (Gui *et al.*, 2008), lo cual ha incrementado la demanda y el precio de los aceites vegetales a nivel mundial (Gustone, 2009). Además, alrededor de un 70 a 95 % de los costos totales de producción de FAME son relacionados con la materia prima, aceites vegetales.

Para la producción de aceites vegetales es necesario utilizar suelos agrícolas. En países en desarrollo, esto podría limitar la cantidad de suelo disponible para la agricultura, reduciendo la seguridad alimentaria, cuando 1 billón de personas sufre actualmente de malnutrición en estos países (FAO, 2009). Además, Estados Unidos necesitaría cerca de un 13 % de su tierra agrícola disponible para reemplazar 5 % del diesel usado en el transporte, mientras Europa requeriría un 15 % para conseguir el mismo fin (Escobar *et al.*, 2009).

Basado en estos hechos, es necesario utilizar materias primas alternativas que permitan una producción de FAME económicamente factible, sin afectar negativamente la seguridad alimentaria (Haas, 2005; Parawira, 2009). En general, las materias primas alternativas, tales como los aceites residuales de fritura (waste frying oil, WFO) y las grasas residuales, difieren en su composición y son caracterizadas por un alto contenido de ácidos grasos libres (free fatty acid, FFA). Los FFA generan reacciones de saponificación cuando se utiliza un catalizador alcalino para la producción de FAME (Fjerbaek *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario utilizar otros catalizadores para la utilización de estas materias primas alternativas. En este sentido, el uso de catalizadores biológicos permitiría la producción de FAME usando diferentes materias primas.

2.1.2 Transesterificación y proceso convencional de producción

La transesterificación es el término usado para describir la clase de reacciones orgánicas en donde un éster es transformado en otro, a través del intercambio de un grupo alcóxido (Parawira, 2009) (Figura 1). La producción de FAME se basa en la reacción de transesterificación entre un triglicérido (TG) y metanol, en presencia de un catalizador, produciendo FAME y glicerol como subproducto (Fjerbaek *et al.*, 2009; Parawira, 2009). Esta reacción ocurre en etapas sucesivas, con mono- y diglicéridos (MG y DG) como productos intermediarios (Marchetti *et al.*, 2007).

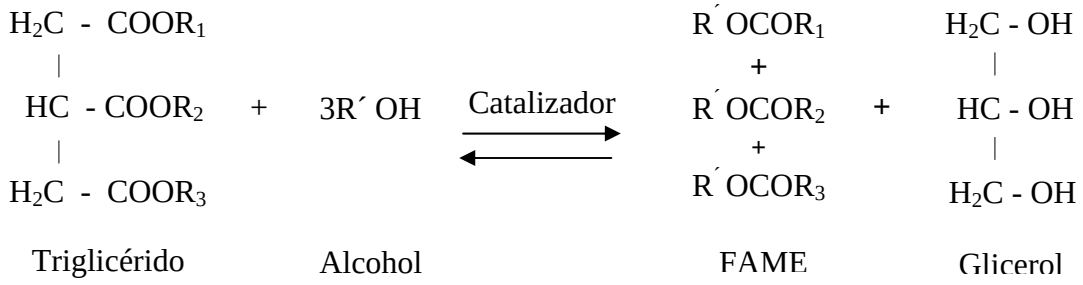

Figura 2.1 Reacción de transesterificación.

En un proceso industrial convencional se utiliza una mezcla de metanol y aceite vegetal con una razón molar de 6:1 para llevar a cabo la transesterificación en 1 hora de reacción,

utilizando NaOH como catalizador básico (Marchetti *et al.*, 2007; Parawira, 2009). Debido a la baja solubilidad del aceite en el metanol se producen dos fases en este proceso. Por lo tanto, se necesita agitación (alrededor de 200 rpm) y una alta temperatura (60 °C) para garantizar una cinética de la reacción aceptable. Durante la reacción se forma un alcóxido por la mezcla entre el NaOH y el metanol, el cual es usado como catalizador de la reacción (Marchetti *et al.*, 2007). Después de que la reacción de transesterificación es finalizada, la mezcla es llevada a una etapa de sedimentación por gravedad. El glicerol sedimenta y la capa superior corresponde al FAME. El glicerol es separado y el FAME es lavado con agua para remover las sales utilizadas para la formación del catalizador. Además, se requiere una etapa de neutralización del FAME para eliminar residuos de sodio y jabón. El exceso de metanol presente en el FAME puede ser recuperado por destilación, mientras que el glicerol puede ser refinado para su utilización o directamente descartado como residuo.

2.1.3 Catálisis ácida y básica

La metanólisis con catalizador básico es una reacción de adición-eliminación que involucra el ataque nucleofílico del anión metóxido a un átomo de carbono del grupo carbonilo del acilglicerol (Marchetti *et al.*, 2007). Como el anión metóxido resulta de la reacción entre el metanol con los iones hidroxilos, la concentración de iones de metóxido se incrementa con la cantidad de álcali. KOH y NaOH son usados como catalizadores básicos para la formación del metóxido. Al usar materias primas alternativas con alto índice de acidez, el catalizador alcalino reacciona con los FFA para producir jabón en una reacción secundaria de saponificación durante la transesterificación (Kulkarni y Dalai, 2006). El jabón formado permanece remanente tanto en el glicerol como en la fase de FAME, lo que hace necesario costosos métodos para la purificación del glicerol y el proceso de lavado del FAME. Por lo tanto, la catálisis básica no permite producir FAME de materias primas alternativas que contengan sobre 1 mg KOH/ g aceite de FFA (Canakci, 2007; Fjerbaek *et al.*, 2009; Parawira, 2009).

El uso de catalizadores ácidos permite producir FAME utilizando materias primas con alto contenido de FFA (Al-Zuhair *et al.*, 2009; Canakci, 2007; Marchetti *et al.*, 2007; Veljkovic *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006b; Zheng *et al.*, 2006). Usando ácido sulfúrico (así como otros catalizadores ácidos), los FFA pueden ser esterificados a FAME sin la formación de jabón. Por

lo tanto, los catalizadores ácidos también pueden ser usados como un pretratamiento, antes de la reacción alcalina (Marchetti *et al.*, 2007; Veljkovic *et al.*, 2006). Además, los TG pueden reaccionar con el metanol para producir FAME y glicerol en una reacción de transesterificación, usando catálisis ácida.

La catálisis ácida o su uso como un tratamiento previo a la catálisis básica, requiere largos tiempos de reacción y altos costos de equipamiento debido a la generación de corrosión. Lo anterior, la hace económicamente menos factible que la catálisis básica utilizada convencionalmente (Zhang *et al.*, 2003). Además, las catálisis ácida y básica requieren etapas de neutralización y separación de la mezcla producida. También caracterizan a estos procesos los problemas ambientales y económicos relacionados con un alto gasto de energía y la generación de aguas residuales (Dossin *et al.*, 2006). El uso sales alcalinas como catalizador genera alrededor de 20 L de agua residual por 100 L de FAME producido (Suehara *et al.*, 2005). Además, el balance energético indica que cada tonelada de FAME requiere alrededor de 50 kWh de electricidad, de los cuales entre un 60-70 % es consumido en la refinación de la glicerina (Barnwal y Sharma, 2005).

Las herramientas biotecnológicas se presentan como una alternativa que permitiría solucionar la mayoría de los inconvenientes ocasionados por los catalizadores químicas (Röttig *et al.*, 2010). El uso de un catalizador biológico, tal como lipasas purificadas, permite la esterificación de los FFA a FAME, evitando la generación de jabón cuando se utilizan materias primas con alto índice de acidez. Además, el glicerol puede ser recuperado fácilmente, y la purificación de FAME es simplificada. Finalmente, si el biocatalizador esta inmovilizado, éste puede ser fácilmente separado de la reacción, lo que lo hace económicamente y medioambientalmente conveniente para la producción de FAME (Röttig *et al.*, 2010).

2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME

Las materias primas utilizadas para la producción de FAME están compuestas principalmente por triglicéridos (TG), es decir, ésteres con tres moléculas de ácidos grasos y una molécula de glicerol. Los ácidos grasos de los TG son ácidos carboxílicos de cadena larga (desde C_{12} a C_{20}), los cuales pueden estar saturados o insaturados. A temperatura ambiente, la mayoría de

los TG saturados son sólidos (grasas) mientras los TG insaturados son líquidos (aceites). De acuerdo a esta descripción, existen diferentes materias primas que pueden ser utilizadas para la producción de FAME: aceites vegetales comestibles y no comestibles (Gui *et al.*, 2008), aceite de microorganismos oleaginosos (Chisti, 2007; Lu *et al.*, 2008) y lípidos residuales (Azócar *et al.*, 2010b; Canakci, 2007; Felizardo *et al.*, 2006).

2.2.1 Materias primas convencionales y alternativas

Los principales aceites vegetales usados en la producción de FAME dependen de la zona geográfica. Aceite de raps y aceite de maravilla en Europa, y aceite de soya en América del Norte y del Sur. Algunas ventajas de estos aceites son su bajo nivel de saturación, bajo contenido de FFA y propiedades fisicoquímicas similares (Tabla 2.1). El bajo nivel de saturación permite que el FAME obtenido se caracterice por un punto de obstrucción del filtro en frío similar al del diesel. El bajo contenido de FFA y las propiedades fisicoquímicas similares permiten utilizar en forma efectiva un catalizador alcalino para la producción de FAME, por lo que no se requiere modificar el convencional proceso de producción. En el sudeste asiático el FAME es también producido utilizando aceite de palma como materia prima. La desventaja es que este aceite es caracterizado por un alto nivel de saturación y un alto valor de acidez (Tabla 2.1).

Una amplia variedad de aceites con alto contenido de FFA se encuentran disponibles en grandes cantidades. Estos aceites son principalmente usados para producir jabón de bajo costo y son conocidos como aceites no comestibles (Ramadhas *et al.*, 2005). Los aceites no comestibles tienen un menor costo que los aceites comestibles y podrían ser utilizados como materia prima para la producción de FAME (Barnwal y Sharma, 2005). Algunos aceites no comestibles provienen de: jatrofa (*Jatropha curcas, L.*), karanja (*Pongamia pinnata*), madhuca (*Madhuca indica*), tabaco (*Nicotiana tabacum, L.*), corcho (*Ficus elastica*), nueces de jabón (*Sapindus mukorossi*), y aceite de risino (*Ricinus communis, L.*) (Barnwal y Sharma, 2005). La Tabla 2.1 muestra las propiedades y composición de ácidos grasos de aceites no comestibles.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas y composición de ácidos grasos de materias primas para la producción de FAME.

Materia prima / Propiedades	Aceite vegetal comestible				Aceite vegetal no comestible					Lípidos residuales						
	Maravilla	**Raps[b]**	**Soya**	**Palma[b]**	**Caucho**	**Jatrofa**	**Pongamia**	**Nueces de jabón**	**Risino**	**WFO**	**WFO**	**Grasa procesada**	**Grasa no procesada**	**Soapstock**	**Tall oil**	**AST[c]**
Viscosidad cinemática (cSt)[a]	58	34	65	40	66	49,9	26,9	-	270	37	36,4	-	-	-	70	28
Densidad (Kg/m^3)	918	927	-	918	910	918	911	-	962	925	924	-	-	-	-	918
Índice de acidez (mg KOH/g aceite)	0,2	0,8	0,2	5,3	34	14	19,9	9,1	4,7	4,5	1,3	14,8	41,8	29,8	158	193
Contenido de agua (%)	-	<0,01	-	2,1	-	-	-	-	0,2	1,3	0,4	55	19	4,9	5,2	-
Punto de ignición (°C)	220	>100	230	267	-	240	-	-	245	>100	485	-	-	-	-	-
Índice de yodo (g I_2/100 g aceite)	-	105	-	52,4	119	-	-	-	86	111	141	-	-	-	-	135
Capacidad calorífica (MJ/kg)	40	-	40	-	38	40	-	-	38	-	41	-	-	-	40	-
Composición ácidos grasos (% p/p)																
Ácido palmítico (C16:0)	6,8	4,2	11,8	42,6	10,2	13,4	8,9	4,7	1,3	12,2	20,4	12,7	26	17,2	0	-
Ácido esteárico (C18:0)	3,3	1,3	3,2	4,4	8,7	5,4	8,2	1,5	0,8	4,1	4,8	8,2	16,5	4,4	2,1	-
Ácido oleico (C18:1)	16,9	66,6	23,3	40,5	24,6	45,8	65,8	52,6	3	28,5	52,9	41,5	39,6	15,7	52,7	-
Ácido linoleico (C18:2)	73,7	18,7	5,5	10,1	39,6	32,3	12,1	4,7	4,4	49,5	13,5	30,9	4,4	55,6	38,3	-
Ácido linolénico (C18:3)	0	7,7	6,3	0,2	16	0	0	0	0,5	3,5	0,8	3,0	0,6	7,1	6,9	-
Otros	2,6	1,5	0	2,2	0,9	3,1	5	36,5	87[d]	2,2	7,6	3,7	12,9	0	0	-
Referencias[e]	*1*	*2*	*1*	*3-4-5*	*1*	*6-7*	*7-8*	*6*	*9-10*	*2*	*11-12*	*13*	*13*	*14*	*15*	*16*

[a] A 40 ºC. [b] Aceites no refinados. [c] AST: Aceite de semillas de tabaco. [d] Ácido ricinoleico.
[e] *1* Ramadhas *et al.* (2005), *2* Azócar *et al.* (2010b), *3* Barnwal y Sharma (2005), *4* Demirbas (2005), *5* Talukder *et al.* (2009), *6* Chhetri *et al.* (2008), *7* Sarin *et al.* (2007), *8* Sharma *et al.* (2010), *9* Scholz y Nogueira da Silva (2008), *10* Sousa *et al.* (2010), *11* Demirbas (2009), *12* Leung y Guo (2006), *13* Canakci (2007), *14* Beal (1975), *15* Altiparmak *et al.* (2007), *16* Veljkovic *et al.* (2006).

La mayoría de los aceites no comestibles son caracterizados por una elevada viscosidad y un alto contenido de FFA. Sin embargo, la capacidad calorífica y el punto de ignición son similares a los aceites comestibles (Tabla 2.1). Por lo tanto, usando un catalizador adecuado, el FAME producido de estas materias primas sería factible de ser utilizado en un motor diesel.

Microorganismos oleaginosos capaces de acumular lípidos sobre un 20 % son denominados *single cell oil* (SCO) y también han sido propuestos como materia prima alternativa para la producción de FAME (Hu *et al.*, 2008). La producción de SCO no requiere suelo arable y no competiría con la producción de alimentos, debido a que se puede utilizar biomasa residual como fuente de carbono para su producción. Los principales microorganismos que han sido investigados son: microalgas, bacterias, levaduras y hongos (Li *et al.*, 2008). Además, ha sido reportado que el aceite de microalgas, levaduras y hongos se caracteriza por un porcentaje relevante de FFA, lo cual haría necesaria la utilización de un proceso alternativo para su uso en la producción de FAME (Azócar *et al.*, 2010a).

2.2.2 Lípidos residuales y aceites residuales de fritura para la producción de FAME

Los lípidos residuales tales como grasas, aceites residuales de fritura (waste frying oil, WFO) y borra o *soapstock* (subproducto de la refinería de aceites) son potenciales materias primas que podrían reducir los costos de producción de FAME (Canakci, 2007; Felizardo *et al.*, 2006; Gui *et al.*, 2008; Haas, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Además, el aceite de resina o *tall oil* que es un subproducto de la manufactura de pulpa y papel (Altiparmak *et al.*, 2007) y el aceite de semillas de tabaco (*N. tabacum L.*) (Veljkovic *et al.*, 2006), han sido propuestos como nuevas materias primas para la producción de FAME (Tabla 2.1).

Los WFO también conocidos como aceites de cocina (waste cooking oil, WCO), son generados de aceites vegetales usados a altas temperaturas en procesos de fritura de alimentos. Estos procesos causan reacciones de hidrólisis, polimerización y oxidación, las cuales cambian las características fisicoquímicas del aceite (Araújo, 1995). Además, los WFOs son conocidos por su alto valor de acidez, el cual se debe a su alto contenido de FFA. Índices de acidez mayores a 1 mg KOH/ g aceite son comunes en WFO y pueden causar reacciones paralelas de saponificación cuando un catalizador alcalino es utilizado en la reacción de transesterificación (Freedman *et al.*, 1986). La producción de jabón consume el catalizador, disminuye el

rendimiento de FAME y produce una separación menos efectiva del FAME producido de la fase glicerol (Freedman *et al.*, 1986).

A la fecha, la cantidad total de WFO producida en países europeos, norteamericanos y asiáticos supera las 16,6 Mton/año. Considerando que la producción total de FAME en 2009 fue 11 Mton y que la demanda se incrementa en alrededor de 3,5 Mton/año (Gustone, 2009), el uso solamente de WFO como materia prima hubiera permitido suplir la demanda total de FAME durante los últimos años.

Cuando se utiliza WFO o cualquier lípido residual para la producción de FAME el proceso debe ser flexible. Esta necesidad surge debido a las propiedades fisicoquímicas variables que caracterizan a estas materias primas. Como se muestra en la Tabla 2.1, el contenido de humedad varía de 0,4 % a 55 %, mientras el índice de acidez varía entre 1,3 a 193 mg KOH/ g aceite para las materias primas residuales de distinto origen.

2.3 BIOCATÁLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME

Aunque las lipasas son utilizadas generalmente para catalizar la hidrólisis de ésteres carboxílicos, éstas también son utilizadas en un amplio rango de reacciones de bioconversión, incluyendo la esterificación y transesterificación (Noureddini *et al.*, 2005; Orcaire *et al.*, 2006). Los biocatalizadores investigados en la producción de FAME pueden ser clasificados como lipasas libres, lipasas inmovilizadas y *whole-cell* (cultivos celulares con actividad enzimática) (Du *et al.*, 2008; Röttig *et al.*, 2010).

El uso de enzimas libres a escala industrial es debatible debido a que su funcionamiento presenta bajos rendimientos y altos costos ya que no se pueden reutilizar. En comparación a las lipasas libres, el uso de enzimas inmovilizadas presenta ventajas tales como estabilidad y posibilidad de reuso. Por otro lado, debido a que el uso de lipasas inmovilizadas requiere complejos procesos de recuperación, purificación e inmovilización el uso de biocatálisis *whole-cell* también ha sido investigado (Du *et al.*, 2008; Röttig *et al.*, 2010).

La lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina de acrílico es conocida comercialmente como Novozym 435 y ha sido el catalizador enzimático más comúnmente investigado para la producción de FAME alcanzando altos rendimientos (Fjerbaek *et al.*, 2009). La amplia aceptación de este catalizador se debe a varias razones entre las que destacan su baja regioespecificidad (*sn*-3) que permite producir FAME a partir de todos los MG-, DG- y TG- de la materia prima. Por el contrario, otros catalizadores tales como lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), lipasas de *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20) y lipasas de *Rhyzopus oryzae* IFO4697 han sido ampliamente investigados en la producción de FAME pero se caracterizan por una especificidad *sn*-(1)3 que genera la acumulación de MG- durante la reacción (Fukuda *et al*., 2001).

Novozym 435 ha sido reportada como una lipasa que podría contener suficiente cantidad de agua en su matriz como para preservar su actividad catalítica en un medio anhidro (Ognjanovic *et al.*, 2009; Tamalampudi *et al.*, 2008). En un reciente estudio utilizando la metodología de superficie de respuesta, se correlacionó la concentración de Novozym 435 versus la concentración de agua, encontrándose mayores rendimientos de FAME (92 %) cuando se utilizó el medio con la menor concentración de agua (0 %) y con la mayor dosis de

enzima (5 % basado en el peso del aceite). Esta característica de Novozym 435 es una ventaja comparado con otras lipasas tales como lipasas de *Pseudomona cepacia* y lipasa de *R. oryzae*, las cuales necesitan la adición de agua a la reacción para poder llevar a cabo una catálisis efectiva (Parawira *et al*., 2009). La ventaja se debe a que la adición de agua a la reacción puede decrecer la vida útil de las enzimas además de favorecer la reacción paralela de hidrólisis de TG durante la transesterificación, lo cual se evitaría al utilizar Novozym 435 como catalizador.

Por otro lado, a diferencia de la lipasa libre de *C. antarctica* y de otros catalizadores investigados, Novozym 435 ha demostrado ser un catalizador robusto y estable en presencia de alcoholes de cadena corta (Hernandez-Martin y Otero, 2008). En este sentido Cabrera *et al.* (2009) desarrollaron una investigación para desorber la enzima *C. antarctica* del soporte de resina de acrílico que conforma la Novozym 435, estableciendo que el soporte es el que da las características de estabilidad y alta actividad a esta enzima comercial.

En general, los biocatalizadores inmovilizados presentan ventajas en comparación a la catálisis alcalina ya que facilitan la recuperación del glicerol y evitan la etapa de lavado del FAME. Sin embargo, el costo de las lipasas y los altos tiempos de reacción son significativamente mayores en comparación a la catálisis alcalina. Los largos tiempos de operación y problemas de pérdida de actividad están siendo estudiados debido a que los costos de la enzima aun son una barrera para desarrollar un proceso de producción de FAME a escala industrial (Du *et al.*, 2008). Sin embargo, como se discutió previamente, el uso de materias primas alternativas es necesario. Por lo anterior, los estudios se deberían focalizar en el empleo de la biocatálisis para promover el uso de materias primas alternativas.

2.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE FAME USANDO BIOCATÁLISIS

Las condiciones operacionales investigadas para la producción FAME son similares cuando se utilizan aceites comestibles, aceites no comestibles o lípidos residuales. Esto podría hacer factible la producción de FAME a partir de mezclas de materias primas. Las principales variables estudiadas son: temperatura, tipo de alcohol, eficiencia de regeneración de lipasas, humedad del aceite y concentración de FFA en la materia prima (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Condiciones de operación para la transesterificación usando materias primas alternativas y biocatalizadores.

Materia prima		Biocatalizador	Condiciones de operación						FAAE (%)	Referencias
			Metanol: aceite (mol/mol)	Catalizador (%p/p)	T (°C)	t (h)	Agitación (rpm)	Otras condiciones		
Aceites no comestible	**Aceite de jatrofa**	ROL[a]	3:1	4	30	60	150	AMP [b]	80	(Tamalampudi *et al.*, 2008)
		Novozym 435	3:1	4	30	90	150	AMP	76	(Tamalampudi *et al.*, 2008)
		PS-D [c]	etanol 4:1	5	50	8	200	Agua 5 (% p/p)	98	(Shah y Gupta, 2007)
Lípidos residuales	**WFO**	Novozym 435	25:1	10	50	4	150	-	89	(Maceiras *et al.*, 2009)
		Lipasa de *Candida* sp.99–125	1:1[d]	25	45	1,2mL/min		Hexano y agua	91	(Chen *et al.*, 2009)
		Lipasa [e]	6:1	1,1	65	24	250	Agua 15 (% p/p)	90	(Dizge *et al.*, 2009)
		Novozym 435	4:1	4	40	12	200	Co-solvente *tert*-butanol	88	(Halim y Kamaruddin, 2008)
		Lipasa de *P. expansum*	3:1	84 µ/g oil	35	7	200	AMP - Adsorbentes y t-amyl alcohol	93	(Li *et al.*, 2009)
	Soapstock	Novozym 435	etanol ~ 3:1	3	45	6 d	100	Neutralización de la reacción	85	(Sato *et al.*, 2008)
		Lipasa[f]	~ 8:1	61 µ/g oil	28	8	600	AMP - agua 10 (p/p)	89	(Chen *et al.*, 2008)
	SOOD[g]	Lipozyme TL IM y Novozym 435	3,9:1	5	40	12	150	Co-solvente *tert*-butanol	94	(Wang *et al.*, 2006a)
	Waste ABE[h]	Lipasa de *C. cylindracea*	4:1	238 µ/g oil	37	8	120	-	83	(Lara y Park, 2004)
SCO	**Aceite de microalgas**	Lipasa de *Candida sp.99-125*	3:1	30	38	12	180	-	98	(Xiong *et al.*, 2008)

[a] ROL: *whole cells* de *R. oryzae.* [b] AMP: Adición de metanol por pasos. [c] Lipasa de *P. cepacia* inmovilizada en célite. [d] Razón molar mantenida en un reactor continuo. [e] Lipasa de *T.lanuginosos* inmovilizada en un polímero microporoso. [f] Lipasas solubles NS81006 y NS81020, producidas por fermentación de los microorganismos *Aspergillus oryzae*/*Aspergillus niger*. [g] SOOD: *soybean oil deodorizer distillate.* [h] ABE: *Activated bleaching earth.*

2.4.1 Temperatura de reacción

La solubilidad del alcohol en aceite se incrementa con la temperatura, promoviendo una reacción de transesterificación más rápida. Sin embargo, la actividad óptima de las lipasas también depende de la temperatura y si ésta es demasiado alta puede producir la desnaturalización de las enzimas (Nie *et al.*, 2006). Usando la metodología de superficie de respuesta, Shieh *et al.* (2003) encontraron que la temperatura óptima para llevar a cabo la reacción de transesterificación usando Lipozyme IM-77 era de 36,5 °C. Usando aceites comestibles con lipasa de *Candida sp.* 99-125 inmovilizada en membrana textil, el mayor rendimiento de FAME fue observado a 40 °C (Nie *et al.*, 2006). En otra investigación con aceites comestibles, Royon *et al.* (2007) determinaron que la estabilidad operacional de Novozym 435 era superior a otras enzimas, alcanzando los mejores resultados a 50 °C. Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos por Kose *et al.* (2002), quien estableció que sólo para temperaturas sobre 50 °C el rendimiento de FAME disminuye producto de la pérdida de actividad de la Novozym 435.

La termoestabilidad de algunas lipasas inmovilizadas podría ser atribuida a la interacción entre las lipasas y la superficie del soporte, a través de puentes de hidrógeno y fuerzas iónicas. Esta característica de las lipasas inmovilizadas podría permitir incrementar el rendimiento de la transesterificación, disminuyendo los tiempos de reacción.

2.4.2 Tipos de alcohol y uso de solventes

Alcoholes de cadena corta tales como el metanol pueden producir la pérdida de actividad de las enzimas, debido a la baja solubilidad de los alcoholes en el aceite. (Ban *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2004; Kaieda *et al.*, 2001). Alcoholes de cadena larga mayor a tres átomos de carbono pueden ser completamente disueltos en el aceite en una razón estequiométrica, es decir 3 moles de alcohol son disueltos en 1 mol de aceite. Sin embargo, la solubilidad del sistema metanol/aceite es solo 1,5:1 (mol/mol) y 2:1 (mol/mol) para la mezcla etanol/aceite (Shimada *et al.*, 2002).

Usualmente se utiliza un exceso de alcohol para llevar a cabo la reacción de transesterificación. Estas altas dosis pueden producir la pérdida de actividad de las lipasas a través del contacto de la enzima con las gotas de metanol o etanol insoluble que se encuentran

en el aceite (Shimada *et al.*, 2002). Diversas alternativas han sido propuestas para resolver el problema de pérdida de actividad: la adición del alcohol por pasos, el uso de alcoholes secundarios o de cadena corta como aceptores acilo y la adición de co-solventes orgánicos a la reacción.

La metanólisis ha sido investigada adicionando tres dosis sucesivas de 1 mol de metanol (1/3 M equivalente por dosis), hasta alcanzar la cantidad estequiométrica requerida. Esta alternativa es llamada protocolo de tres pasos o adición por pasos (Du *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2006). Shimada *et al.* (2002) aplicó tres adiciones consecutivas de 1/3 M equivalente de metanol durante 48 h de tiempo de reacción, usando 4 (% p/p) de Novozym 435 para alcanzar un rendimiento de 97,3 % de FAME. Ognjanovic *et al.* (2009) reportaron que usando condiciones previamente optimizadas de 3 (% p/p) de Novozym 435, 45 °C y razón metanol/aceite 3:1 (mol/mol) era posible alcanzar hasta un 99 % de rendimiento de FAME adicionado el metanol por pasos. Este protocolo fue realizado adicionando un primer paso de metanol al comienzo de la reacción, un segundo paso a las 10 h de reacción y un tercer paso a las 25 h de reacción, llevando a cabo la reacción completa en 50 horas de incubación (Ognjanovic *et al.*, 2009). Li *et al.* (2009) reportó que a pesar de los altos rendimientos alcanzados usando adición de metanol por pasos, se generan largos tiempos de reacción y bajas tasas de producción de FAME. Por lo tanto, es necesario buscar estrategias que permitan disminuir estos tiempos de reacción sin afectar negativamente la actividad de las enzimas. Estudios realizados por Shimada *et al.* (2002), sugirieron que no es necesaria la aplicación de 3 pasos consecutivos. Este supuesto se fundamenta en que con el transcurso de la reacción los alquil ésteres producidos (hidrofóbicos al igual que el aceite), actúan como verdaderos solventes de la reacción, ayudando a incrementar la miscibilidad del sistema. Por lo tanto, la aplicación de sólo dos pasos: 1/3 de metanol al inicio de la reacción y 2/3 posteriormente, surge como una opción que podría acelerar la velocidad de reacción.

Diferentes aceptores acilo tales como alcoholes secundarios y alcoholes cadena larga también han sido investigados para evitar la inhibición por alcohol (Fjerbaek *et al.*, 2009). Du *et al.* (2004) reportaron un 92 % de rendimiento de FAME en 14 horas de reacción, utilizando metil acetato (CH_3COOCH_3) como un nuevo aceptor acilo para producir triacetilglicerol como un subproducto de mayor valor comercial. Sin embargo, de acuerdo a Fjerbaek *et al.* (2009) es necesario considerar que los aceptores acilo deben ser económicos y disponibles en grandes

cantidades, por lo que sólo el metanol y etanol podrían ser opciones realistas para la producción de FAME.

El uso de solventes orgánicos como co-solventes durante la reacción para la producción de FAME ha sido investigado con varios propósitos: disminuir el problema de inmiscibilidad entre reactantes generando una mezcla homogénea; reducir la viscosidad de la mezcla de reacción incrementando la tasa de difusión y reduciendo problemas de transferencia de masa alrededor de la enzima; forzar a que el agua residual permanezca alrededor de las enzimas inmovilizadas favoreciendo la estabilidad de las mismas (solventes no polares) (Fjerbaek *et al.*, 2011).

El efecto del co-solvente en la reacción depende de la polaridad del solvente utilizado. Yu *et al.* (2010) investigaron el uso de co-solventes con grupos hidroxilos en la reacción de transesterificación, tales como acetona y 1,4 dioxano, debido a que estos pueden solubilizar el glicerol y el metanol. Sin embargo, estos solventes hidrofílicos tienen la desventaja de no solucionar los problemas de inmiscibilidad entre el aceite y el alcohol. La utilización de solventes hidrofóbicos tales como, éter de petróleo, *n*-hexano, y *n*-heptano han permitido alcanzar altos rendimientos de FAME, cercanos al 90 % (Nie *et al.*, 2006) (Tabla 2.2). Pero, la solubilidad de metanol y glicerol en estos solventes relativamente hidrofóbicos, han generado efectos negativos en la actividad de las lipasas (Royon *et al.*, 2007).

La utilización de co-solventes medianamente polares ha sido recientemente reportada (Yu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Yu *et al.* (2010) reportaron que el uso de un alcohol medianamente hidrofóbico como co-solvente, el alcohol *tert*-amílico, permitiría incrementar la actividad de Novozym 435 para la producción de FAME. Sin embargo, el alcohol *tert*-amílico presenta un elevado punto de ebullición cercano al del agua lo que podría complicar su recuperación para ser reutilizado. Wang *et al.* (2006a) y Li *et al.* (2006) propusieron el uso de *tert*-butanol como co-solvente de la reacción para la producción de FAME (Tabla 2.2). *tert*- Butanol es un alcohol terciario con un coeficiente octanol-agua de 0,35 y se caracteriza por ser un solvente medianamente polar en el cual el metanol y el aceite son solubles. Este alcohol ha sido previamente investigado demostrando que puede incrementar considerablemente la actividad de la enzima en comparación a un alcohol lineal. Esto es atribuido a la diferencia de miscibilidad con triglicéridos, debido a que un alcohol no

lineal tiene mejor miscibilidad con triglicéridos en comparación a uno lineal con el mismo número de átomos de carbono (Yu *et al.*, 2010). Además, la utilización de *tert*-butanol permitiría mantener altos rendimientos de FAME independiente del contenido de agua (Fjerbaek *et al.*, 2011).

Pese a las posibles ventajas del uso de un co-solvente, al momento de seleccionar alguno se deben considerar factores clave como los costos, el gasto de energía adicional, posibles riesgos de explosiones y la factibilidad de que el solvente sea recuperado (Shimada *et al.*, 2002).

2.4.3 Pérdida de actividad de las lipasas y regeneración

La pérdida de actividad de las lipasas puede ser causada por alcoholes de cadena corta y glicerol (Du *et al.*, 2008). En un estudio de metanólisis continua, usando Novozym 435 como catalizador, Shimada *et al.* (2002) sugirieron que el metanol sin reaccionar migra desde la mezcla de la reacción a la capa de glicerol, cubriendo las enzimas y generando su inhibición. Para solucionar este problema, ha sido propuesto el lavado de la enzima con un solvente orgánico, lo cual permitiría remover el glicerol del soporte enzimático (Xu *et al.*, 2006). Soumanou y Bornscheuer (2003) utilizaron sucesivos lavados con acetona fría y una posterior etapa de secado para la lipasa de *R. miehei* previamente utilizada como catalizador de la transesterificación de aceite de maravilla y metanol. Los resultados permitieron mantener la actividad de la enzima durante 7 ciclos de uso.

En otro estudio, Chen y Wu (2003) investigaron la pérdida de actividad y regeneración de Novozym 435. En esta investigación, los autores propusieron que el material del soporte de la enzima (resina de acrílico) podría adsorber componentes polares tales como metanol o etanol, generando la inactivación o inhibición enzimática. Además, Chen y Wu (2003) investigaron un tratamiento para Novozym 435 previamente desactivada con exceso de alcohol, estableciendo que el uso de sucesivos lavados con *tert*-butanol o 2-butanol y un posterior tratamiento en aceite de soya por 12 horas, permitían recuperar hasta un 75 % de la actividad original.

Recientemente ha sido propuesto un sistema utilizando *tert*-butanol como co-solvente para mantener una efectiva transesterificación evitando la pérdida de actividad de las lipasas. Wang *et al.* (2006a) utilizando Lipozyme TL IM y Novozym 435 como catalizador, llevaron a cabo

la transesterificación en un sistema con *tert*-butanol, el cual permitió alcanzar un 94 % de rendimiento de FAME y reutilizar la enzima en ciclos sucesivos (Tabla 2.2).

2.4.4 Efecto de los FFA y el agua en la reacción

Los FFA de materias primas alternativas pueden ser esterificados por lipasas para producir FAME. Sin embargo, la esterificación de 1 mol de FFA genera 1 mol de agua como subproducto. Un alto contenido de agua en la reacción (alrededor de un 10 %) puede favorecer la hidrólisis, mientras que un bajo contenido de agua favorecería la esterificación (Nie *et al.*, 2006). Esto significa que la hidrólisis podría ser promovida en reacciones con aceites alternativos, transformando aceite en FFA. Posteriormente, luego de la hidrólisis, los FFA pueden ser transformados en FAME por esterificación.

La actividad enzimática en medio no acuoso podría ser afectada positivamente por la presencia de agua en bajas cantidades. Para investigar el efecto de la presencia de agua en el medio de reacción durante la metanólisis, un estudio fue llevado a cabo variando el contenido de agua desde 0 % a 40 % (% p/p basado en el peso del aceite) (Nie *et al.*, 2006). La producción de FAME se incrementó hasta que el contenido de agua alcanzó entre 10-15 %, disminuyendo con dosis superiores. En otro estudio, se investigó la transesterificación de aceite de raps acidificado (índice de acidez de 129 mg KOH/g aceite) utilizando un catalizador *whole cell, R. oryzae* inmovilizado, en un sistema con *tert*-butanol (Li *et al.*, 2007). En esta investigación se encontró que un mayor contenido de FFA incrementó la tasa de reacción y el rendimiento de FAME final obtenido. Además, con un 3 % de agua en la reacción se alcanzó el mayor rendimiento en el mismo estudio.

Se ha establecido que la mayoría de las lipasas necesitan una cantidad óptima de agua para mantener su actividad en un medio orgánico. Sin embargo, en un reciente estudio se reportó que Novozym 435 contiene suficiente cantidad de agua en su matriz como para preservar su actividad sin requerir la presencia de una interfase aceite/agua (Halim y Kamaruddin, 2008). En este estudio, el rendimiento de FAME de WCO fue menor que el rendimiento utilizando aceite refinado de palma. Se observó que WCO tenía un contenido de agua levemente mayor comparado al aceite comestible, lo cual pudo promover la hidrólisis del sustrato, disminuyendo el rendimiento de la transesterificación. Por lo tanto, debido a que el contenido

óptimo de agua para la transesterificación enzimática depende del sustrato, las enzimas, el solvente y el material de soporte, el contenido de agua apropiado debe ser evaluado para cada lipasa, optimizando el rendimiento de la reacción y la estabilidad de las enzimas (Fjerbaek *et al.*, 2009).

2.4.5 Cinética de la transesterificación enzimática

De acuerdo a lo anterior, la búsqueda de condiciones óptimas para la producción FAME catalizada con lipasas ha sido ampliamente reportada (Azócar et al., 2010a; Fukuda et al., 2001). Sin embargo, para el uso de lipasas a escala industrial, la información relacionada con la cinética de la tasa de formación de productos y los efectos de los cambios en las condiciones del sistema, son esenciales en el diseño de reactores (Krishna y Karanth, 2001).

Paradojalmente, la cinética enzimática es sólo una insipiente rama dentro de los estudios de producción de FAME. En un comienzo, los reportes sólo se referían al estudio cinético de la esterificación de FFA. En un estudio Krishna y Karanth (2001) establecieron el uso de un modelo basado en el mecanismo de Ping Pong Bi Bi por inhibición competitiva por alcohol y FFA para describir la cinética de la reacción. En una investigación posterior de la esterificación de ácido butírico con metanol, Al-Zuhair *et al.* (2006) utilizaron un modelo simplificado para inhibición competitiva sólo por alcohol denominado modelo de Ping Pong. El estudio cinético de la transesterificación enzimática de TG sólo fue propuesto por Al-Zuhair *et al.* (2007). En ese estudio los autores utilizaron aceite de palma y propusieron un mecanismo de reacción asumiendo que la reacción puede ocurrir a través de una transesterificación directa de TG (Al-Zuhair *et al.*, 2007). En un reciente reporte, Cheirsilp *et al.* (2008) estableció que los estudios de Al-Zuhair *et al.* (2007) tenían la falencia de no considerar las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación, además de la cinética de los productos intermediarios TG, MG, DG y FFA. Como consecuencia, Cheirsilp *et al.* (2008) investigaron los mecanismos de la transesterificación considerando la hidrólisis y esterificación de todos los productos intermediarios, a través de una simulación computacional. En este estudio, los autores encontraron que la hidrólisis y la transesterificación ocurren simultáneamente a una tasa mayor que la reacción de esterificación. Todo lo anterior genera la necesidad de realizar estudios simplificados que permitan modelar la cinética de la catálisis enzimática para la producción de FAME.

CAPÍTULO III. INCORPORACIÓN DE WFO EN LA PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS

Capítulo basado en artículo publicado:

Azócar L., Ciudad G., Heipieper H., Muñoz R., Navia R. (2010) Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. Journal of Bioscience and Bioengineering 109:609-614 (Anexo 1).

3. INCORPORACIÓN DE WFO EN LA PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS

3.1 RESUMEN

Se investigó la utilización de WFO mezclado con aceite de raps como materia prima para la producción de FAME. El proceso fue catalizado con lipasas. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para optimizar la interacción de cuatro variables: el porcentaje de WFO en la mezcla con aceite de raps, la razón molar metanol/aceite, la dosis de Novozym 435 como catalizador y la temperatura. Además, fue demostrado que la adición de un segundo paso de metanol a las 8 horas de reacción disminuyó en forma efectiva la inhibición de la enzima. Usando esta técnica, el modelo obtenido por la MSR predijo que las condiciones óptimas para alcanzar un 100 % de FAME fueron: razón de metanol/aceite 3,8:1 (mol/mol), 100 (% p/p) de WFO, 15 (% p/p) de Novozym 435 y 44,5 °C por 12 horas de reacción a 200 rpm. Experimentos posteriores confirmaron la validez del modelo. De acuerdo al modelo, la adición de WFO incrementó el rendimiento de producción de FAME, lo cual podría estar asociado a su mayor contenido de monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres (en comparación al aceite de raps), los cuales son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática. Por lo tanto, el reemplazo de aceite de raps por WFO en el proceso de producción de FAME catalizado con Novozym 435, podría disminuir los costos de producción debido a que es una materia prima más económica que incrementa el rendimiento de producción. Lo anterior hace a este proceso una potencial alternativa de producción de FAME a escala industrial.

3.2 INTRODUCCIÓN

Debido a que entre un 70 a un 80 % del costo total de producción de FAME corresponde al aceite vegetal, se han comenzado a investigar materias primas alternativas tales como WFO (Canakci, 2007; Gui *et al.*, 2008). Además, también se ha propuesto la utilización de mezclas de materias primas de WFO con aceites vegetales como una opción más flexible para ser implementada a escala industrial (Issariyakul *et al.*, 2008).

El uso de lipasas para producir FAME utilizando aceites vegetales ha sido ampliamente investigado (Azócar *et al.*, 2010a). Para evitar la inhibición de las lipasas por alcoholes de cadena corta se ha propuesto la adición del metanol por pasos (Shimada *et al.*, 2002). Con la finalidad de mejorar el rendimiento del proceso también se han investigado condiciones de operación tales como, temperatura, dosis de lipasa, agitación y razón molar metanol/aceite, utilizando diferentes lipasas y materias primas (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2001; Kose *et al.*, 2002; Ognjanovic *et al.*, 2009).

Pese a la gran cantidad de estudios realizados, existen pocas investigaciones relacionadas con la producción de FAME utilizando WFO como materia prima y lipasas como catalizador. Usando *Rhizopus oryzae* como bicatalizador, los FFA de un WFO sintético fueron esterificados para producir FAME, lo cual incrementó el rendimiento de la reacción (Li *et al.*, 2007). Por otro lado, usando la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada en un polímero microporoso se alcanzó un 97 % de rendimiento de FAME usando aceite de maravilla y sólo un 90,2 % usando WFO como materia prima, bajo las mismas condiciones (Dizge *et al.*, 2009). Watanabe *et al.* (2001) testeó la lipasa Novozym 435 obteniendo un rendimiento 5,5 % menor cuando utilizó WFO como materia prima en vez de un aceite vegetal. Ellos concluyeron que los componentes oxidados de los ácidos grasos podían ser responsables de la disminución del rendimiento, los cuales afectarían negativamente la actividad de la lipasa.

Debido a que los efectos de utilizar WFO en procesos catalizados con lipasas no son claros y por el interés que genera la alternativa de utilizar mezcla de materias primas, en este trabajo se investigó el uso de mezclas WFO-aceites vegetales como materia prima para la producción de FAME, usando Novozym 435 como catalizador. El objetivo de este estudio fue elucidar por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR), el efecto de la incorporación de WFO en el rendimiento de FAME usando Novozym 435 como catalizador y aceite de raps como materia prima. Además, se investigaron características del WFO y del aceite de raps con la finalidad de identificar las propiedades responsables de los resultados obtenidos. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio preliminar para proponer el tiempo óptimo para la adición de metanol por pasos y así disminuir el tiempo total de reacción.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Materiales

Como materia prima se utilizó WFO el cual fue obtenido de un restaurant de la zona, y aceite de raps crudo de una molinera de la Región de la Araucanía. Ambos aceites fueron filtrados antes de su utilización para eliminar impurezas. Como catalizador se utilizó la lipasa de *Candida antárctica* inmovilizada en resina de acrílico cuyo nombre comercial es Novozym 435, la cual fue adquirida en Sigma-Aldrich. Para la cuantificación de los resultados se utilizaron estándares internos de pureza para análisis cromatográfico: metil ester de ácido heptadecanoico, 1,2,3-butanotriol y 1,2,3-tricaprinoilglicerol. Todos los otros químicos utilizados fueron de grado analítico.

3.3.2 Metodología de superficie respuesta

Con la finalidad de analizar y optimizar el efecto de la interacción de cuatro variables en el rendimiento de FAME se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR). De acuerdo a la Tabla 3.1 las variables investigadas fueron: contenido de WFO en la mezcla (% p/p), razón final metanol/aceite (mol/mol), temperatura (°C) y dosis de Novozym 435 (% p/p basado en el peso del aceite). Los niveles del contenido de WFO en la mezcla fueron establecidos para abarcar todo el rango posible de variación. Los niveles de las otras tres variables fueron establecidos de acuerdo a referencias (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Variables y niveles usados en la metodología de superficie de respuesta.

Variables independientes	**Símbolos**	**Niveles**				
		-2	**-1**	**0**	**1**	**2**
WFO en la mezcla [% p/p]	X_1	0	25	50	75	100
Razón metanol/aceite [mol/mol]	X_2	1,50	2,25	3,00	3,75	4,50
Temperatura [°C]	X_3	35	40	45	50	55
Novozym 435 [% p/p]	X_4	3	6	9	12	15

Los experimentos fueron llevados a cabo en orden aleatorio de acuerdo a una matriz central compuesta por 5 niveles y 30 corridas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Diseño de la matriz central compuesta y respuestas obtenidas.

N°	Niveles de variables				Rendimiento de FAME [%]	
	X1 WFO	X2 Metanol	X3 Temperatura	X4 Novozym	Predicho	Experimental
1	25	2,25	40	6	23,8	22,8
2	75	2,25	40	6	30,8	22,8
3	25	3,75	40	6	28,3	28,5
4	25	2,25	40	12	50,0	48,3
5	75	3,75	40	6	26,2	25,1
6	75	2,25	40	12	65,8	68,7
7	50	3,00	35	9	48,3	62,1
8	0	3,00	45	9	62,6	63,6
9	50	3,00	45	9	85,8	84,2
10	25	3,75	40	12	91,7	90,7
11	75	3,75	40	12	98,3	96,0
12	50	3,00	45	9	85,8	83,3
13	50	1,50	45	9	39,2	40,0
14	50	3,00	45	9	85,8	87,3
15	50	3,00	45	3	13,5	14,3
16	75	3,75	50	6	38,0	36,4
17	25	2,25	50	6	54,4	52,5
18	75	2,25	50	6	51,4	54,4
19	25	3,75	50	6	50,1	54,1
20	50	3,00	45	9	85,8	87,2
21	50	3,00	45	9	85,8	86,1
22	100	3,00	45	9	66,2	67,6
23	50	3,00	45	9	85,8	87,5
24	75	3,75	50	12	94,7	97,6
25	25	3,75	50	12	98,1	96,4
26	50	3,00	45	15	96,5	97,8
27	50	4,50	45	9	67,4	68,7
28	75	2,25	50	12	71,0	65,8
29	25	2,25	50	12	65,3	68,1
30	50	3,00	55	9	75,2	73,9

Cada corrida fue realizada en triplicado. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en matraces conteniendo 1 mL de aceite y agitadas a 200 rpm. El volumen de aceite en los matraces fue seleccionado de tal manera de mantener una perfecta agitación en las muestras cuando se utilizó la mayor dosis de catalizador y la menor razón molar de metanol/aceite. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando diferentes combinaciones de mezclas de materia prima, dosis de catalizador, razón molar metanol/aceite y temperatura, de acuerdo a la Tabla 3.2.

Para evitar la inhibición de la lipasa el metanol fue adicionado en dos pasos, utilizando una adaptación de la metodología propuesta por Shimada *et al*. (2002). En el primer paso se adicionó un tercio de la razón molar total de acuerdo a la Tabla 3.1. En el segundo paso se adicionaron los dos tercios remanentes para completar la razón molar total de acuerdo a la misma tabla. Se realizó un estudio preliminar con la finalidad de establecer el tiempo total de reacción y el tiempo en que se debía adicionar el segundo paso de metanol. Este experimento fue llevado a cabo durante 48 horas, utilizando las condiciones de operación del punto central de la MSR, es decir, 50 (% p/p) de WFO en la mezcla, razón metanol/aceite 3/1 (mol/mol) y 9 (% p/p) Novozym 435 a 45 °C y 200 rpm. Luego de cada experimento las muestras fueron inmediatamente almacenadas a 4 °C para detener la reacción. Para la cuantificación del contenido de FAME en las muestras, el sobrenadante fue analizado utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa (gas chromatography coupled with mass spectrometry, GC-MS) de acuerdo a la normativa para FAME EN-14214 (Ver anexo A2.2). Los resultados también fueron expresados en función de la productividad de la reacción en gramos de FAME producido por gramos de enzima utilizados por hora.

3.3.3 Análisis estadístico

Los datos de rendimiento de FAME obtenidos (Tabla 3.2) fueron ajustados a una ecuación de segundo orden polinomial. Esta ecuación describe la relación entre la respuesta predicha (rendimiento de FAME) y las variables independientes (Tabla 3.1). El modelo polinomial obtenido para el rendimiento de FAME se muestra en la ecuación (3.1). Con la ecuación del modelo polinomial ajustado se desarrollaron gráficos de contorno para analizar la interacción entre los términos y sus efectos en el rendimiento de FAME.

$$FAME_{[\%]} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{4} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i<j=1}^{4} \beta_{ij} X_i X_j \qquad (3.1)$$

Donde:

β: 0= intercepto, i= lineal, ii=cuadrático y ij= interacción.

Xi, Xj: i= 1, 4; j=1; i ≠ j representan las variables independientes codificadas.

3.3.4 Caracterización de las materias primas

Para identificar y cuantificar los ácidos grasos de la materia prima se utilizó GC-MS según metodología analítica (sección A2.2). Previo a la inyección en el cromatógrafo de gases, el WFO y el aceite de raps fueron metilados de acuerdo a la metodología de Araújo (1995) (sección A2.2). La gravedad específica, viscosidad cinemática, acidez, índice de peróxido y yodo, también fueron determinados según Araújo (1995) (ver metodología analítica en anexos). Junto a lo anterior, se midieron los siguientes parámetros de acuerdo a ASTM *Standard Methods* (ASTM, 2008): agua y sedimentos (ASTM Standard D 1976-97), punto de escurrimiento (ASTM Standard D 97-04), contenido de azufre (ASTM Standard D 7039-04) y punto de inflamación (ASTM Standard D 56-02a) (ver metodología analítica en Anexos A2).

Con la finalidad de elucidar los posibles efectos de los diferentes ácidos grasos en la actividad de Novozym 435, se llevó a cabo un experimento cuantificando la composición de ácidos grasos en la materia prima previo a la reacción y en el producto después de la reacción. Este experimento fue realizado en triplicado usando aceite de raps como materia prima, razón metanol/aceite 3/1 (mol/mol), 9 (% p/p) de Novozym 435 y 45 °C a 200 rpm durante 6, 8, 12, 24 y 48 horas de reacción. El contenido de ácidos grasos fue analizado en la entrada y en la salida del proceso y los datos fueron analizados según el test estadístico t de student para establecer diferencias significativas.

Finalmente, para establecer el grado de degradación de los aceites se analizó el contenido de monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), triglicéridos (TG) y FFA en las materias primas utilizadas (ver metodología analítica en anexos A2.3 y A2.4).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Adición de metanol

A pesar de que se requiere una razón molar de metanol/aceite 3:1 para completar la reacción de transesterificación, la solubilidad del metanol en aceite es menor a 1,5 moles de metanol por 1 mol de aceite (Shimada *et al.*, 2002). Por lo tanto, una alta concentración de metanol podría producir la inhibición de la lipasa usada en este estudio, debido a su baja solubilidad en aceite (Du *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2002). En función de lo anterior, se diseñó un experimento adicionado el metanol en dos pasos. La Figura 3.1 muestra los resultados de rendimiento de FAME y de productividad obtenidos en este estudio. La experiencia fue llevada a cabo adicionado una concentración inicial de un tercio de los moles de metanol necesarios para completar la reacción. Cuando alrededor de un tercio del aceite fue convertido en FAME luego de 8 horas de reacción, se adicionaron los dos tercios remanentes de metanol a la reacción (Fig. 3.1A). La adición de una mayor concentración de metanol en el segundo paso fue determinada de acuerdo a Shimada *et al*. (2002), quien estableció que el metanol es más soluble en FAME que en TG en un experimento utilizando Novozym 435 como catalizador.

Li *et al*. (2009) reportó que a pesar de el alto rendimiento alcanzado usando adición de metanol por pasos, esto generaba largos tiempos de reacción y lentas tasas de conversión de FAME. En experimentos usando adición de metanol en tres pasos y 4 (% p/p) de Novozym 435 como catalizador, fue posible alcanzar un alto rendimiento de FAME pero solamente después de 50 horas de reacción (Du *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2001). En forma similar, en un estudio reciente se utilizó un tiempo de incubación de 50 horas para poder alcanzar altos rendimientos (Ognjanovic *et al.*, 2009). Estos largos tiempos de reacción se deben a que comúnmente el segundo paso de metanol es adicionado luego de alcanzar un tercio (33,3 %) del rendimiento de FAME en la reacción, lo que significa que el metanol adicionado en el primer paso ha sido completamente consumido (Du *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2002). Esta metodología produce una fase estacionaria en el rendimiento de FAME, disminuyendo la productividad de la reacción.

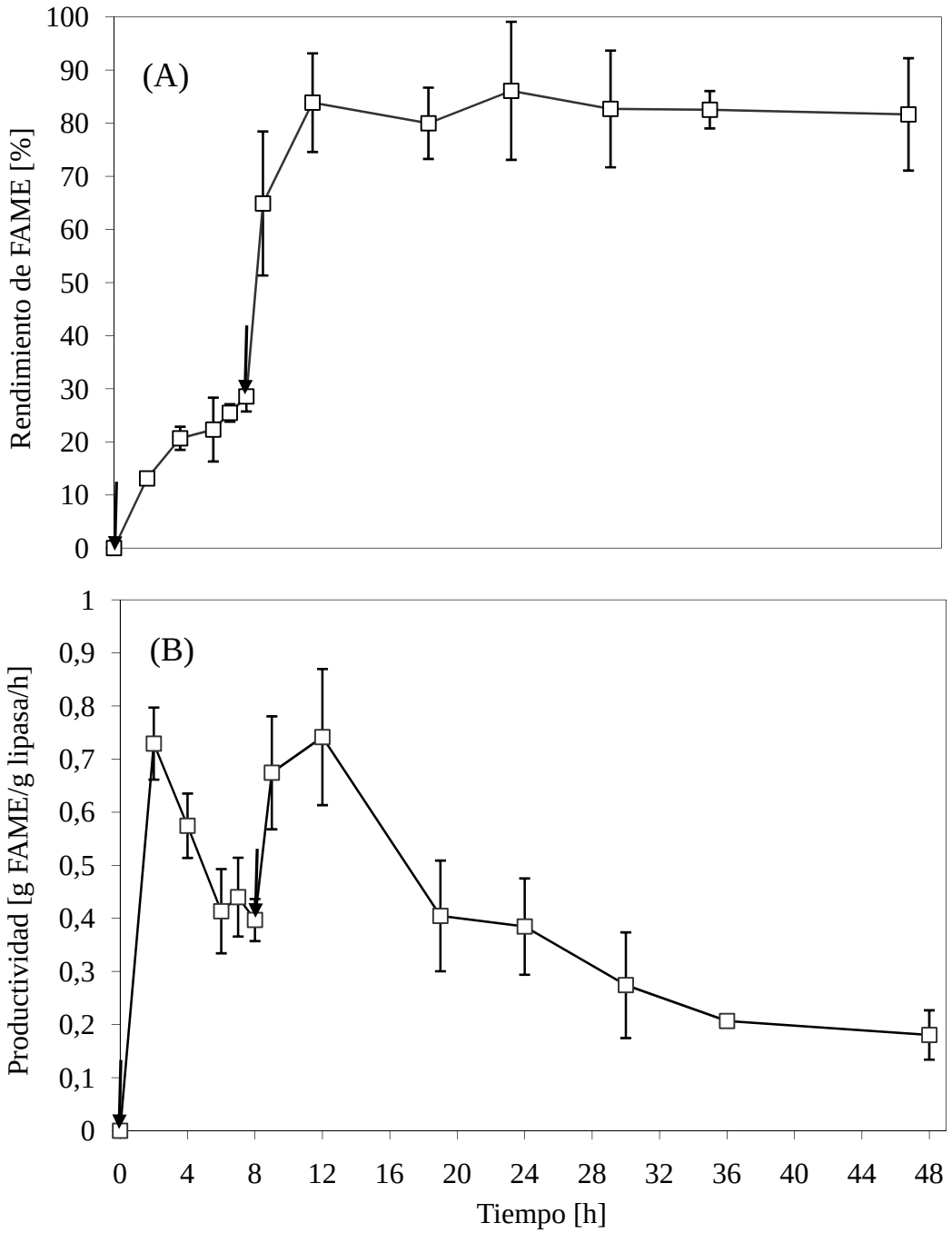

Figura 3.1 (A) Rendimiento y (B) productividad de FAME durante la reacción. Condiciones de operación: 50 (% p/p) de WFO en la mezcla de materia prima, razón metanol/aceite 3:1 (mol/mol), 9 (% p/p) de Novozym 435 y 45 °C a 200 rpm. Las flechas indican la adición de metanol (1/3 de los moles necesarios en el primer paso y 2/3 en el segundo paso).

A diferencia de otros estudios, en esta investigación el segundo paso de metanol fue adicionado cuando se alcanzó aproximadamente un 28,6 % de rendimiento de FAME, después de 8 horas de reacción. Esta metodología de adición en dos pasos permitió incrementar la productividad sobre los 0,7 g FAME/g lipasa/h a las 12 horas de reacción (Fig. 3.1B). Esto se debió a que se evitó la fase estacionaria, permitiendo alcanzar un *plateau* con un máximo rendimiento de FAME (Fig. 3.1A).

En un estudio reciente Li *et al*. (2009) reportó reducciones similares en el tiempo de reacción debido a la disminución de la fase estacionaria. Estos resultados estarían asociados a que Novozym 435 ha demostrado ser un catalizador robusto y estable en presencia de alcoholes de cadena corta, a diferencia de otras lipasas investigadas (Hernandez-Martin y Otero, 2008). Por lo tanto, en los experimentos de MSR, la primera dosis de metanol (un tercio de la razón molar mostrada en la Tabla 3.1) fue adicionada al comienzo de la reacción, mientras la segunda dosis (dos tercios de la razón molar mostrada en la Tabla 3.1) fue adicionada luego de 8 h de reacción. El tiempo total de reacción fue de 12 horas.

3.4.2 Optimización de las condiciones de metanólisis

Se investigaron cuatro variables que previamente han mostrado un efecto significativo en el rendimiento de FAME. Los niveles de las variables razón molar metanol/aceite, temperatura y dosis de Novozym 435 fueron establecidos según literatura (Du *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2001; Kose *et al.*, 2002). Además, de acuerdo a experimentos previos (datos no mostrados) el contenido de WFO en la materia prima fue incluido como una cuarta variable para testear su efecto en el rendimiento de FAME. El diseño de la matriz central compuesta es mostrado en las Tablas 3.1 y 3.2.

La Tabla 3.2 muestra un rendimiento mínimo de FAME de 14 % obtenido para la corrida experimental número 15, la cual corresponde al experimento con el menor porcentaje de catalizador (3 % p/p de Novozym 435). En este sentido, ha sido recientemente reportado que es factible alcanzar altos rendimientos de FAME usando bajas dosis de enzimas, pero estas reacciones requerirían tiempos de reacción excesivamente largos (alrededor de 50 h) (Ognjanovic *et al.*, 2009). En la presente investigación, bajo las condiciones de operación de

dos corridas experimentales (11 y 25) fue posible alcanzar un máximo rendimiento de FAME, el cual se encuentra dentro de lo establecido por la normativa EN-14214 (> 96,5 %).

Para comprender y optimizar la relación entre las variables testeadas, los datos experimentales obtenidos (Tabla 3.2) fueron ajustados a una ecuación polinomial de segundo orden por medio de MSR. El ajuste del modelo obtenido fue testeado por análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró un bajo valor de *p*, además de un alto coeficiente de determinación (R^2) y un alto valor para el ajuste del coeficiente de determinación (R^2 Aj.) (Tabla 3.3). El bajo valor de *p* obtenido indica que el modelo representa con precisión la relación entre la respuesta y las variables. El valor de R^2 indica que la variación en el rendimiento de FAME está correlacionada en un 95,3 % con las variables independientes y el valor de R^2 ajustado indica un 94,5 % de correlación entre las variables independientes.

Tabla 3.3 Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático polinomial.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Promedio de cuadrados	F	p
Modelo	63749,8	14	4553,6	115,86	0,000*
Error residual	3144,0	80	39,3	-	-
Falta de ajuste	585,0	10	58,5	1,60	0,125
Error puro	2559,0	70	36,6	-	-
Total	66893,8	94	-	-	-
R^2 = 0,953					
R^2Aj=0,945					

*Significativo al 1 %.

La pérdida de ajuste se refiere al hecho de que un simple modelo de regresión lineal no pueda ajustar adecuadamente los datos experimentales. La Tabla 3.3 muestra también un valor de *p* para la pérdida de ajuste de 0,125 (> 0,1), lo cual indica que no hay una pérdida de ajuste significativa, lo que quiere decir que no es necesario evaluar un modelo más complejo.

Los valores de *p* obtenidos del análisis de regresión mostraron que todos los coeficientes de los términos lineales, de interacción y cuadráticos tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de FAME (Tabla 3.4). Todos los términos lineales y cuadráticos, así como los de interacción X_1X_3, X_2X_4 y X_3X_4, fueron significativos al 1 %. Los términos de interacción

X_1X_2, X_1X_4 y X_2X_3 fueron significativos al 5 %. Por lo tanto, el modelo final entregado por la MSR en términos de las variables codificadas puede ser escrito según la ecuación 3.2.

Tabla 3.4 Resultados del análisis de regresión del modelo polinomial de segundo orden para la optimización de las condiciones de reacción.

Término	Valor estimado	p
Intercepto	-896,521	> 0,001*
X_1	1,899	> 0,001*
X_2	91,397	> 0,001*
X_3	28,056	> 0,001*
X_4	19,993	> 0,001*
X_1X_1	-0,009	> 0,001*
X_2X_2	-14,433	> 0,001*
X_3X_3	-0,240	> 0,001*
X_4X_4	-0,854	> 0,001*
X_1X_2	-0,122	0,017**
X_1X_3	-0,020	0,008*
X_1X_4	0,029	0,022**
X_2X_3	-0,586	0,020**
X_2X_4	4,125	> 0,001*
X_3X_4	-0,256	> 0,001*

* Significativo al 1 %.
** Significativo al 5 %.

Los principales factores que afectaron el rendimiento de FAME fueron los términos lineales X_1, X_2, X_3 y X_4, el término cuadrático X_2^2 y el término de interacción X_2X_4. Los términos lineales con coeficientes positivos indican un incremento en el rendimiento de FAME (Tabla 3.4). Como X_1 es un término positivo, es posible establecer que la incorporación de WFO en la mezcla como materia prima podría incrementar el rendimiento de la reacción.

Para validar el modelo empírico se comparó un punto experimental al azar con la predicción del modelo (Ec. (3.2)), encontrándose un error menor al 8 %. Además, a través del modelo (Ec. (3.2)) y de acuerdo al criterio límite de la máxima respuesta de rendimiento de FAME, fue posible predecir las condiciones óptimas de reacción. De acuerdo a lo anterior, las condiciones predichas para alcanzar un 100 % de rendimiento de FAME fueron: 100 (% p/p) WFO, razón metanol/aceite de 3,8/1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435 y 44,5 °C. Estas condiciones predichas demostraron que la incorporación de WFO en la reacción incrementa el rendimiento de FAME.

$$\begin{aligned} \textit{Rendimiento de FAME}_{(\%)} = & -896,52 + 1,90 \cdot X_1 + 91,40 \cdot X_2 + 28,06 \cdot X_3 \\ & + 20,00 \cdot X_4 - 0,01 \cdot X_1^2 - 14,46 \cdot X_2^2 - 0,24 \cdot X_3^2 \\ & - 0,85 \cdot X_4^2 - 0,12 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,02 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,03 \cdot X_1 \cdot X_4 \\ & - 0,59 \cdot X_2 \cdot X_3 + 4,13 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,26 \cdot X_3 \cdot X_4 \end{aligned} \tag{3.2}$$

Por otro lado, usando este modelo es posible predecir diversas condiciones óptimas para alcanzar altos rendimientos de FAME, las cuales a su vez podrían reducir los costos de producción y la dosis de enzima. Por ejemplo, de acuerdo al modelo es posible alcanzar un 96 % de rendimiento de FAME usando 75 (% p/p) de WFO en la mezcla de materia prima, con una razón metanol/aceite 3,75/1 (mol/mol), 12 (% p/p) Novozym 435 y 40 °C.

De acuerdo a lo anterior, se generaron gráficos de contorno con la finalidad de ilustrar que es posible encontrar diversas combinaciones óptimas para alcanzar altos rendimientos. Las Figuras 3.2, 3.3 y 3.4 son gráficos de contorno predichos por el modelo, que muestran el efecto de la interacción de las variables en el rendimiento de FAME. Estos gráficos fueron generados para mostrar el efecto de dos variables en la respuesta, manteniendo constantes las otras dos variables independientes.

La Figura 3.2 muestra la interacción entre dos variables independientes (WFO en la mezcla de materia prima y dosis de Novozym 435) y sus efectos en la variable respuesta rendimiento de FAME, mientras las otras dos variable fueron mantenidas en el punto central de la matriz. Bajo estas condiciones, el incremento de la dosis de Novozym 435 produjo un incremento en

el rendimiento de FAME. Este efecto es adicionalmente incrementado cuando el WFO fue incorporado hasta en un 80 % en la mezcla de materia prima. Por lo tanto, bajo las condiciones investigadas WFO parece ser un sustrato más disponible para ser catalizado por Novozym 435, comparado al aceite de raps.

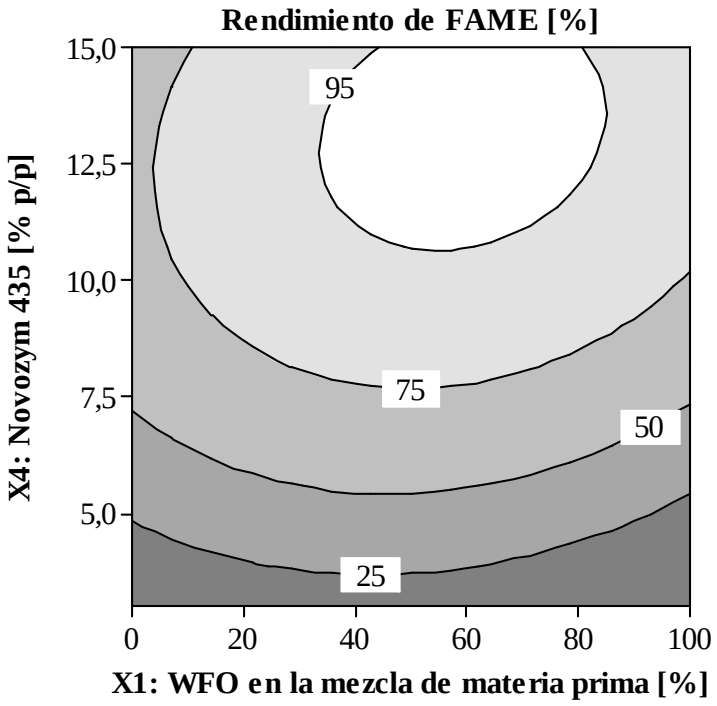

Figura 3.2 Gráfico de contorno de rendimiento de FAME predicho por el modelo a 45 °C y razón metanol/aceite 3:1 (mol/mol).

El rendimiento de FAME fue más susceptible a la dosis de Novozym 435, lo que significa que altas dosis de enzimas son necesarias para alcanzar altos rendimientos de producción. En este sentido, con la finalidad de disminuir los costos de producción para futuras aplicaciones industriales, sería interesante llevar a cabo investigaciones que permitan determinar el efecto de utilizar catalizadores biológicos más económicos. Además, debido a que Novozym 435 ha mostrado tener una alta actividad residual en utilizaciones sucesivas, experimentos con subsecuentes protocolos de recuperación y reutilización las enzimas podrían ser realizados bajos las condiciones óptimas establecidas en esta investigación (Hernandez-Martin y Otero, 2008).

Recientemente, Issariyakul *et al*. (2008) investigaron el uso de WFO mezclado con aceite de raps utilizando un catalizador alcalino. Sin embargo, el rendimiento de FAME alcanzado fue menor cuando se incorporó el WFO en la reacción. Cuando se usa un catalizador alcalino se produce jabón, lo que disminuye el rendimiento de la reacción. Aunque el costo de las lipasas es significativamente mayor que el costo de catalizadores alcalinos, su uso podría resolver las principales desventajas del proceso convencional de producción de FAME: el uso de aceite vegetal puro (el cual corresponde a un 80 % del costo total del proceso) y la competencia con productos alimenticios (Gui *et al.*, 2008). Además, si el proceso con lipasas es llevado a cabo con enzimas inmovilizadas, se podría evitar la generación de residuos líquidos así como los complejos procesos de purificación de glicerol, disminuyendo aun más los costos de producción. Por lo tanto, en esta investigación se ha demostrado que la incorporación de WFO en la materia prima para reemplazar total o parcialmente el aceite de raps en procesos catalizados con Novoym 435, puede disminuir los costos y simultáneamente incrementar el rendimiento de producción, lo cual hace que esta sea una alternativa potencial para la producción de FAME a escala industrial.

Bajo las condiciones estudiadas el rendimiento de FAME fue afectado en forma más significativa por la razón molar metanol/aceite y por la dosis de Novozym 435, comparado al efecto de la temperatura (Figuras 3.3 A y 3.3 B). El rendimiento de FAME fue incrementado cuando la temperatura aumentó desde 45 a 50 °C; sin embargo, una tendencia opuesta fue observada para temperaturas mayores a 50 °C. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Kose *et al.* (2002), quien estableció que para temperaturas sobre 50 °C el rendimiento de FAME disminuye producto de la inactivación de la enzima.

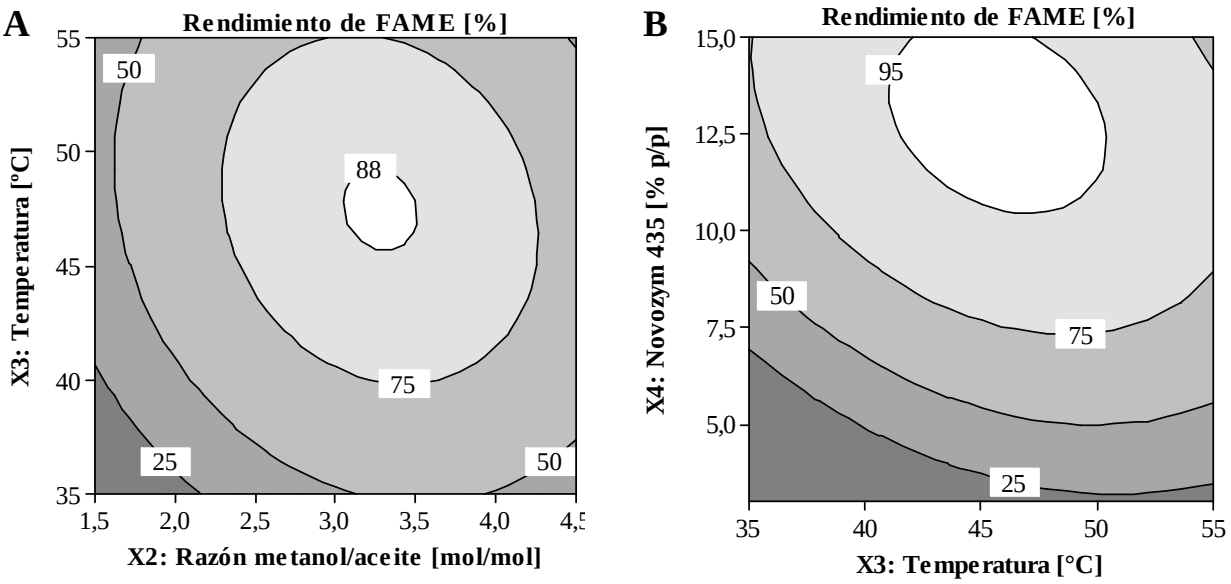

Figura 3.3 Gráficos de contorno de rendimiento de FAME predicho por el modelo para 50 (% p/p) WFO. (A) 9 (% p/p) de Novozym 435 y (B) razón metanol/aceite 3:1 (mol/mol).

De acuerdo a la Figura 3.4, también fue posible observar un incremento en el rendimiento de FAME cuando se incrementó la razón metanol/aceite junto con la dosis de Novozym 435. De acuerdo a Hernandez-Martin y Otero (2008), cuando se utiliza una alta dosis de biocatalizador, también son necesarias altas cantidades de alcohol para proveer líquido suficiente y mantener una suspensión uniforme del catalizador. Esto con la finalidad de evitar problemas de agitación y de transferencia de masa. Además, como Novozym 435 es un catalizador resistente en presencia de alcoholes de cadena corta, el exceso de alcohol permite mantener el glicerol en solución previniendo la pérdida de actividad de Novozym 435 por el recubrimiento de la enzima por glicerol (Hernandez-Martin y Otero, 2008). Por lo tanto, los niveles de Novozym 435 usados y el protocolo de adición por pasos establecido, parecen haber evitado posibles limitaciones por difusión generando altos rendimientos de FAME.

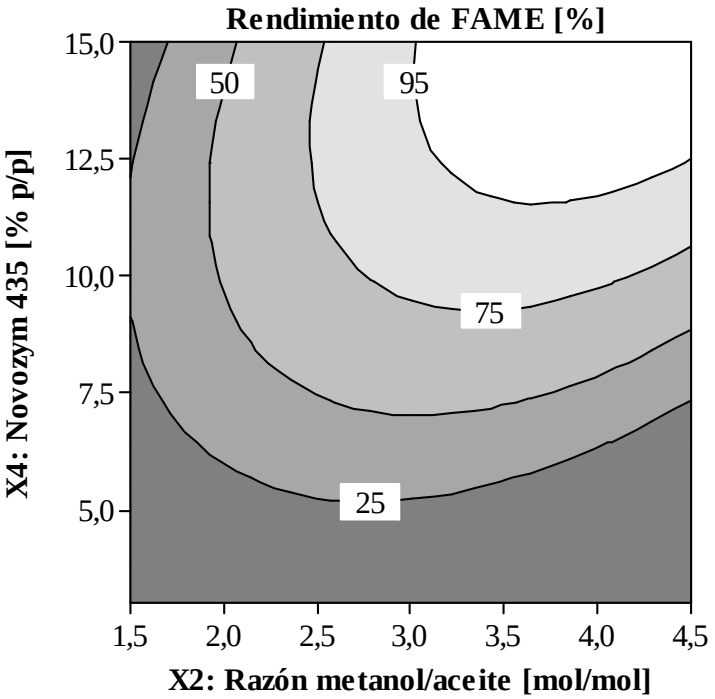

Figura 3.4 Gráfico de contorno de rendimiento de FAME predicho por el modelo para 50 (% p/p) de WFO a 45 °C.

3.4.3 Propiedades de la materia prima que afectan la metanólisis

Se investigaron las características de la materia prima con la finalidad de determinar propiedades responsables de los resultados obtenidos en la MSR, particularmente, el incremento en el rendimiento de FAME cuando se incorporó WFO en el proceso.

Se encontraron diferencias en la mayoría de las propiedades físicas de los aceites caracterizados (WFO y aceite de raps) (Tabla 3.5). Los procesos de fritura produjeron un incremento en el valor de acidez y en el valor de peróxido de WFO, lo cual se debe a reacciones de hidrólisis y oxidación, respectivamente (Araújo, 1995). El alto índice de peróxido del WFO podría afectar positivamente las características del FAME, debido a que esto se traduce en un mayor contenido de oxígeno que podría incrementar la eficiencia de la combustión (Lin y Lin, 2007). Sin embargo, un alto contenido de oxígeno en el FAME también podría promover mayores emisiones de óxidos de nitrógeno durante el proceso de combustión (Lin y Lin, 2007).

Tabla 3.5 Propiedades y composición de las materias primas.

Propiedades fisicoquímicas	Materia prima*	
	WFO	Aceite de raps
Densidad [kg/m^3 a 20 °C]	925,0	927,0
Viscosidad cinemática a 40 °C [cst]	37,0	34,0
Índice de acidez [mg KOH/g]	4,5	0,8
Índice de yodo [g I_2/100 g aceite]	111,0	105,0
Índice de peróxido [meq/kg]	15,2	4,1
Agua y sedimentos [%v/v]	1,3	< 0,01
Azufre [mg/L]	2,0	7,0
Punto de escurrimiento [°C]	-6,7	-23,3
Punto de inflamación [°C]	> 100,0	>100,0
Composición de ácidos grasos [% p/p]		
Palmítico [C16:0]	12,2	4,2
Esteárico [C18:0]	4,1	1,3
Oleico [C18:1]	28,5	66,6
Linoleico [C18:2]	49,5	18,7
Linolénico [C18:3]	3,5	7,7
Araquídico [C20:0]	0,2	0,4
Eicosénico [C20:1]	0,1	1,0
Eicosapentaenoico [C20:5]	0,2	0,1
Erúcico [C22:1]	0,0	0,1
Otros	1,7	0,0
Composición de acilglicéridos y FFA [% p/p]		
Monoacilglicéridos	0,1	0,0
Diacilglicéridos	3,3	0,5
Triacilglicéridos	93,5	98,7
FFA	3,1	0,8

*Las muestras fueron filtradas antes de los análisis.

El WFO analizado fue originalmente una mezcla de aceite de soya y aceite de maravilla, los cuales son caracterizados por un índice de yodo de alrededor de 130 g I_2/100 g aceite. Como el índice de yodo disminuyó por reacciones de polimerización durante el proceso de fritura, el WFO alcanzó un índice de yodo similar al del aceite de raps (Tabla 3.5). Bajos valores de índice de yodo pueden mejorar la estabilidad oxidativa del combustible. Sin embargo, también pueden incrementar el punto de escurrimiento, lo cual puede afectar negativamente el

funcionamiento del motor a bajas temperaturas. La viscosidad cinemática del WFO también fue medida, encontrándose un valor levemente mayor comparado al aceite de raps, lo cual debería ser un resultado de las reacciones de polimerización durante los procesos de fritura. El contenido de azufre también fue analizado, encontrándose en menor concentración en el WFO debido a que se trató de un aceite refinado, a diferencia del aceite de raps que fue un aceite sin refinar (crudo). En el análisis comparativo también se encontró un mayor índice de acidez en el WFO que en el aceite de raps, lo que significa un mayor contenido de FFA. De acuerdo a Li *et al.* (2007) un mayor contenido de FFA podría incrementar el rendimiento de FAME usando un biocatalizador tal como Novozym 435, debido a reacciones directas de esterificación.

La esterificación de FFA produce 1 mol de agua por 1 mol de FAME producido. En este trabajo se cuantificó el agua y sedimentos de las materias primas, encontrándose bajos niveles en el WFO y en el aceite de raps con un contenido levemente mayor para el caso de WFO (Tabla 4.5). Sin embargo, debido a que WFO tiene un mayor contenido de FFA, la incorporación de WFO en la mezcla de materias primas podría incrementar el contenido de agua durante el proceso, debido a las reacciones de esterificación de FFA. Aunque las lipasas necesitan una cantidad óptima de agua para mantener su actividad catalítica en medio orgánico, una investigación reciente reportó que Novozym 435 al estar hidratada contiene suficiente agua en su matriz para preservar su actividad catalítica sin requerir la presencia de la interface agua/aceite (Ognjanovic *et al.*, 2009). Además, en otro estudio ha sido reportado que Novozym 435 necesita un medio más bien anhidro para ser más efectiva (Salis *et al.*, 2005). De acuerdo a estos estudios previos, cuando WFO fue incorporado en la mezcla de materias primas, el rendimiento de la reacción debería haber disminuido como resultado del alto contenido de agua en la reacción. Entonces, el incremento en el rendimiento de FAME cuando WFO fue incorporado en la reacción, no pudo haber sido producido por la presencia de agua durante el proceso.

Al comparar la composición de ácidos grasos de WFO y aceite de raps también se encontraron diferencias (Tabla 3.5). Con la finalidad de analizar el rol de los ácidos grasos en la producción de FAME, se realizó un análisis comparativo de la composición de ácidos grasos en la entrada y en la salida del proceso (Figura 3.5). La inhibición por sustrato durante la esterificación de FFA ha sido ampliamente reportada, sin embargo, la inhibición durante la transesterificación de aceites vegetales solo ha sido recientemente investigada (Al-Zuhair *et*

al., 2007). En este estudio, no se encontraron diferencias significativas entre la composición de ácidos grasos en la entrada y en la salida del sistema. Por lo tanto, la diferencia de la composición de ácidos grasos de las materias primas, no debería tener un efecto significativo en el rendimiento de FAME. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Al-Zuhair *et al.* (2007), quienes establecieron que la composición de ácidos grasos en el aceite de palma y en los metil ésteres producidos de este aceite, permaneció casi constante usando lipasas como catalizadores.

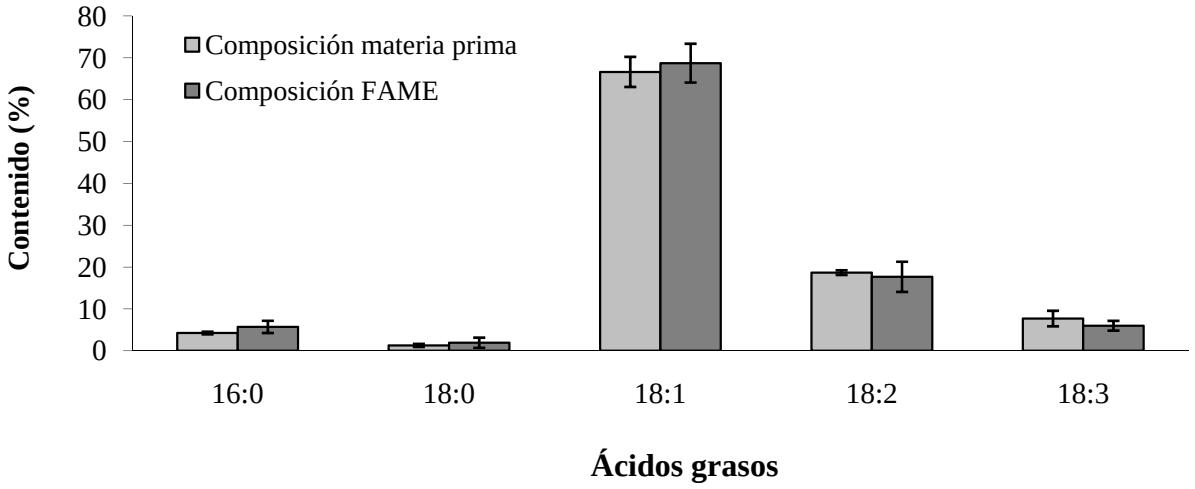

Figura 3.5 Composición de ácidos grasos en la entrada y en la salida de la reacción para la producción de FAME, (sin diferencias significativas usando test t de Student con P<0,05). Condiciones de operación: 0 (% p/p) WFO en la mezcla de materias primas, razón metanol/aceite 3:1 (mol/mol), 9 (% p/p) Novozym 435 y 45 °C a 200 rpm.

La composición de acylglicéridos MG, DG, TG y el contenido de FFA de los aceites estudiados fueron cuantificados para su comparación. La suma de MG, DG y FFA en el WFO fue un 6,4 % comparado con sólo un 1,3 % encontrado en el aceite de raps (Tabla 3.5). Turkan y Kalay (2006) establecieron que en la transesterificación catalizada por Novozym 435, el primer paso (es decir la conversión de TG a DG) es el paso determinante de la tasa de reacción, debido a que los TG son convertidos en FAME sin una acumulación significativa de MG y DG. Este hecho indica que MG, DG y FFA pueden ser fácilmente convertidos a FAME

en comparación a los TG. Por lo tanto, WFO es un sustrato más disponible en el proceso investigado, comparado al aceite de raps, lo que incrementaría el rendimiento de FAME cuando WFO es incorporado a la reacción.

3.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO III

De acuerdo a la MSR, la óptima combinación de condiciones predichas para obtener un 100 % de rendimiento de FAME fueron el uso de 100 (% p/p) de WFO, razón metanol/aceite 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435 y 44,5 °C a 200 rpm. La adición de metanol en dos pasos fue previamente establecida. Una adición temprana del segundo paso luego de 8 h de reacción fue una técnica efectiva para incrementar la productividad disminuyendo el tiempo total de reacción a 12 h y previniendo a la vez la inhibición de las enzimas. El modelo empírico obtenido de la MSR predijo que existen diversas combinaciones de condiciones óptimas para alcanzar altos rendimientos de FAME. De acuerdo a este modelo, la adición de WFO incrementó el rendimiento de FAME, y su efecto pudo ser principalmente atribuido al mayor contenido de MG, DG y FFA en el WFO, comparado al aceite de raps, los cuales son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática. Por lo tanto, el reemplazo total o parcial del aceite de raps por WFO en procesos catalizados por Novozym 435, podría disminuir los costos de producción del FAME, debido a que es una materia prima más económica que adicionalmente incrementa el rendimiento de FAME. Por lo tanto, este proceso es una alternativa potencial para la producción de FAME a escala industrial. Finalmente, las futuras investigaciones en esta materia deberían enfocarse en estudiar el efecto de la utilización de WFO en las propiedades del producto y en la posibilidad de reutilizar la lipasa Novozym 435 bajos las condiciones de operación establecidas en este trabajo.

CAPÍTULO IV. PRODUCCIÓN DE FAME CATALIZADA CON LIPASAS EN MEDIO ANHIDRO

Capítulo basado en patente solicitada

Azócar L, Navia R, Betancourt R, Farías O (2010) Proceso de producción de biodiesel comercializable y de baja acidez. N° registro 31032010, INAPI, Chile (Anexo 2).

4.1 RESUMEN

Junto con la reacción de transesterificación, la producción de FAME en procesos catalizados con lipasas puede ser llevada a cabo a través de reacciones sucesivas de hidrólisis y esterificación. La hidrólisis de TG produce FFA, lo que puede generar un producto con altos índices de acidez y fuera de la normativa. Por lo tanto, la acidez en el FAME podría depender del contenido de agua en la reacción ya que favorecería la hidrólisis de TG. Con la finalidad de mejorar el rendimiento de la reacción y las propiedades del producto, se investigó el uso de un medio anhidro generado por extracción de agua durante la reacción para la producción de FAME catalizada por lipasas. La producción de FAME catalizada por Novozym 435 fue llevada a cabo usando WFO como materia prima y metanol como aceptor acilo, adicionado tamices moleculares de tamaño de poro de 3 Å para remover el agua durante la reacción. Usando un medio anhidro, el índice de acidez fue significativamente menor evitando la reacción de hidrólisis de TG. Además, usando este medio, fue posible incrementar el rendimiento de FAME a través de la inhibición de reacciones de hidrólisis y esterificación, produciendo FAME principalmente por transesterificación de triglicéridos. Finalmente, se observó una disminución del contenido de DG probablemente debido a que lo tamices produjeron migración acil en la reacción, favoreciendo la actividad de Novozym 435 que es una lipasa con especificidad *sn*-3. Estos resultados demostraron que el medio anhidro es una alternativa que permitiría implementar los procesos catalizados por lipasas a nivel industrial, para producir FAME principalmente por transesterificación, con propiedades acordes a la normativa para biodiesel.

4.2 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han reportado diversos procesos efectivos para la producción de FAME catalizados con lipasas (Azócar *et al.*, 2010a; Fukuda *et al.*, 2008). La producción de FAME en procesos catalizados con lipasas puede ser llevada a cabo a través de la reacción de transesterificación. De acuerdo a Al-Zuhair *et al.* (2007), la transesterificación ocurre por donación o aceptación de protones en grupos funcionales ácidos o básicos, los cuales se encuentran en los sitios activos de las enzimas. La transesterificación ocurre en etapas, con MG y DG como productos intermediaros para finalmente producir FAME y glicerol.

Junto con la reacción de transesterificación, la producción de FAME en procesos catalizados con lipasas puede ser llevada a cabo a través de reacciones sucesivas de hidrólisis y esterificación. La hidrólisis de TG produce FFA y glicerol. Subsecuentemente, la esterificación de FFA produce FAME y agua como subproducto (Li *et al.*, 2009). La desventaja de este proceso comparado con la transesterificación es que el agua producida por esterificación promueve la hidrólisis de TG. La hidrólisis durante el proceso puede producir FAME con un alto índice de acidez, lo cual generaría la necesidad de tratamientos adicionales para cumplir con los estándares internacionales para FAME (entre < 0,5 y < 0,8 mg KOH/g aceite, dependiendo del país de origen de la normativa) (Fukuda *et al.*, 2008). Este problema podría ser incrementado si se utilizan materias primas con altos índices de acidez, tales como WFO, aceite de jatrofa, aceite de microalgas o de palma sin refinar, entre otros (Azócar *et al.*, 2010a).

Por otro lado, se ha reportado que la activación de las lipasas involucra la reestructuración de su sitio activo, lo cual requiere la presencia de una interface agua-aceite (Yu *et al*., 2010). En este contexto, Yu *et al.* (2010) reportaron que para llevar a cabo un proceso efectivo es recomendable adicionar pequeñas dosis de agua a la reacción. La desventaja es que el exceso de agua puede estimular reacciones de hidrólisis, generándose un producto más acidificado.

Una solución para evitar la producción de FAME acidificado cuando éste es producido por biocatálisis, sería evitar las reacciones de hidrólisis y esterificación, llevando a cabo el proceso en un medio anhidro sólo a través de la transesterificación de TG. Usando la lipasa comercial Novozym 435 se han alcanzado rendimientos de FAME superiores en comparación a otras enzimas investigadas bajo similares condiciones de operación. Además, Novozym 435 ha sido reportada como una lipasa que podría contener suficiente cantidad de agua en su matriz como para preservar su actividad catalítica en un medio anhidro (Ognjanovic *et al.*, 2009; Tamalampudi *et al.*, 2008). En un reciente estudio utilizando la metodología de superficie de respuesta, se correlacionó la concentración de Novozym 435 versus la concentración de agua, encontrándose mayores rendimientos de FAME (92 %) cuando se utilizó el medio con la menor concentración de agua (0 %) y con la mayor dosis de enzima (5 % basado en el peso del aceite). En otra investigación, Novozym 435 mostró una menor actividad por la presencia de agua en la reacción, por lo que fue sugerida la utilización de un medio anhidro para hacer más eficiente la catálisis (Tamalampudi *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anterior, el uso de un medio anhidro podría ser una alternativa efectiva para que los procesos catalizados por lipasas puedan competir con el proceso químico convencional, obteniéndose un producto con propiedades dentro de la normativa. Para lo anterior, es necesario determinar los efectos de este medio en la tasa de la reacción y en las propiedades del producto. Por lo tanto, el objetivo de esta etapa de la investigación fue investigar un proceso en medio anhidro catalizado por lipasas pata producir FAME con un bajo valor de acidez, analizando los efectos de este medio en el producto y en el rendimiento del proceso.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Materiales

Como materia prima se utilizó WFO de un restaurant de la zona y aceite de raps de una empresa de la Región de la Araucanía. Ambos aceites fueron filtrados y caracterizados previamente durante el desarrollo del capítulo III (Tabla 3.5). Como catalizador se utilizó Novozym 435 y para generar el medio anhidro se utilizaron tamices moleculares de tamaño de poro de 3 Å, ambos adquiridos en Sigma-Aldrich. Para analizar el efecto de los FFA en la tasa de reacción se utilizó ácido linoleico grado de pureza 99 %. Para la cuantificación de los resultados se utilizaron estándares internos de pureza para análisis cromatográfico: metil ester de ácido heptadecanoico, 1,2,3-butanotriol y 1,2,3-tricaprinoilglicerol. Todos los otros químicos utilizados fueron de grado analítico.

4.3.2 Biocatálisis en medio anhidro

Se realizó un estudio preliminar de biocatálisis en medio anhidro adicionado sílica gel a la reacción de producción de FAME para generar este medio. Se llevó a cabo una reacción con sílica gel y un control bajo las mismas condiciones de operación: 9 (% p/p) Novozym 435, razón metanol/WFO 3:1 (mol/mol), 45 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción. Cada reacción fue realizada en triplicado y se tomaron muestras a las 3, 6, 9 y 12 horas de reacción. El rendimiento de FAME fue analizado por GC-MS (Anexo A2.1). Los resultados fueron analizados a través de un análisis estadístico utilizando test de Duncan.

Se investigó la producción de FAME catalizada por lipasas en medio anhidro, adicionado tamices moleculares de tamaño de poro de 3 Å a cada reacción. Las condiciones de operación fueron establecidas de acuerdo a las condiciones previamente optimizadas en el capítulo IV. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en matraces de 20 mL a los cuales se les adicionó 1 mL de WFO (0,925 g) y 15 % de Novozym 435 (% p/p basado en el peso del aceite). Además, a cada matraz se le adicionó metanol en dos pasos, un tercio de la dosis total al inicio de la reacción y los otros dos tercios remanentes a las 8 horas de reacción para alcanzar una razón molar final de 4/1. Los matraces fueron incubados en un shaker a 35 °C y 200 rpm. Cada matraz fue una muestra destructiva a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas de reacción cada uno y fue realizado en triplicado. Finalmente, se llevaron a cabo controles para cada reacción sin la adición de tamices moleculares.

Para calcular la dosis de tamices moleculares se consideró como capacidad de absorción de agua de los tamices un 20 %. Además, se estimó el contenido de agua en la reacción. Este valor fue establecido considerando el contenido inicial de agua del aceite más el agua que teóricamente se debería producir durante la reacción por esterificación de FFA. El agua producida por esterificación de FFA durante la reacción fue estimada a través de balance de masa, considerando que 1 mol de FFA esterificado produce 1 mol de agua. Por lo tanto, considerando que el contenido de agua en el aceite fue de 1,3 % y el contenido de FFA en el mismo aceite fue 2,8 %, se consideró un contenido de agua total de 4,1 % (la suma de ambos) para estimar la dosis de tamices moleculares de acuerdo a la Ecuación 4.1.

$$Tamices = \frac{V\ aceite \bullet \rho\ aceite \bullet H_2O}{CAA} \approx \frac{1 \bullet 0{,}925 \bullet 4{,}1}{20} = 0{,}19\ g \qquad (4.1)$$

Donde:

V aceite : Volumen de aceite en la reacción (mL).

ρ aceite : Densidad del aceite (g/mL).

H_2O : Contenido de agua del aceite más el contenido de FFA del aceite (% v/v).

CAA : Capacidad de absorción de agua de los tamices (%).

Luego de cada experimento, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para detener la reacción. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue extraído y almacenado a 4 °C para su posterior análisis. El rendimiento de FAME, el valor de acidez, y el contenido de MG y DG fueron analizados de acuerdo a los procedimientos analíticos (Ver Anexos).

4.3.3 Efecto de los ácidos grasos libres en el rendimiento de la reacción

En análisis previos de caracterización del WFO utilizado en esta investigación (capítulo III), fue establecido que este aceite estaba compuesto mayormente por ácido linoleico (49,5 %). Por lo anterior, éste ácido graso fue seleccionado para analizar el efecto de los FFA en el rendimiento de la reacción de producción de FAME por biocatálisis.

Para llevar a cabo esta investigación se realizaron cinco experimentos con cuatro repeticiones cada uno. Para cada experimento se preparó un sustrato sintético en matraces de 20 mL, mezclando ácido linoleico sintético con aceite vegetal (aceite de raps) para completar una masa total por experimento de 927 mg equivalentes a 1 mL de aceite (Tabla 4.1). Las condiciones de reacción para todos los experimentos fueron: razón metanol aceite 3/1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 35 °C y 200 rpm durante 12 horas de tiempo de reacción. El metanol se adicionó en dos pasos de forma similar a los experimentos anteriores. Al término de la reacción las muestras fueron almacenadas a 4 °C para detener la reacción. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue analizado para cuantificar el rendimiento de FAME según la metodología analítica. Los resultados fueron comparados a través de análisis estadístico de varianza.

Tabla 4.1 Composición sustrato sintético.

Experimento [N°]	Ácido linoleico [mg]	Aceite vegetal [mg]
1	0	927
2	2	925
3	4	922
4	8	919
5	10	917

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Biocatálisis en medio anhidro utilizando silica gel

Se realizó un estudio preliminar para conocer el efecto de la adición de sílica gel en el rendimiento de la reacción. Los resultados son mostrados en la Figura 4.1, en donde se observa que la adición de la sílica tuvo un efecto negativo en el rendimiento de FAME, el cual fue significativo durante las primeras 12 horas de reacción. Estos resultados pudieron estar asociados a que la sílica gel, a pesar de tener la capacidad de adsorber agua, también puede adsorber moléculas de mayor tamaño, tales como el metanol (Wang *et al.*, 2006a). Esta característica de la sílica debió interferir negativamente en la reacción, generando un menor rendimiento por limitación del alcohol.

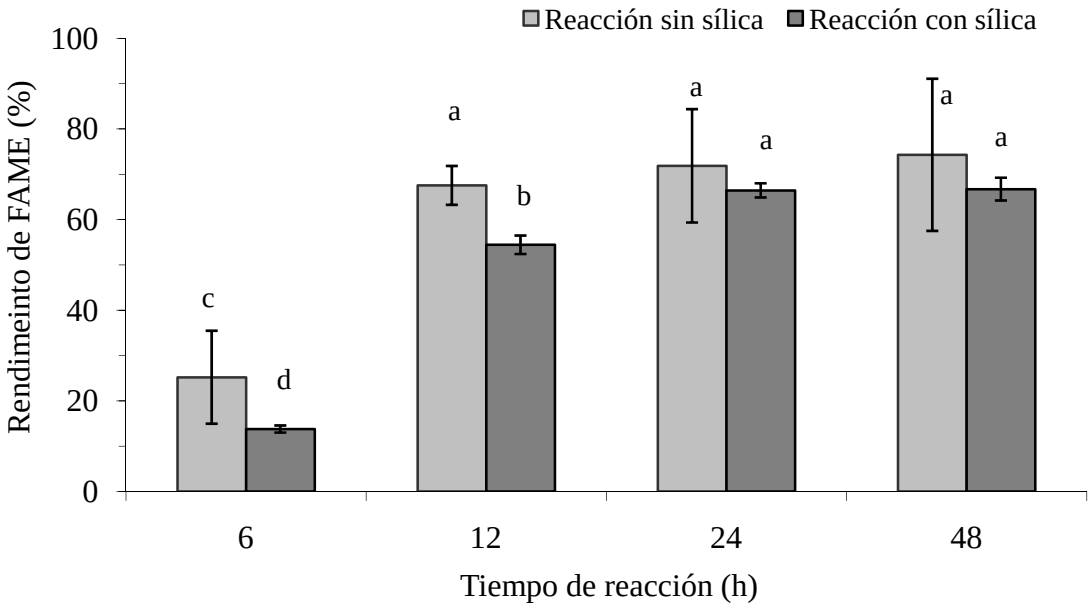

Figura 4.1 Efecto de la extracción de agua con sílica gel en el rendimiento de la reacción para una razón metanol/WFO 3:1 (mol/mol), 9 (% p/p) Novozym 435, 45 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción. Las letras a, b, c y d indican diferencias significativas para P< 0,05 utilizando test de Duncan.

B) Biocatálisis en medio anhidro utilizando tamices moleculares

En los experimentos mostrados a continuación se utilizaron tamices moleculares de tamaño de poro de 3 Å para producir el medio anhidro, los cuales son tamices específicos para adsorber agua que pueden ser regenerados y reutilizados. Los resultados del índice de acidez obtenidos durante la reacción en medio anhidro y en un medio control, son mostrados en la Figura 4.2. De acuerdo a esta figura, el índice de acidez fue mantenido en alrededor de 1 mg KOH/g aceite a través de toda la reacción en medio anhidro. Por el contrario, el índice de acidez del control fue mayor en toda la reacción, incrementándose sobre los 3 mg KOH/g aceite al final del periodo experimental. Los valores obtenidos usando el medio anhidro son cercanos a lo establecido por estándares europeos para FAME (> 0,5 mg KOH/g aceite). El bajo índice de acidez obtenido para el estudio en medio anhidro se debe a que a pesar de que los FFA del WFO fueron esterificados durante las dos primeras horas de reacción (Fig. 4.2), el agua producida pudo ser removida de la reacción por los tamices moleculares, evitando reacciones de hidrólisis y la consecutiva producción de FFA. Por lo tanto, la razón para la baja acidez en este medio podría ser la inhibición de la reacción de hidrólisis cuando el material adsorbente fue incluido en la reacción. Esto indica que la biocatálisis en un medio anhidro permitiría alcanzar una mayor calidad del producto comparado a una reacción típica usando Novozym 435 como catalizador.

El rendimiento de FAME también fue analizado en el medio anhidro (Figura 4.3). Los resultados obtenidos mostraron que el uso de este medio generó un incremento significativo en el rendimiento de la reacción, utilizando Novozym 435 como catalizador. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Li *et al.* (2007) en un estudio de biocatálisis utilizando FFA como materia prima, en donde la incorporación de tamices moleculares de 3 Å a la reacción de producción de FAME incrementó el rendimiento significativamente. A pesar de la similitud de los resultados reportados y los obtenidos en este estudio, la diferencia radica en que en la presente investigación se utilizó WFO que contenía sólo un 2,8 % de FFA y un 1,3 % de agua. Para descartar el efecto catalizador de los tamices se llevó a cabo un control adicionado tamices moleculares a la reacción pero sin el uso de catalizador. Los resultados mostraron que no hubo producción de FAME (datos no mostrados). Esto conlleva a suponer que el incremento en el rendimiento de la reacción podría estar asociado a un mejor funcionamiento de la enzima en este medio. Esta hipótesis concuerda con lo reportado por Tamalampudi *et al.*

(2008) quienes sugirieron que la actividad transesterificante de Novozym 435 puede ser inhibida por la presencia de agua adicionada a la reacción y que se necesitaría un medio cercano al anhidro para alcanzar una mayor eficiencia catalítica.

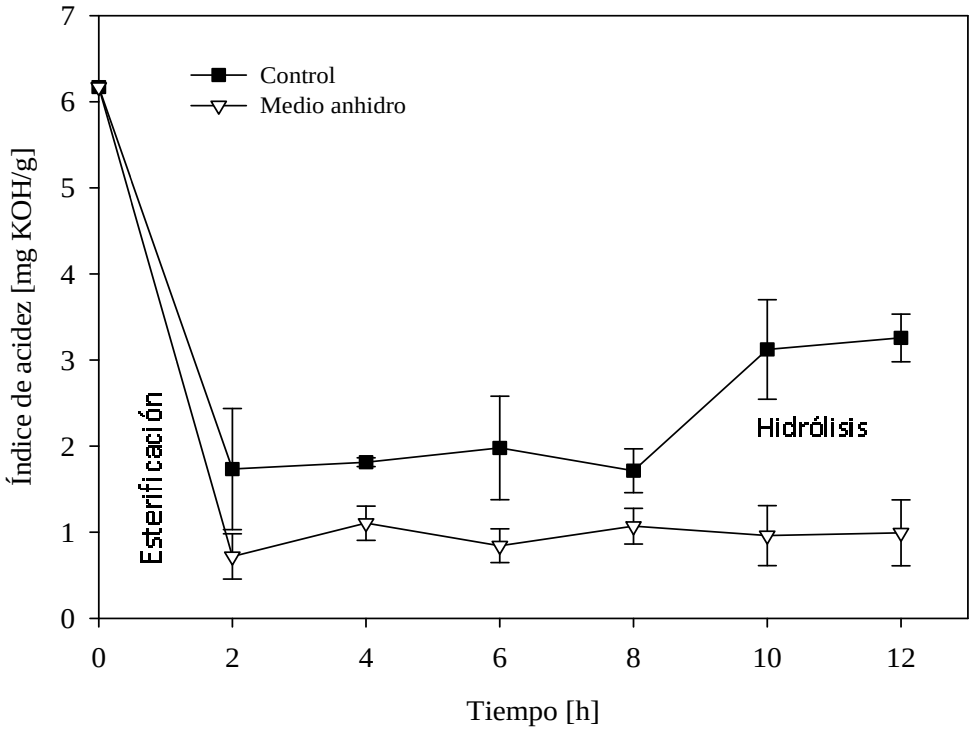

Figura 4.2 Índice de acidez durante la reacción en medio anhidro y en el control, para una razón metanol/WFO 4:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 35 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

La razón para la mayor actividad de la enzima en este medio puede ser explicada según lo reportado por Cabrera *et al.* (2009). Ellos sugirieron que la lipasa puede existir en dos formas estructurales diferentes; en una forma el sitio activo de la lipasa es aislado del medio, mientras en la otra forma el sitio activo es expuesto al medio. En un medio acuoso homogéneo la lipasa está en equilibrio entre estas dos estructuras. En el caso de Novozym 435, ésta se encuentra inmovilizada en resina de acrílico con propiedades hidrofílicas. Por lo tanto, el mayor rendimiento de la reacción podría ocurrir debido a que en el medio hidrofóbico investigado Novozym 435 debería tender a abrir su estructura, incrementando su actividad. Estos cambios

conformacionales permiten alterar las propiedades de las lipasas a través de la modificación de las propiedades del medio o el soporte. En este sentido, Samukawa *et al.* (2000) establecieron que la preincubación de la enzima en aceite antes de la reacción podía incrementar el rendimiento debido a que la enzima preincubada no adsorbería agua durante la reacción.

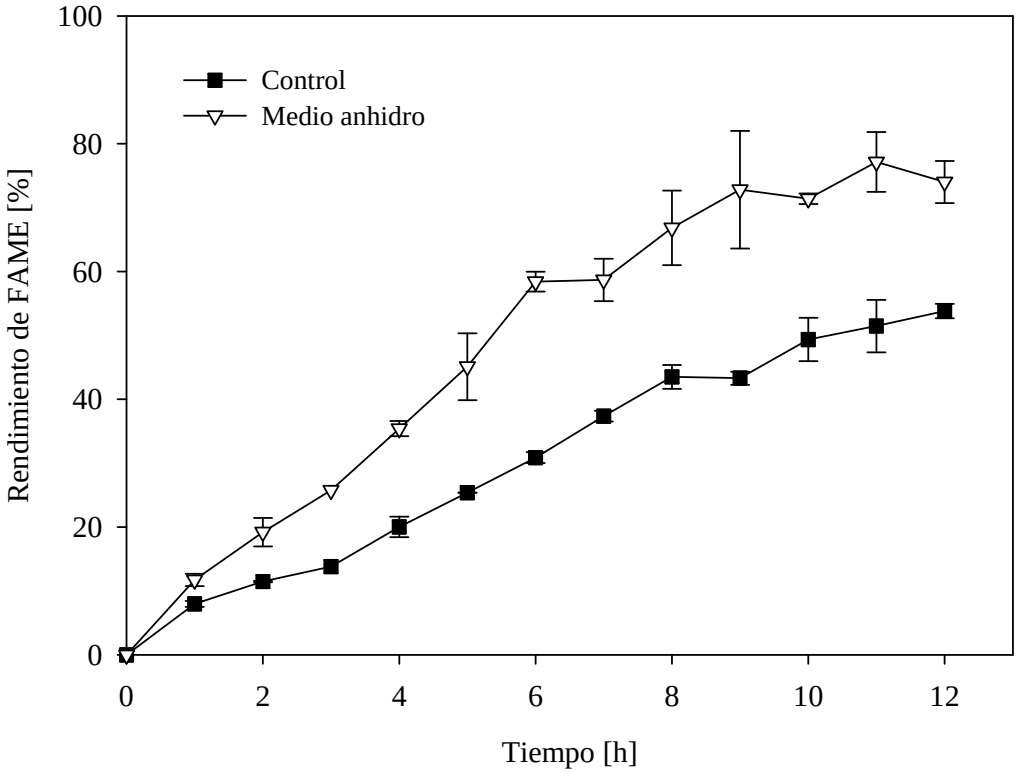

Figura 4.3 Rendimiento de FAME durante la reacción en medio anhidro y en el control, para una razón metanol/WFO 4:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 35 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

El contenido de MG y DG también fue cuantificado durante la misma reacción en el medio anhidro estudiado. MG y DG son productos intermediarios en la producción de FAME que tienen características higroscópicas, las cuales pueden causar daños al motor. Fukuda *et al.* (2008) explicó que a pesar de que se puede alcanzar un alto rendimiento de FAME utilizando lipasas regioespecíficas, el problema de estas lipasas es que pueden generar un producto con alto contenido de MG y DG. En este estudio, se esperaba que el contenido de MG y DG fuera

afectado por el diferente comportamiento de la enzima en el medio anhidro. Por lo tanto, el contenido de MG y DG fue medido a través de la reacción en el medio anhidro, con la finalidad de compararlo con un control (Figura 4.5).

La Figura 4.4A muestra que el contenido de MG durante la reacción fue bajo y bastante similar para el medio anhidro y el control, con 0,6 ± 0,4 (% m/m) y 0,7 ± 0,1 (% m/m) al final de la reacción, respectivamente. Estos valores están dentro de lo establecido por la normativa EN-14214 para el contenido de MG en el FAME (< 0,8 % m/m).

El contenido de DG fue rápidamente reducido durante las dos primeras horas de reacción tanto en el medio anhidro como en el control (Figura 4.4B). Este resultado puede ser explicado según lo reportado por Azócar *et al.* (2010b), quienes establecieron que los productos intermediarios son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática.

A medida que avanzó la reacción el contenido de DG se incrementó drásticamente en el control, manteniéndose entre un 3 y 4 (% m/m) desde las 6 horas hasta el final de la reacción (Figura 4.4B). Esto se debió probablemente a que Novozym 435 tiene una especificidad *sn*-3, la cual a pesar de que es baja comparada con otras lipasas, produce una considerable acumulación de DG durante la reacción (Figura 4.4B).

Cuando la reacción se llevó a cabo en el medio anhidro el contenido de DG alcanzó un valor máximo de 2 (% m/m). Sin embargo, este valor declinó a un 0,3 (% m/m) al final de la reacción, el cual es cercano a lo establecido por la normativa para FAME (≤ 0,2 % m/m). La razón para este menor contenido de DG podría estar relacionada con la adición de tamices moleculares a la reacción. En otros estudios ha sido establecido que el uso de materiales, tales como sílica gel, podría producir migración acilo, lo cual tendería a incrementar el rendimiento de FAME cuando se utilizan lipasas con regioespecificidad como catalizadores de la reacción (Du *et al.*, 2005). En este estudio, la adición de tamices moleculares a la reacción pudo reducir el contenido de DG debido a una probable generación de migración acilo. Por lo tanto, la adición de tamices moleculares a la reacción puede producir dos efectos positivos en la biocatálisis: un incremento en el rendimiento de FAME por el medio anhidro generado y, un incremento en las propiedades del FAME por la reducción de índice de acidez y del contenido de DG en el producto.

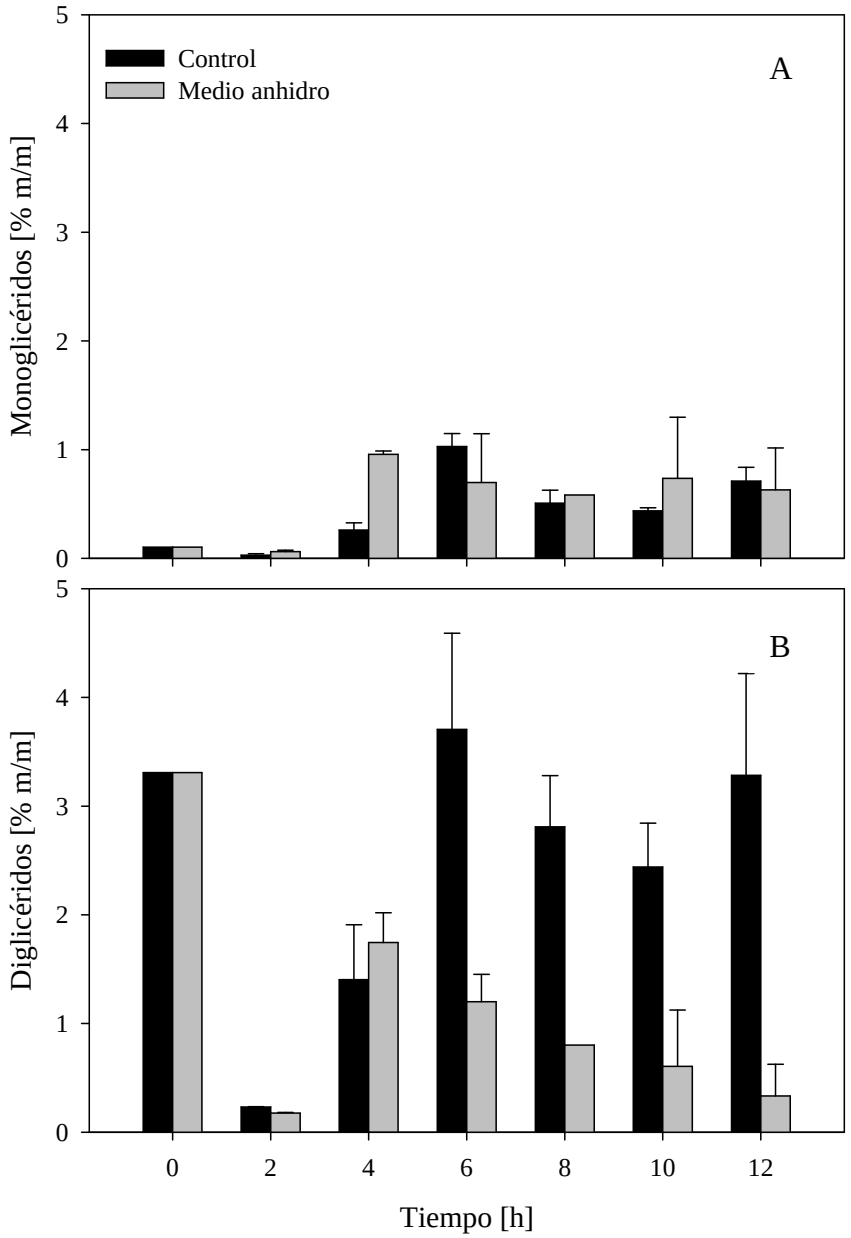

Figura 4.4 Contenido de MG y DG en el producto durante la reacción en medio anhidro y en el control, para una razón metanol/WFO 4:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 35 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

4.4.3 Efecto de los ácidos grasos libres en el rendimiento de la reacción

El comportamiento de las lipasas para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación puede ser afectado en un medio anhidro. Cuando se utilizó un medio anhidro el contenido de FFA disminuyó a lo largo de la reacción de producción de FAME, probablemente por inhibición de la esterificación de FFA y de la hidrólisis de TG. Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento para analizar el efecto de la presencia de FFA en el rendimiento de la reacción. Esto fue realizado adicionando pequeñas dosis de un FFA sintético a la reacción de producción de FAME usando aceite de raps como materia prima, el cual se caracteriza por un bajo contenido de FFA (Figura 4.5).

La Figura 4.5 muestra una reducción significativa en el rendimiento de FAME cuando se adicionaron pequeñas dosis de FFA a la reacción. En estos casos, la enzima esterificó los FFA adicionados para producir FAME y agua. Esta agua reaccionó con los TG para producir más FFA y glicerol. Por lo tanto, las enzimas tuvieron que llevar a cabo tres reacciones en paralelo: hidrólisis, esterificación y transesterificación, lo cual generó un proceso más lento y menos efectivo. Además, ha sido reportado que el exceso de agua reduce la metanólisis debido a que actúa como un inhibidor competitivo de la lipasa para catalizar la esterificación y la transesterificación (Du *et al.*, 2005; Tamalampudi *et al.*, 2008). Como resultado, el agua producida por esterificación podría afectar negativamente la transesterificación, disminuyendo la tasa de reacción. Por lo tanto, el mayor rendimiento para la producción de FAME por biocatálisis en medio anhidro, podría ser debido a que las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación son evitadas en este medio y el FAME puede ser producido principalmente a través de la transesterificación.

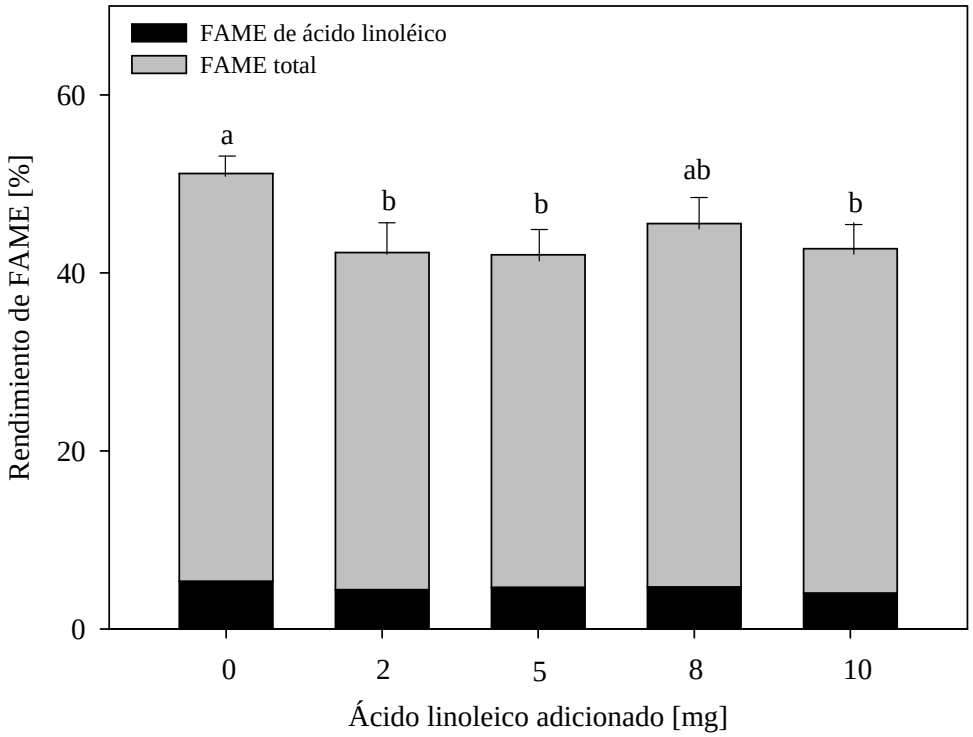

Figura 4.5 Efecto de la adición de ácidos grasos libres en el rendimiento de FAME. Condiciones de operación: razón metanol/WFO 3:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 35 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción. Las letras a y b muestras diferencias significativas para P< 0,05 utilizando análisis de varianza.

4.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO IV

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible establecer que el uso de un medio anhidro disminuyó el contenido de DG y el índice de acidez del FAME, alcanzando valores cercanos a la normativa. El bajo índice de acidez alcanzado pudo ser producido por la inhibición de la hidrólisis cuando se utilizaron tamices moleculares en la reacción, lo cual evitó la producción de FFA. La reducción en el contenido de DG se debió probablemente a que los tamices adicionados a la reacción produjeron migración acilo, solucionado el problema de regiospecificidad de la Novozym 435. El rendimiento de FAME también pudo ser incrementado con el medio anhidro propuesto, debido a que las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación pudieron ser evitadas en este medio para producir FAME

principalmente por transesterificación. Estos resultados indican que el uso de un medio anhidro permitiría implementar un proceso flexible en cuanto a materias primas para la producción de FAME a escala industrial, con propiedades acordes a los estándares establecidos para este biocombustible.

CAPÍTULO V. REUTILIZACIÓN DE NOVOZYM 435

Capítulo basado en artículo enviado a Bioscience and Bioengineering.
Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Muñoz R, Navia R (2010) Simplified enzymatic fatty acid methyl ester production by favoring the transesterification pathway.

5.1 RESUMEN

A pesar de los avances en el uso de enzimas para la producción de FAME, la pérdida de la actividad enzimática en el proceso productivo, ha impedido que ésta sea una alternativa factible de ser implementada a escala industrial. En este trabajo se investigaron tres tratamientos para recuperar las enzimas y reutilizarlas después de cada reacción para la producción de FAME en medio anhidro. Además, se investigó la adición de *tert*-butanol como co-solvente de la misma reacción. Los tratamientos consistieron en el lavado de las enzimas con un solvente hidrofílico (acetona), uno hidrofóbico (WFO) y uno medianamente polar (*tert*-butanol), para luego ser incubadas en aceite residual. La utilización del lavado hidrofóbico permitió obtener mejores resultados en comparación al lavado hidrofílico investigado. Sin embargo, ninguno de estos dos tratamientos permitiría implementar este proceso a mayor escala, debido a que la enzima no pudo ser recuperada durante más de tres reacciones sucesivas en el medio anhidro. Mejores resultados fueron alcanzados usando *tert*-butanol para el lavado de enzimas, el cual es un solvente de mediana polaridad. Las propiedades hidrofílicas de *tert*-butanol permitieron remover el glicerol y el metanol de las lipasas y sus propiedades hidrofóbicas permitieron mantener una alta actividad de las enzimas. Finalmente, fue posible llevar a cabo 17 ciclos sucesivos de producción de FAME usando *tert*-butanol como co-solvente de la reacción, mostrando que Novozym 435 puede ser reutilizada en un medio anhidro. Estos resultados también mostraron que la utilización de un medio anhidro usando *tert*-butanol como co-solvente permitiría la implementación de un proceso catalizado con lipasas a escala industrial.

5.2 INTRODUCCIÓN

La principal ventaja de utilizar enzimas inmovilizadas es que éstas puedan ser reutilizadas en procesos continuos o semi-continuos. Sin embargo, en la producción de FAME se han reportado serias dificultades para mantener la actividad catalítica de las lipasas utilizadas como biocatalizadores (Ognjanovic *et al.*, 2009). Esta rápida pérdida de actividad ha impedido que el proceso de producción de FAME catalizado con lipasas sea implementado a escala industrial (Lu *et al.*, 2010).

Existen diversas explicaciones para la pérdida de la actividad catalítica de las lipasas durante la producción de FAME. La principal razón es que los alcoholes de cadena corta usados como aceptor acilo en la reacción, metanol y etanol, pueden inhibir o incluso inactivar las lipasas (Ognjanovic *et al.*, 2009). Además, como se trata de una reacción de equilibrio, se suele utilizar alcohol en exceso para acelerar la reacción. Junto a lo anterior, Dossat *et al.* (1999) reportaron que se producía pérdida de actividad en lipasas inmovilizadas en soportes hidrofílicos expuestos a glicerol, tal como la lipasa Novozym 435. Ellos encontraron que las moléculas de glicerol eran adsorbidas en la superficie de estas matrices, formando un recubrimiento hidrofílico que impedía que las enzimas accedieran al sustrato hidrofóbico. Además, ha sido establecido que esta pared hidrofílica formada en el soporte de la enzima también atraería el metanol, lo cual disminuiría aun más la actividad de las lipasas (Chen y Wu, 2003; Soumanou y Bornscheuer, 2003). La baja solubilidad de metanol en aceite (1,5 moles de metanol en 1 mol de aceite) también puede afectar la actividad de las lipasas en la producción de FAME. Esto se debe a que el metanol, al ser insoluble en el medio de reacción, permanece en gotas que son atraídas por el glicerol adherido al soporte hidrofílico o por las enzimas en solución.

Diversas alternativas han sido propuestas para evitar la pérdida de actividad de las lipasas durante la reacción para la producción de FAME. La aplicación de metanol por pasos consiste en llevar a cabo adiciones sucesivas de metanol hasta completar la cantidad estequiométrica necesaria para completar la reacción (Azócar *et al.*, 2010b). La utilización de alcoholes de cadena larga en vez de metanol o etanol, ha permitido disminuir el efecto inhibitorio sobre las lipasas debido a que éstos son completamente solubles en el aceite en cantidades estequiométricas (Iso *et al.*, 2001; Kose *et al.*, 2002). El uso de solventes orgánicos como éter de petróleo, n-hexano, n-heptano incrementan la solubilidad del alcohol en el aceite, permitiendo alcanzar altos rendimientos de FAME (90 %) (Nie *et al.*, 2006). El uso de *tert*-butanol como un solvente menos hidrofóbico, ha permitido alcanzar mejores resultados evitando la pérdida de actividad enzimática en reacciones sucesivas (Li *et al.*, 2006).

Investigaciones para recuperar la actividad enzimática después de la reacción también han sido realizadas. Chen y Wu (2003) utilizaron sucesivos lavados con *tert* -butanol y un posterior tratamiento en aceite de soya por 12 horas, para Novozym 435 previamente tratada con exceso de alcohol para generar pérdida de actividad. Con este procedimiento pudo ser restaurando

hasta un 75 % de la actividad original. Soumanou y Bornscheuer (2003) utilizaron sucesivos lavados con acetona fría y una posterior etapa de secado para lipasa de *R. miehei* previamente utilizada como catalizador en la producción de FAME de aceite de maravilla y metanol. Los resultados permitieron mantener la actividad de la enzima durante 7 reusos.

En el capítulo IV fue demostrado que el uso de un medio anhidro permite producir FAME con propiedades cercanas a los estándares establecidos, incrementando además el rendimiento de la reacción y la actividad enzimática. Sin embargo, no existe claridad acerca de los efectos de este medio en la actividad catalítica, a través de reacciones sucesivas para la producción de FAME. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue proponer alternativas para producir FAME en medio anhidro a través de reacciones sucesivas, reutilizando Novozym 435 como catalizador.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Materiales

Como materia prima se utilizó WFO de un restaurant de la zona el cual fue filtrado y caracterizado previamente en el capítulo III (Tabla 3.5). Como catalizador se utilizó Novozym 435 donada por Novo Industries, Dinamarca y para generar el medio anhidro se utilizaron tamices moleculares de 3 Å adquiridos en Sigma-Aldrich. Para los tratamientos de reutilización de las enzimas se utilizó acetona, WFO y *tert*-butanol. Para la determinación del rendimiento de FAME se utilizó metil ester de ácido heptadecanoico con pureza para análisis cromatográfico. Todos los otros químicos utilizados fueron de grado analítico.

5.3.2 Reacción para la producción de FAME

Previo a cada tratamiento de reutilización, se llevó a cabo una reacción en triplicado para producir FAME de acuerdo a las condiciones optimizadas previamente en el capítulo III. Esta reacción fue llevada a cabo en matraces de vidrio con tapón de vidrio esmerilado para evitar pérdidas de metanol, los cuales fueron incubados en un shaker a las mismas condiciones de operación durante 12 horas de reacción (Tabla 5.1). El metanol fue adicionado en dos pasos, un tercio de la dosis total establecida en la Tabla 5.1 al inicio de la reacción y los otros dos tercios remanentes a las 8 horas de reacción, de acuerdo a los resultados obtenidos en el

capítulo III. Para cada reacción se utilizaron 8 mL de WFO (7,4 g) con un valor de acidez de 5,61 mg KOH/ g aceite. Para mantener el medio anhidro se adicionaron a la reacción 0,95 g de tamices moleculares de 3 Å, lo cual fue calculado de acuerdo a la Ecuación 4.1. Durante el transcurso de cada reacción se tomaron muestras de 70 µL de una mezcla homogénea a las 3, 6, 9 y 12 horas de reacción, las cuales fueron inmediatamente almacenadas a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue extraído para analizar el rendimiento de FAME de acuerdo a los procedimientos analíticos (Anexo A2.1).

Tabla 5.1 Condiciones de operación.

Variables de operación	valor
Novozym 435 [% p/p]	15
Razón metanol/aceite [mol/mol]	3,8/1
Temperatura [°C]	44,5
Agitación [rpm]	200

5.3.3 Recuperación de las enzimas

Luego de la reacción para la producción de FAME, se llevó a cabo el procedimiento para separar la enzima de los reactantes y productos para su posterior tratamiento y reutilización. Para esto se implementó un sistema de filtros que consistió en un tamiz bajo el cual se dispuso un papel filtro sobre un sistema de vacío (Fig. 5.1). El producto de la reacción fue vertido a través de este sistema, los tamices moleculares fueron separados por el tamiz y las enzimas fueron separadas por el filtro sobre el sistema de vacío. Bajo estos filtros se obtuvo el FAME permeado que fue posteriormente analizado por cromatografía para determinar su contenido de FAME. Finalmente, las enzimas retenidas en el papel filtro fueron traspasadas a un nuevo matraz para llevar a cabo el tratamiento de reutilización.

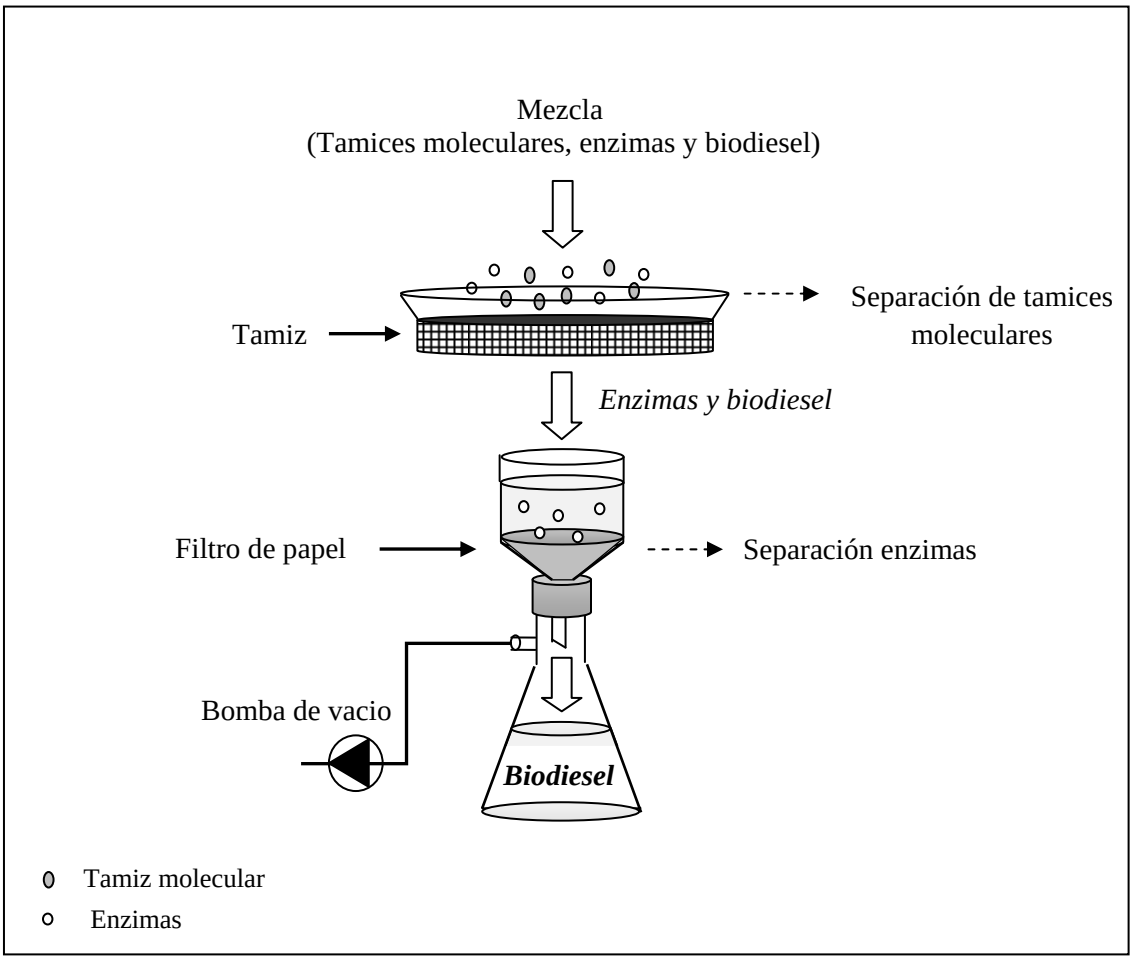

Figura 5.1 Esquema del sistema de filtración para la recuperación de las enzimas.

5.3.4 Tratamientos para la reutilización de las enzimas

Se investigaron 3 tratamientos para la reutilización de las enzimas, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a referencias (Chen y Wu, 2003; Samukawa *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2010) y a experimentos previos (datos no mostrados). Como control se llevó a cabo un experimento reutilizando las enzimas directamente, sin tratamientos entre cada reacción. Los tratamientos investigados fueron llevados a cabo en los mismos matraces que contenían las enzimas recuperadas por el sistema de filtros.

A) Tratamiento hidrofílico

Las enzimas fueron lavadas adicionado una pequeña dosis de acetona fría a los matraces. Posteriormente, éstos fueron agitados y el residuo líquido fue eliminado. Este procedimiento

fue repetido sucesivamente hasta la obtención de un líquido de aspecto claro. El volumen total de acetona que se utilizó en este proceso fue alrededor de 10 mL por gramo de enzimas.

B) Tratamiento hidrofóbico

Las enzimas fueron lavadas adicionando a cada matraz un volumen de WFO que permitiera mantenerlas sumergidas. Los matraces fueron agitados y el residuo líquido fue eliminado. Este procedimiento fue repetido tres veces.

C) Lavado con un solvente medianamente polar

El lavado fue llevado a cabo adicionando una determinada dosis de *tert*-butanol a los matraces. Luego, la mezcla fue agitada y el líquido residual fue eliminado. Esta secuencia fue repetida consecutivamente hasta alcanzar un líquido de aspecto claro. El volumen total utilizado en este proceso fue alrededor de 10 mL de *tert*-butanol por gramo de enzima.

Después de cada lavado se adicionó una dosis conocida de WFO a cada matraz con las enzimas lavadas. Posteriormente, los matraces fueron incubados toda la noche en este aceite a temperatura ambiente. Luego de 10 horas de incubación, se llevó a cabo una nueva reacción para la producción de FAME en el mismo medio de incubación (WFO) de acuerdo a la sección 5.3.2. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron a cada matraz tamices moleculares nuevos y metanol, de acuerdo a la metodología descrita previamente. El control fue realizado transfiriendo las enzimas directamente a otro matraz para llevar a cabo una nueva reacción. De esta manera, se realizaron ciclos sucesivos que consistieron en una reacción para la producción de FAME, la separación de la enzima a través del sistema de filtros y su recuperación a través de los lavados descritos. Estos ciclos se repitieron 4 veces, lo cual permitió alcanzar diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

5.3.5 Producción de FAME en medio anhidro usando *tert*-butanol como co-solvente

Se investigó la incorporación de *tert*-butanol como co-solvente en la reacción de producción de FAME en medio anhidro, como una alternativa para mantener la actividad enzimática durante reacciones sucesivas.

A) Dosis óptima de *tert*-butanol

La primera etapa de este experimento consistió en definir la dosis óptima de *tert*-butanol que se debía adicionar a la reacción. Para lo anterior, se llevaron a cabo cinco experimentos de producción de FAME, cada uno en triplicado, adicionando diferentes dosis de *tert*-butanol a la reacción de acuerdo a la Tabla 5.2. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en matraces, los cuales fueron incubados en un shaker a las mismas condiciones de operación establecidas para los experimentos de reutilización (Tabla 5.1). El metanol fue adicionado en dos pasos de forma similar a los experimentos anteriores y el contenido de tamices fue calculado de acuerdo a la Ecuación 4.1. Se utilizó 1,9 mL de WFO (1,76 g) para cada experimento.

Después de cada reacción, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue mantenido a 85 °C por 20 minutos en un baño para eliminar el *tert*-butanol residual de las muestras. Las muestras tratadas fueron analizadas de acuerdo a los procedimientos analíticos (Anexo A2.1) para determinar el rendimiento de FAME. La dosis óptima de *tert*-butanol fue determinada analizando los resultados a través de análisis de varianza ANOVA de dos vías.

Tabla 5.2 Dosis de *tert*-butanol investigadas.

Experimento [N°]	Dosis de *tert*-butanol [% v/v]*	Volumen de *tert*-butanol [µL]
1	0	0
2	0,5	95
3	0,75	143
4	1	190
5	1,25	238

* Basado en el volumen del aceite

B) Reacciones sucesivas para la producción de FAME en medio anhidro usando *tert*-butanol como co-solvente

Se investigó la reutilización de las enzimas en reacciones para la producción de FAME, utilizando la dosis de *tert*-butanol seleccionada y medio anhidro. Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando las mismas enzimas sin ningún tratamiento, durante 17 ciclos sucesivos de producción de FAME. Cada experimento fue realizado en matraces de 25 mL,

adicionando 5 mL de de WFO (4,6 g) durante 12 horas de reacción, utilizando las condiciones de operación la Tabla 5.1. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y durante cada ciclo se tomaron muestras de 70 µL a las 3, 6, 9 y 12 horas de reacción. Después de cada reacción, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue mantenido a 85 °C por 20 minutos en un baño para eliminar el *tert*-butanol residual de las muestras. Las muestras tratadas fueron analizadas de acuerdo a los procedimientos analíticos (Anexo A2.1) para conocer el rendimiento de FAME.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Reutilización de Novozym 435 para la producción de FAME en medio anhidro

Se investigó la estabilidad de la enzima Novozym 435 en medio anhidro, llevando a cabo reacciones sucesivas para la producción de FAME reutilizando las lipasas. Esta reutilización se realizó incorporado directamente las lipasas a una nueva reacción, sin tratamientos para la recuperación de su actividad enzimática entre reacciones. De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 5.2), el rendimiento de FAME decreció considerablemente en el segundo ciclo. Esta tendencia se mantuvo en los ciclos sucesivos, llegándose a valores cercanos al 0 % de rendimiento de FAME en el cuarto ciclo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Ognjanovic *et al.* (2009), quienes obtuvieron un 0 % de rendimiento de FAME en un cuarto ciclo, reutilizando Novozym 435 en un medio orgánico y usando metanol como aceptor acilo. Por lo tanto, aunque en el capítulo IV fue establecido que la actividad de la enzima es incrementada en una primera reacción usando un medio anhidro en comparación a un medio orgánico, la pérdida de la actividad enzimática parece ser similar para ambos tipos de medio cuando la lipasa es reutilizada.

Ha sido reportado que las lipasas tienen alta actividad de síntesis y alta estabilidad en solventes hidrofóbicos, pero el alcohol y el glicerol son inmiscibles en estos solventes (Halim y Kamaruddin, 2008). Esto puede generar una baja solubilización de las moléculas polares en el medio, favoreciendo la adsorción de estas moléculas en el soporte hidrofílico de la enzima para generar inhibición de las enzimas y una baja tasa de transesterificación (Halim y Kamaruddin, 2008). El recubrimiento del soporte por las moléculas polares es acumulativo en

el tiempo lo que genera la pérdida de actividad al utilizarlas en reacciones sucesivas. Por lo tanto, para alcanzar un proceso que pueda ser competitivo a escala industrial, es necesario buscar alternativas de bajo costo que permitan mantener la actividad las enzimas.

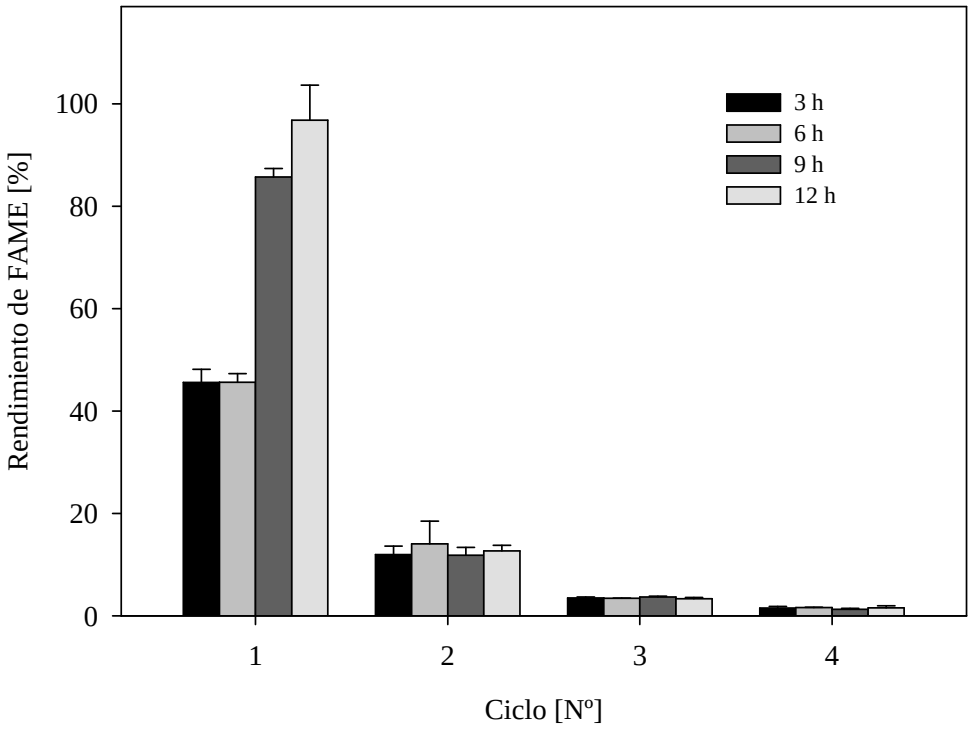

Figura 5.2 Reutilización de Novozym 435 en ciclos sucesivos de producción de FAME para una razón de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción (sistema sin tratamiento).

5.4.2 Tratamientos para la reutilización de Novozym 435 en medio anhidro

Se investigaron tres tratamientos para recuperar las enzimas y reutilizarlas después de cada reacción para la producción de FAME en medio anhidro. Los tratamientos consistieron en el lavado de las enzimas con un solvente hidrofílico (acetona), uno hidrofóbico (aceite residual de fritura) y uno medianamente polar (*tert*-butanol), para luego ser incubadas toda la noche en aceite de residual.

La Figura 5.3 muestra los resultados obtenidos para los dos primeros tratamientos. Los resultados obtenidos en el tratamiento con solvente hidrofílico en la Figura 5.3 A, muestran que fue posible mantener un alto rendimiento de FAME en el segundo ciclo (> 90 %), el cual

fue superior al sistema sin tratamiento (< 20 %) (Figura 5.2). Este resultado se debe a que el solvente hidrofílico utilizado puede remover el glicerol y el metanol adsorbidos en el soporte también hidrofílico de la enzima. Sin embargo, a pesar de los altos rendimientos alcanzados en el segundo ciclo, en el tercer ciclo el rendimiento de FAME disminuyó drásticamente (Figura 5.3 A). La acetona es un solvente hidrofílico con un bajo coeficiente de partición en un sistema estándar de dos fases octanol-agua (log P), con un valor de -0,24. De acuerdo a Yu *et al*. (2010) el agua tiene mayor afinidad con éstos solventes altamente hidrofílicos que con las enzimas. Por lo tanto, la actividad de Novozym 435 podría ser reducida cuando se utilizó el lavado con acetona, debido a que dejaría de tener una conformación flexible por la pérdida del agua ligada a su estructura (Yu *et al.*, 2010).

En el tratamiento hidrofóbico investigado la actividad de Novozym 435 fue mayor en el tercer ciclo en comparación al tratamiento hidrofílico (Figura 5.3). Samukawa *et al.* (2000) reportó que con la incubación de Novozym 435 en metil oleato y posteriormente en aceite de soya se incrementaba la tasa de producción de FAME debido a la impregnación de estos componentes en el soporte de la enzima. En este estudio, fue asumido que la enzima pudo haber tenido residuos de metil ester cuando fue incubada en WFO, lo que significaría que el tratamiento realizado se asemeja a lo llevado a cabo por Samukawa *et al.* (2000). La principal ventaja de este tratamiento es que el mismo WFO usado para la incubación fue posteriormente usado para la reacción de producción de FAME, lo cual disminuiría la necesidad de equipamiento para llevar a cabo este proceso.

A pesar de las ventajas de usar WFO como tratamiento para recuperar la enzima, el rendimiento de FAME declinó considerablemente en el cuarto ciclo de reacción (Figura 5.3 B). En un estudio de reutilización de enzimas, Chen y Wu (2003) encontraron que el rendimiento de FAME fue 5 veces mayor cuando la enzima fue incubada en aceite de soya previo a la reacción. Sin embargo, cuando usaron el mismo medio como tratamiento para recuperar la actividad de la enzima, la actividad comenzó a decaer luego de la cuarta reutilización. La razón podría ser la baja solubilidad del alcohol y el glicerol en el aceite, debido a que se trata de un lavado hidrofóbico, lo cual impediría un lavado eficiente de la enzima. Por lo tanto, a pesar de las ventajas del tratamiento hidrofóbico en comparación al hidrofílico, ninguno de los dos permitiría implementar este proceso a mayor escala, debido a

que la enzima no fue recuperada en más de tres reacciones sucesivas en un medio anhidro con estos tratamientos.

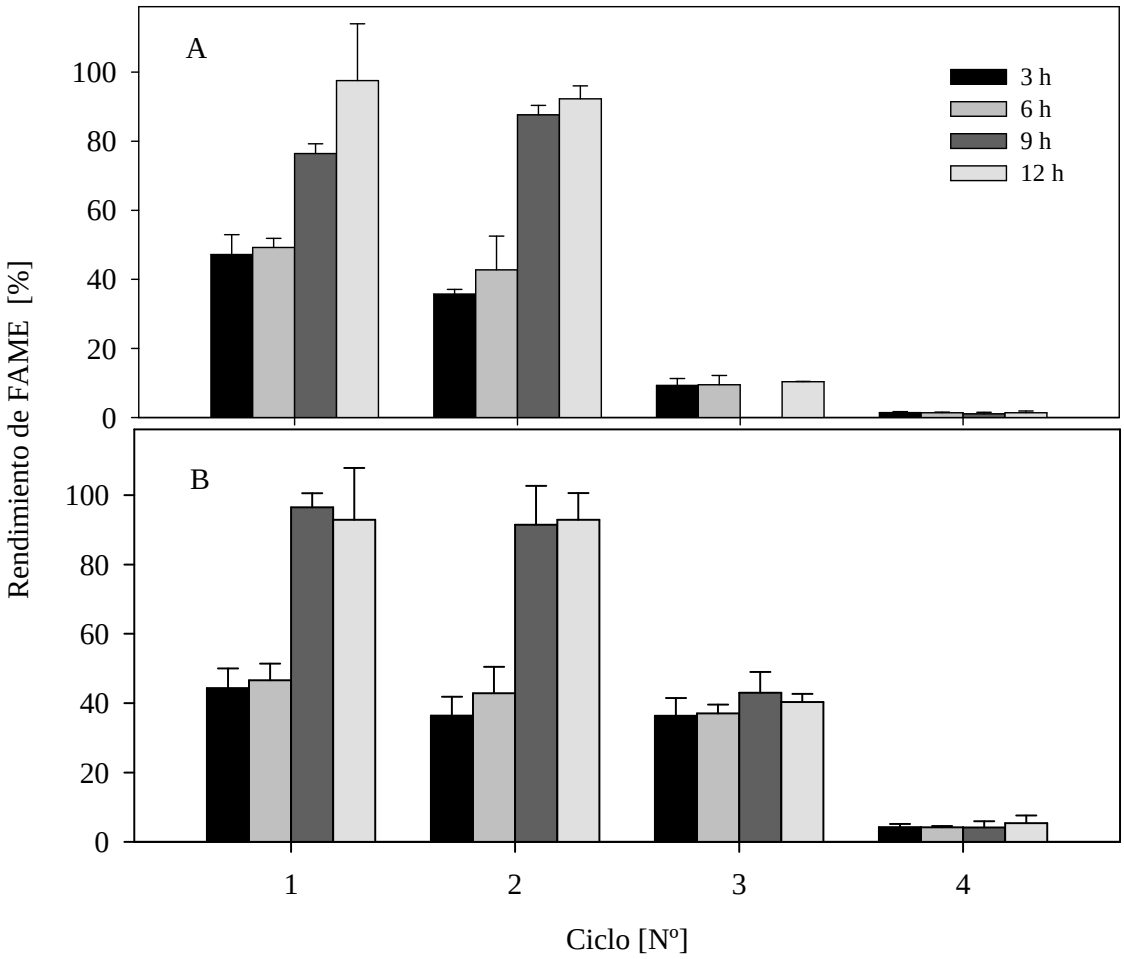

Figura 5.3 Comparación de tratamientos para la reutilización de Novozym 435 en ciclos sucesivos de producción de FAME para una razón de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción. A) Tratamiento hidrofílico (lavado con acetona), B) Tratamiento hidrofóbico (lavado con WFO).

Debido a que ni el solvente hidrofílico ni el hidrofóbico permitieron recuperar la enzima, se investigó el uso de *tert*-butanol como un solvente moderadamente polar (Figura 5.4). *tert*-Butanol es un alcohol terciario con un coeficiente octanol-agua de 0,35. Este alcohol ha sido previamente investigado demostrando que puede incrementar considerablemente la actividad

de la enzima en comparación a un alcohol lineal. Esto es atribuido a la diferencia de miscibilidad con triglicéridos, debido a que un alcohol no lineal tiene mejor miscibilidad con triglicéridos en comparación a uno lineal con el mismo número de átomos de carbono (Yu *et al.*, 2010).

Por lo tanto, se llevó a cabo el lavado de las enzimas con *tert*-butanol, seguido de su incubación en WFO. Los resultados mostraron que este pretratamiento permitió alcanzar los mejores resultados, manteniendo una alta actividad de la enzima en sucesivas reacciones (Figura 5.4). Estos resultados se deben a que *tert*-butanol, al ser un solvente medianamente polar, puede mejorar la miscibilidad entre el alcohol y el aceite, disminuyendo la inhibición enzimática. Además, *tert*-butanol tendría las ventajas de un solvente hidrofílico y de uno hidrofóbico, sin generar los inconvenientes de ambos. Esto significa que las propiedades hidrofílicas de *tert*-butanol permiten remover el glicerol y el metanol de las lipasas, mientras, las propiedades hidrofóbicas ayudarían a mantener una alta actividad enzimática. Las ventajas del uso de *tert*-butanol también han sido reportadas por Chen y Wu (2003), quienes reportaron que este solvente incluso puede ser usado para regenerar la enzima Novozym 435 luego de su pérdida total de actividad. Además, *tert*-butanol es un solvente estable y menos reactivo que otros isómeros de butanol. Por lo tanto, *tert*-butanol es una alternativa prometedora para la recuperación de Novozym 435 después de una reacción en medio anhidro. Basado en estos resultados, se llevó a cabo un nuevo experimento en el cual se incluyó *tert*-butanol como co-solvente en la reacción en medio anhidro para la producción de FAME.

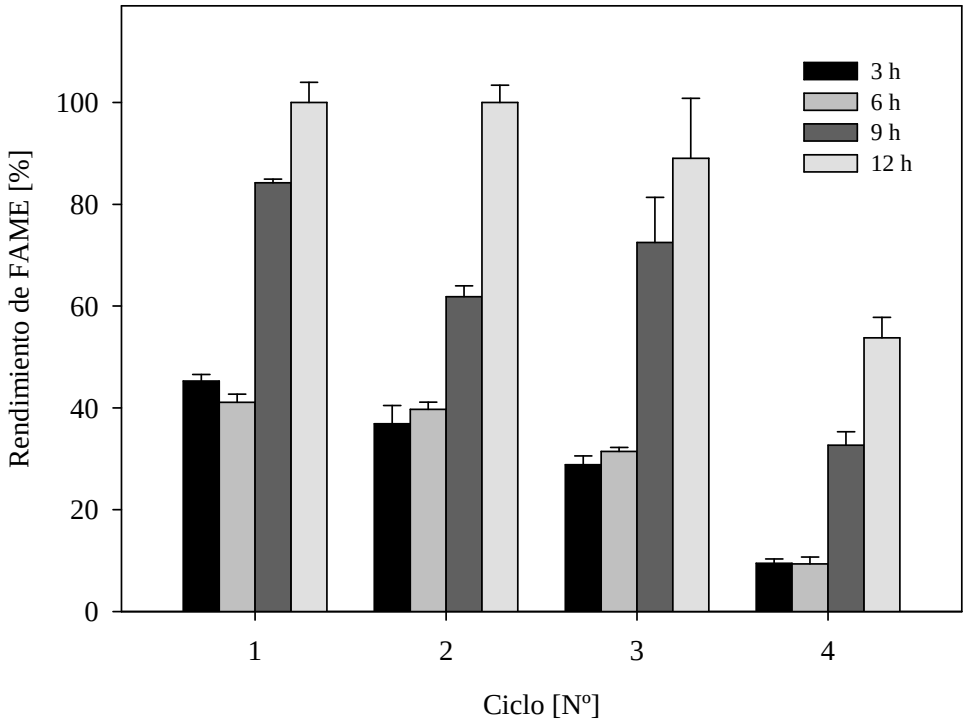

Figura 5.4 Reutilización de Novozym 435 en ciclos sucesivos de producción de FAME utilizando *tert*-butanol para el lavado de la enzimas entre ciclos. Condiciones de operación: de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

5.4.3 Reacciones sucesivas para la producción de FAME en medio anhidro usando *tert*-butanol como co-solvente

En previas investigaciones ha sido establecido que *tert*-butanol es inerte en la reacción de producción de FAME, y que además es un potencial co-solvente que podría mantener la actividad enzimática durante esta reacción (Li *et al.*, 2006). De acuerdo a esto, se investigó la utilización de *tert*-butanol como co-solvente en un medio anhidro, con la finalidad de determinar su capacidad para mantener la actividad de Novozym 435 en reacciones sucesivas.

Se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar la dosis de *tert*-butanol óptima para ser adicionada a la reacción. Los resultados mostraron que la mayor tasa de rendimiento de FAME fue alcanzada cuando se adicionó 0,75 y 1 (% v/v) de co-solvente a la reacción (Figura 5.5). Estos resultados concuerdan con los reportados por Li *et al.* (2006) quienes reportaron

que dosis menores a 0,75 (% v/v) no son suficientes para producir un incremento de la solubilidad entre el aceite y el metanol, por lo que se mantiene el efecto inhibitorio del metanol en la actividad de la lipasa. Por otro lado, un incremento de la dosis de *tert*-butanol sobre 1 (% v/v), podría disminuir la transferencia de masa afectando negativamente el rendimiento de FAME por dilución de los reactantes. Finalmente, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre la dosis 0,75 y 1 (% v/v), en los experimentos posteriores se adicionó una dosis de 0,75 (% v/v) de *tert*-butanol a la reacción en medio anhidro, para evitar el gasto innecesario de co-solvente.

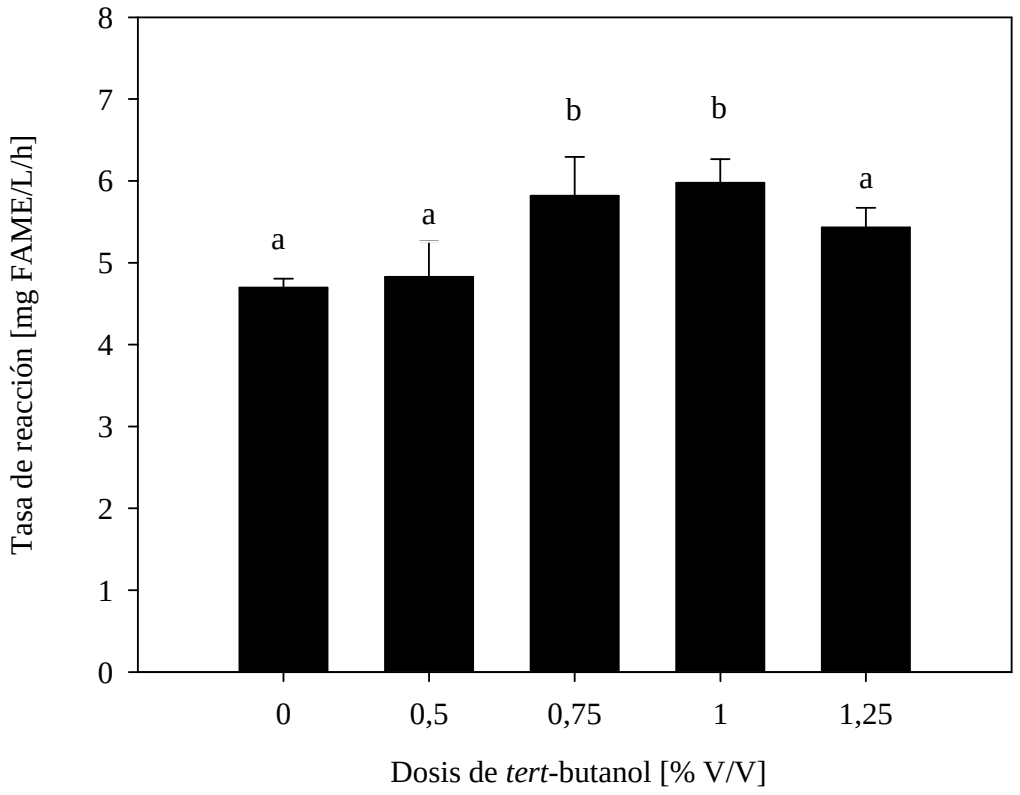

Figura 5.5 Tasa de la reacción de metanólisis en un medio anhidro para diferentes dosis de *tert*-butanol como co-solvente. Condiciones de operación: razón de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción. Las letras a y b indican diferencias significativas para $P < 0,05$ utilizando análisis de varianza.

Se investigó la producción de FAME reutilizando las enzimas en reacciones sucesivas, utilizando un medio anhidro y adicionando la dosis de *tert*-butanol previamente seleccionada a cada reacción (Figura 5.6). También se realizó un experimento sin la adición de *tert*-butanol como co-solvente (control), en el cual el rendimiento de FAME disminuyó drásticamente a partir del segundo ciclo de reacción (< 20 %). Mejores resultados fueron obtenidos en las reacciones con el co-solvente, donde el rendimiento de FAME se mantuvo sobre un 50 % después de 17 ciclos (Figura 5.6). Royon *et al.* (2007) establecieron que la enzima es inhibida a lo largo de toda la reacción de producción de FAME. Al inicio de la reacción, esta inhibición se debe a la presencia de metanol, el cual es inmiscible en el aceite. Posteriormente, cuando la concentración de metanol disminuye, la inhibición es producida por el glicerol que cubre el soporte del catalizador, atrayendo el metanol remanente al soporte. Por lo tanto, la adición de *tert*-butanol pudo tener efectos positivos a lo largo de toda la reacción. Primero, el uso de *tert*-butanol pudo incrementar la miscibilidad entre el metanol y el aceite, previniendo el contacto directo de la enzima con el alcohol e incrementando el rendimiento de la reacción. Segundo, debido a las propiedades hidrofílicas del *tert*-butanol, éste disolvió el metanol y el glicerol, previniendo la inhibición de la enzima a lo largo de toda la reacción. Tercero, debido a las propiedades hidrofóbicas del *tert*-butanol, fue posible mantener una alta actividad de las lipasas a través de las reacciones sucesivas.

Por otro lado, según Yu *et al.* (2010) cuando se selecciona un co-solvente para mantener la actividad de las enzimas en la producción de FAME, es necesario considerar diferentes propiedades del solvente, tales como, viscosidad, constante dieléctrica, parámetros de solubilidad y coeficiente octanol-agua. Otro aspecto que debería ser considerado es la factibilidad de recuperar el co-solvente por destilación, lo cual se relaciona con el punto de ebullición. En este sentido, el *tert*-butanol tiene ventajas en comparación a otros solventes reportados, tal como el alcohol amílico, el cual tiene propiedades muy similares al *tert*-butanol pero un alto punto de ebullición (102 °C), muy cercano al del agua. El punto de ebullición del *tert*-butanol es 82 °C, debido a que la destilación del metanol ocurre a 65 °C, la recuperación del *tert*-butanol no debería incrementar excesivamente la energía utilizada en este proceso.

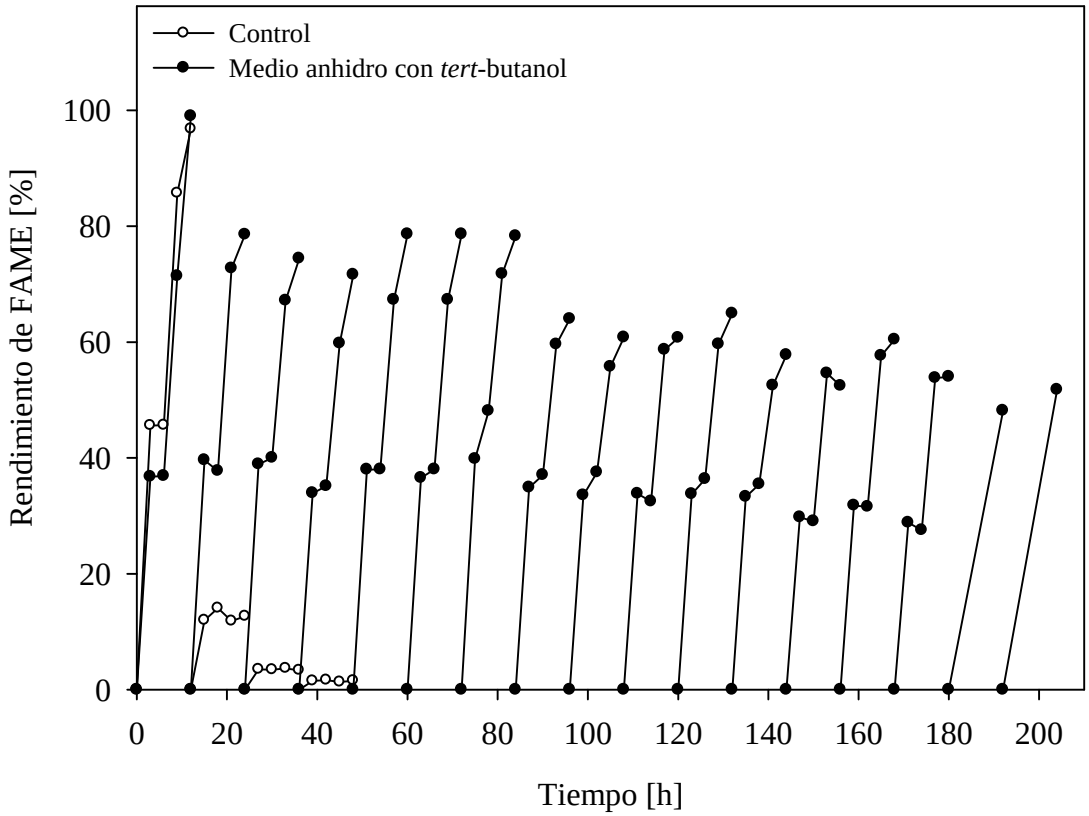

Figura 5.6 Rendimiento de FAME durante 17 ciclos sucesivos de producción con una razón de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 0,75 (% v/v) de *tert*-butanol, 0,9 g de tamices moleculares, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

Pese a los altos rendimientos alcanzados durante alrededor de 200 horas de operación, el rendimiento disminuyó paulatinamente hasta llegar a un 60 % del rendimiento inicial (Figura 5.6). Esta disminución en el rendimiento podría estar asociada a la pérdida de actividad de las lipasas reutilizadas. Sin embargo, también podría estar asociada a la disminución de la masa de lipasas utilizadas en las reacciones sucesivas, producto de los sucesivos ciclos realizados que generaron pérdida de enzimas al transferirlas de un batch a otro (Figura 5.7). Por lo anterior, es necesario realizar este proceso en forma continua o semi-continua en un reactor con las condiciones apropiadas para eliminar pérdidas de lipasa durante el proceso.

Finalmente, es posible establecer que el uso de *tert*-butanol como un co-solvente permitiría implementar un sistema en medio anhidro a escala industrial, para la producción de FAME utilizando WFO como materia prima y Novozym 435 como catalizador.

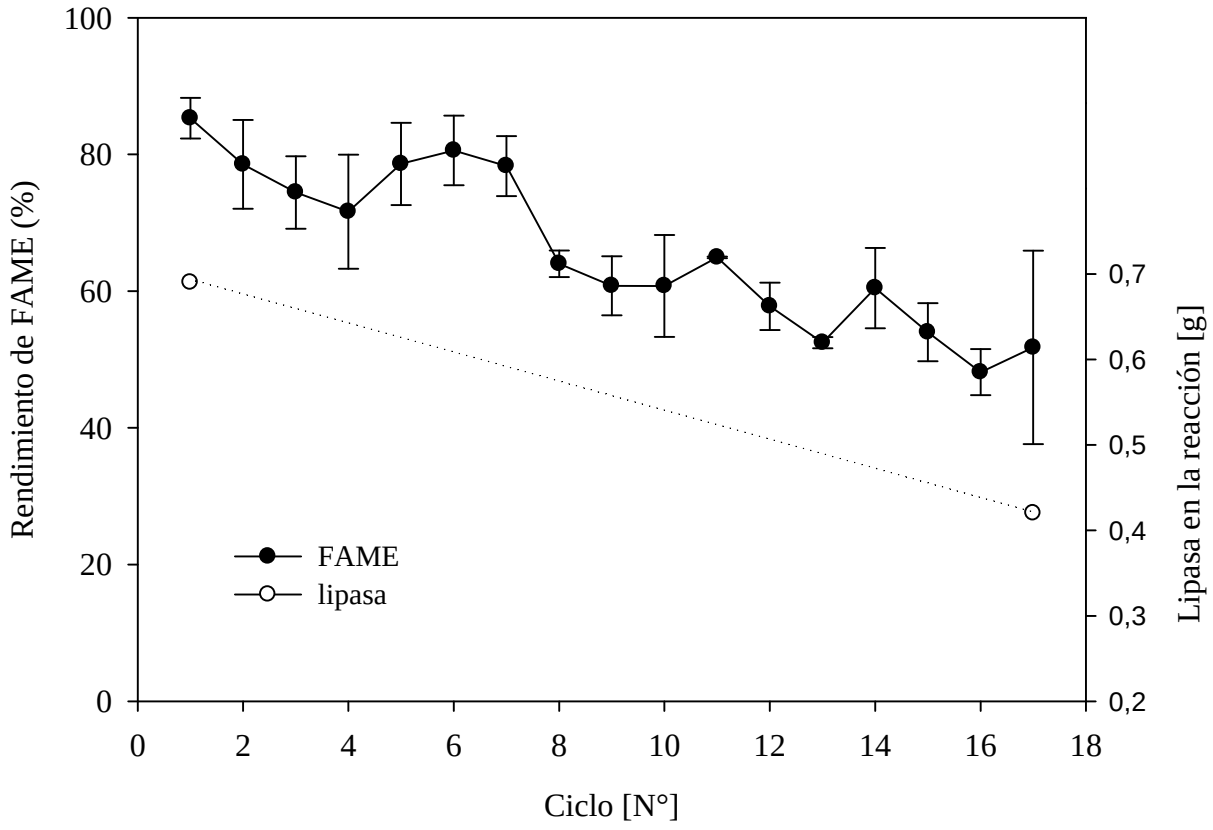

Figura 5.7 Producción de FAME y masa de lipasas al inicio y al término de los ciclos sucesivos de producción con una razón de metanol/WFO 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 0,75 (% v/v) de *tert*-butanol, 0,9 g de tamices moleculares, 200 rpm y 12 horas de tiempo de reacción.

5.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO V

La utilización de un lavado hidrofóbico de Novozym 435 con aceite residual de fritura (WFO) permitió obtener mejores resultados en comparación al lavado hidrofílico utilizando acetona. Sin embargo, ninguno de estos dos tratamientos permitiría implementar este proceso a mayor

escala, debido a que la enzima no pudo ser recuperada durante más de tres reacciones sucesivas en el medio anhidro. Mejores resultados fueron alcanzados usando *tert*-butanol para el lavado de enzimas, el cual es un solvente de mediana polaridad. Las propiedades hidrofílicas de *tert*-butanol permitieron remover el glicerol y el metanol de las lipasas y sus propiedades hidrofóbicas permitieron mantener una alta actividad de las enzimas. Finalmente, fue posible llevar a cabo 17 ciclos sucesivos de producción de FAME usando *tert*-butanol como co-solvente de la reacción, mostrando que Novozym 435 puede ser reutilizada en un medio anhidro. Estos resultados también mostraron que la utilización de un medio anhidro usando *tert*-butanol como co-solvente permitiría la implementación de un proceso catalizado con lipasas a escala industrial.

CAPÍTULO VI. CINÉTICA Y PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Capítulo basado en artículo en preparación.

Azócar L, Beroiz L, Ciudad G, Navia R (2010) Enzymatic transesterification reaction kinetic in a *tert*-butanol system for biodiesel production.

6.1 RESUMEN

Se investigó la cinética de la transesterificación enzimática para la producción FAME utilizando WFO como materia prima. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un sistema con *tert*-butanol como co-solvente y medio anhidro, utilizando Novozym 435 como catalizador y metanol como aceptor acilo. La utilización del medio anhidro usando tamices moleculares de 3 Å para remover el agua permitió estudiar principalmente la transesterificación, evitando reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación. Se analizaron en forma experimental los efectos por separado de la variación en la concentración de WFO y de metanol en la velocidad de la reacción. A una concentración de WFO constante se encontró que hasta 1200 mol L^{-1} de metanol se incrementaba la tasa de producción de FAME, disminuyendo paulatinamente para concentraciones superiores. A una concentración de metanol constante no se encontraron efectos inhibitorios del sustrato. La reacción fue descrita por un modelo Ping-Pong con inhibición competitiva por metanol. Los resultados experimentales fueron usados para determinar los parámetros cinéticos del modelo: $V_{máx}$= 0,018 mol/L/min, $K_{M,\ metanol}$ = 1030 mol/L, $K_{W,WFO}$= 397 mol/L y $K_{IM,\ metanol}$= 1815 mol/L. El modelo fue aplicado en un reactor semi-continuo para la producción de FAME en ciclos de 4 horas de reacción, durante los cuales se utilizaron las mismas enzimas del ciclo inicial. Bajo estas condiciones fue posible mantener rendimientos de FAME sobre un 80 % durante 7 ciclos de reacción. Los cortos tiempos de reacción de este proceso y la reutilización de las enzimas, permitieron conseguir una alternativa factible de ser utilizada a escala industrial, generándose un proceso potencialmente competitivo con el proceso convencional con catalizador químico.

6.2 INTRODUCCIÓN

La búsqueda de condiciones óptimas para la producción de FAME catalizada con lipasas ha sido ampliamente reportada (Azócar *et al.*, 2010a; Fukuda *et al.*, 2001). Sin embargo, para el uso de lipasas a escala industrial, la información relacionada con la cinética de formación de productos y los efectos de los cambios en las condiciones del sistema, son esenciales para el diseño de reactores (Krishna y Karanth, 2001).

Estudios cinéticos utilizando diferentes lipasas para la producción de FAME han sido recientemente reportados. En un comienzo lo reportes sólo se referían al estudio cinético de la esterificación de FFA. En un estudio Krishna y Karanth (2001) establecieron el uso de un modelo basado en el mecanismo de Ping Pong Bi Bi por inhibición competitiva por alcohol y FFA para describir la cinética de la reacción. En una investigación posterior de la esterificación de ácido butírico con metanol, Al-Zuhair *et al.* (2006) utilizaron el modelo simplificado para inhibición competitiva por alcohol denominado modelo de Ping Pong. El estudio cinético de la transesterificación enzimática de TG sólo fue propuesto por Al-Zuhair *et al.* (2007).

La principal falencia de la mayoría de los estudios cinéticos reportados hasta la fecha es que los resultados obtenidos en estas investigaciones tienen limitaciones para ser empleados a escala industrial. Ha sido reportado que las lipasas alcanzan una mayor actividad y pueden ser reutilizadas en sistemas usando co-solventes medianamente polares tales como el *tert*-butanol (Li *et al.*, 2006; Royon *et al.*, 2007). Sin embargo, las condiciones operacionales usadas en la mayoría de las investigaciones de cinética incluyen la utilización de solventes no polares tales como *n*-hexano (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Al-Zuhair *et al.*, 2009; Dossat *et al.*, 2002) y *n*-hexadecano (Pessoa *et al.*, 2010), o solventes polares como agua (Cheirsilp *et al.*, 2008), con los cuales no es posible alcanzar una alta actividad de la lipasas (Yu *et al.*, 2010). Por otro lado, a pesar de que se ha establecido la necesidad de utilizar materias primas alternativas tales como los WFO, sólo Al-Zuhair *et al.* (2009) han investigado la cinética de la transesterificación utilizando WFO sintético.

En la mayoría de los reportes de cinética existentes hasta la fecha se ha asumido que la transesterificación es llevada a cabo por las lipasas a través de dos reacciones consecutivas de hidrólisis y esterificación. En estas reacciones sucesivas primero los TG son hidrolizados para producir FFA y luego, los FFA son esterificados para producir ésteres. Por otro lado, algunos autores han asumido que la reacción puede ocurrir a través de una transesterificación directa de TG (Al-Zuhair *et al.*, 2007). Cheirsilp *et al.* (2008), investigaron los mecanismos de la transesterificación considerando la hidrólisis y esterificación de TG, DG, MG, FFA y etanol, a través de una simulación computacional. En este estudio, los autores encontraron que la hidrólisis y la etanólisis ocurren simultáneamente a una tasa mayor que la reacción de esterificación.

En los capítulos previos ha sido establecido que las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación pueden ser inhibidas por la utilización de un medio anhidro en reacciones catalizadas por la lipasa Novozym 435. Lo anterior, permitiría producir FAME principalmente a través de la transesterificación de TG. Por lo tanto, la utilización de este medio en un estudio cinético permitiría simplificar los mecanismos de reacción e investigar efectivamente la cinética de la transesterificación de TG catalizada por lipasas.

El objetivo de este estudio fue investigar la cinética de la transesterificación para la producción de FAME catalizada por Novozym 435 en un medio anhidro, utilizando WFO como materia prima, metanol como aceptor acilo y *tert*-butanol como co-solvente. Además, con los resultados obtenidos se llevó a cabo la puesta en marcha de un reactor semi-continuo para la producción de FAME.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Materiales

Como materia prima se utilizó WFO de un restaurant de la zona, el cual fue filtrado antes de su caracterización y de su uso en los experimentos. Para caracterizar el WFO se analizaron algunas de sus propiedades de acuerdo a la metodología analítica (Anexo), estas propiedades fueron: valor de acidez, contenido de FFA, índice de yodo, índice de peróxido, viscosidad y densidad (Tabla 6.1). Como catalizador se utilizó Novozym 435 el cual fue donado por Novo Industries, Dinamarca. Para generar el medio anhidro se utilizaron tamices moleculares de 3 Å y como co-solvente se utilizó *tert*-butanol, ambos adquiridos en Sigma-Aldrich. Para la determinación del rendimiento de FAME se utilizó metil ester de ácido heptadecanoico con pureza para análisis cromatográfico. Todos los otros químicos utilizados fueron de grado analítico.

Tabla 6.1 Propiedades fisicoquímicas del aceite residual de fritura (WFO).

Propiedades	Unidad	WFO
Densidad (a 20 °C)	kg/m^3	926
Viscosidad cinemática a 40 °C	cst	47,9
Índice de acidez	mg KOH/g	4,6
FFA	%	2,3
Índice de yodo	g I_2/100g aceite	89
Índice de peróxido	meq/kg	10,5

*Las muestras fueron filtradas antes del análisis

6.3.2 Modelo cinético

En este estudio se utilizó el modelo Ping Pong con inhibición competitiva por alcohol para modelar el proceso (Ec. 6.1) (Al-Zuhair *et al.*, 2006; Krishna y Karanth, 2001).

$$\upsilon = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_W}{[W]}\left[1 + \frac{[M]}{K_{IM}}\right] + \frac{K_M}{[M]}} \tag{6.1}$$

Donde:

υ : velocidad inicial de reacción (mol/L/min).

$V_{máx}$: velocidad máxima de reacción (mol/L/min).

K_W : constante de saturación del aceite residual (mol/L).

K_M : constante de saturación de metanol (mol/L).

K_{IM} : constante de inhibición de metanol (mol/L).

[W] : concentración de aceite residual (mol/L).

[M] : concentración de metanol (mol/L).

6.3.3 Procedimiento para la determinación de las constantes cinéticas

Para el cálculo de las constantes cinéticas $V_{máx}$, K_W y K_M el sistema fue acotado para utilizar una cinética de Michaelis – Menten. Para el cálculo de $V_{máx}$ y K_M, se eliminó el efecto del

WFO manteniendo una concentración no inhibitoria ni limitante de 300 mol/L. La concentración de metanol se varió entre 100 y 3000 mol/L. Esto permitió utilizar una cinética de Michaelis – Menten solo en función de la concentración de metanol. Para el cálculo de $V_{máx}$ y K_W, se eliminó el efecto del metanol manteniendo una concentración no inhibitoria ni limitante de 1400 mol/L. La concentración de WFO se varió entre 200 y 350 mol/L. Esto permitió utilizar una cinética de Michaelis – Menten solo en función de la concentración de WFO, según se ejemplifica en la Ec. 6.2. Para el cálculo de las concentraciones se consideró como volumen total de la reacción la suma de ambos reactantes, metanol y aceite. Las concentraciones seleccionadas para este estudio estuvieron en el rango de razones de metanol/ WFO entre 0,6/1 a 15/1 (mol/mol), para el caso de metanol variable y razones molares metanol/WFO de 3/0,375 a 3/1 (mol/mol), para los experimentos con concentraciones variables de WFO. La mayor concentración de WFO fue establecida en función de la mínima cantidad de WFO necesaria para completar la reacción estequiométrica.

$$\upsilon = \frac{V_{\max}[W]}{K_W + [W]} \tag{6.2}$$

Para determinar los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y K_W, los datos fueron analizados a través de un gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, obtenido a partir de la linealización de la ecuación de Michaelis – Menten (Ec. 6.3). Se realizó el mismo procedimiento para la obtención de las constantes K_M y $V_{máx}$ para el metanol variable.

$$\frac{1}{\upsilon} = \frac{K_W}{V_{\max}} \bullet \frac{1}{[W]} + \frac{1}{V_{\max}} \tag{6.3}$$

Los resultados obtenidos fueron optimizados utilizando Excel solver para encontrar la mínima función objetivo de acuerdo a la ecuación 6.4. Esta ecuación compara las tasas medidas en forma experimental, con las tasas predichas por la ecuación cinética. Con esta optimización

fue posible obtener la constante K_{IM}, utilizando constantes de inhibición de acuerdo a referencias para iniciar la iteración (Al-Zuhair *et al.*, 2009).

$$FO = \sum(\upsilon pred - \upsilon \exp)^2 \tag{6.4}$$

Donde:

FO : función objetivo.

υ_{pred} : velocidad predicha.

υ_{pred} :velocidad experimental.

6.3.4 Condiciones de reacción

Cada reacción con las diferentes concentraciones de sustrato fue realizada en matraces Erlenmeyer de 25 mL con tapón de vidrio esmerilado para evitar pérdidas de metanol. Cada matraz fue incubado en un shaker durante 4 horas bajo las mismas condiciones de operación: 15 (% p/p) Novozym 435, 44,5 °C, 0,75 (% v/v) de *tert*-butanol, 0,5 g de tamices moleculares y 200 rpm. La dosis de *tert*-butanol fue seleccionada de acuerdo a los resultados del capítulo V. La dosis de tamices se calculó de acuerdo a la Ecuación 4.1, considerando un contenido de FFA de 2,3 % de acuerdo a la caracterización del WFO (Tabla 6.1). Se realizaron cuatro repeticiones para cada experimento.

La toma de muestras se llevó a cabo extrayendo cada 5 minutos 50 µL de la mezcla perfectamente agitada, durante los primeros 30 minutos de reacción. Luego, se tomaron muestras del mismo volumen cada 30 minutos hasta completar las 4 horas de reacción. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4 °C para detener la reacción. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. Las muestras centrifugadas se calentaron a 85 ºC, durante 30 minutos para eliminar el *tert*-butanol y el metanol. El sobrenadante fue extraído para cuantificar el rendimiento de FAME a través de GC-MS (Anexo A.1).

6.3.5 Puesta en marcha de un reactor semi-continuo para la producción de FAME

Se implementó un reactor semi-continuo para la producción de FAME de acuerdo a la Figura 6.1. El reactor fue construido en vidrio con un volumen útil de 0,5 L. Para el control de la temperatura se dispuso de una camisa conectada a un termostato. Para la agitación, el reactor fue montado sobre una placa con agitador magnético. Para la generación de un medio anhidro, los tamices moleculares fueron dispuestos en una columna de vidrio contigua al reactor, a través de la cual se recirculó continuamente la mezcla de la reacción. Para completar el *set-up* se implementó un sedimentador de vidrio del mismo volumen que el reactor, de modo de separar el FAME del glicerol.

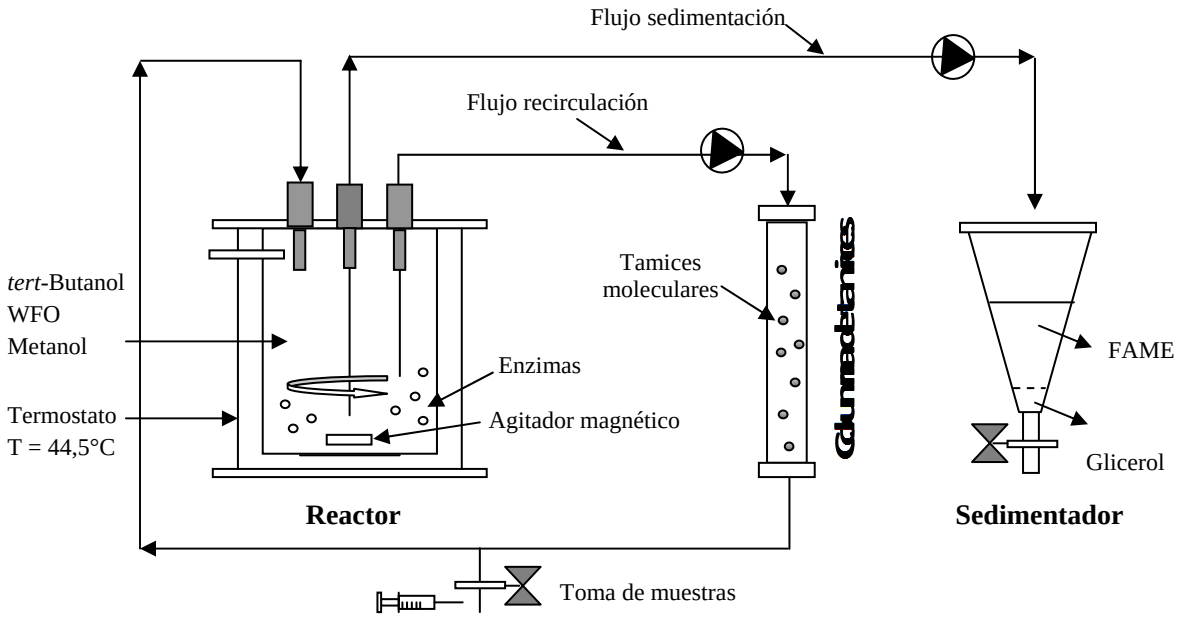

Figura 6.1 Esquema del reactor enzimático para la producción de FAME.

El reactor fue utilizado para llevar a cabo reacciones sucesivas para la producción de FAME. Para la puesta en marcha se adicionaron 15,3 gramos de enzimas (15 % p/p de Novozym 435) al reactor. Posteriormente, se adicionaron al mismo reactor 110 mL de WFO, 83 mL de *tert*-butanol (0,75 v/v) y 41 mL de metanol equivalentes a una razón molar 8/1, para alcanzar un volumen total de 234 mL. Paralelamente, a la columna de tamices se le adicionaron 20 gramos de tamices moleculares de 3 Å. Cada reacción fue llevada a cabo a 44,5 °C y 200 rpm, durante 4 horas de reacción, recirculando continuamente la mezcla a través de la columna de tamices.

Luego de este periodo, la mezcla fue transferida al sedimentador en donde el glicerol fue separado del FAME luego de 1 hora de sedimentación. El glicerol sedimentado fue extraído por la parte inferior del sedimentador. Finalmente, el FAME fue extraído del sedimentador para ser analizado por cromatografía de gases (Anexo A2.1), luego de la eliminación de los solventes y de su posterior centrifugación.

Para la realización de los ciclos posteriores se repitió el mismo procedimiento descrito, reutilizando directamente las enzimas adicionadas en el primer ciclo de reacción (éstas fueron mantenidas al interior del reactor durante todos los ciclos sucesivos).

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Efecto de la variación de la concentración de metanol en el rendimiento de FAME y en la velocidad inicial de reacción

Se investigó el efecto de la variación de la concentración de metanol en el rendimiento de FAME para una concentración de WFO constante. Para esto se realizaron reacciones de producción de FAME variando la razón molar metanol/WFO desde 0,6 a 15 (mol/mol) (Figura 6.2). Según la Figura 6.2 se distinguieron dos zonas, una correspondió a un rendimiento bajo el 60 % para relaciones metanol/WFO bajo las estequiométricas (< 3:1 moles de metanol/moles de WFO). La otra zona correspondió a un rendimiento de FAME sobre el 60 %, para razones de metanol sobre la estequiométrica (≥ 3:1 moles de metanol/moles de WFO). Esta tendencia fue observada hasta una razón molar metanol/WFO 8/1 (mol/mol). Para las razones molares superiores de metanol/WFO 12/1 y 15/1 (mol/mol), se observó una disminución en el rendimiento de la reacción.

Los resultados obtenidos coincidieron con los reportados por Phan y Phan (2008), quienes utilizando WFO como materia prima y metanol como aceptor acilo, establecieron un incremento en el rendimiento de FAME hasta una razón 8/1 el cual disminuía para razones sobre 12/1. Sin embargo, cabe destacar que en esta investigación Phan y Phan (2008) utilizaron KOH como catalizador. La reducción del rendimiento para altas concentraciones de metanol se podría deber a que el exceso de metanol interferiría en la separación de los ésteres producidos, por un incremento de la solubilidad del glicerol (Encinar *et al.*, 2007). Esto

significa que el proceso enzimático investigado tendría un funcionamiento similar a un proceso químico convencional. Por lo tanto, las condiciones operacionales utilizadas en la presente investigación permitirían optimizar el comportamiento de la lipasa como catalizador, evitando su inhibición, para alcanzar resultados similares a los obtenidos en una catálisis química convencional.

La Figura 6.2 también muestra que fueron necesarios cortos tiempos de reacción de entre 3 y 4 horas para alcanzar rendimientos de alrededor de un 90 % con razones de metanol/WFO entre 6/1 y 7/1 (mol/mol). Royon *et al.* (2007) también alcanzaron altos rendimientos bajo condiciones de operación similares, obteniendo un 80 % de rendimiento de FAME luego de 5 horas de reacción, utilizando Novozym 435 como catalizador, *tert*-butanol como co-solvente y razón molar metanol/aceite 6/1.

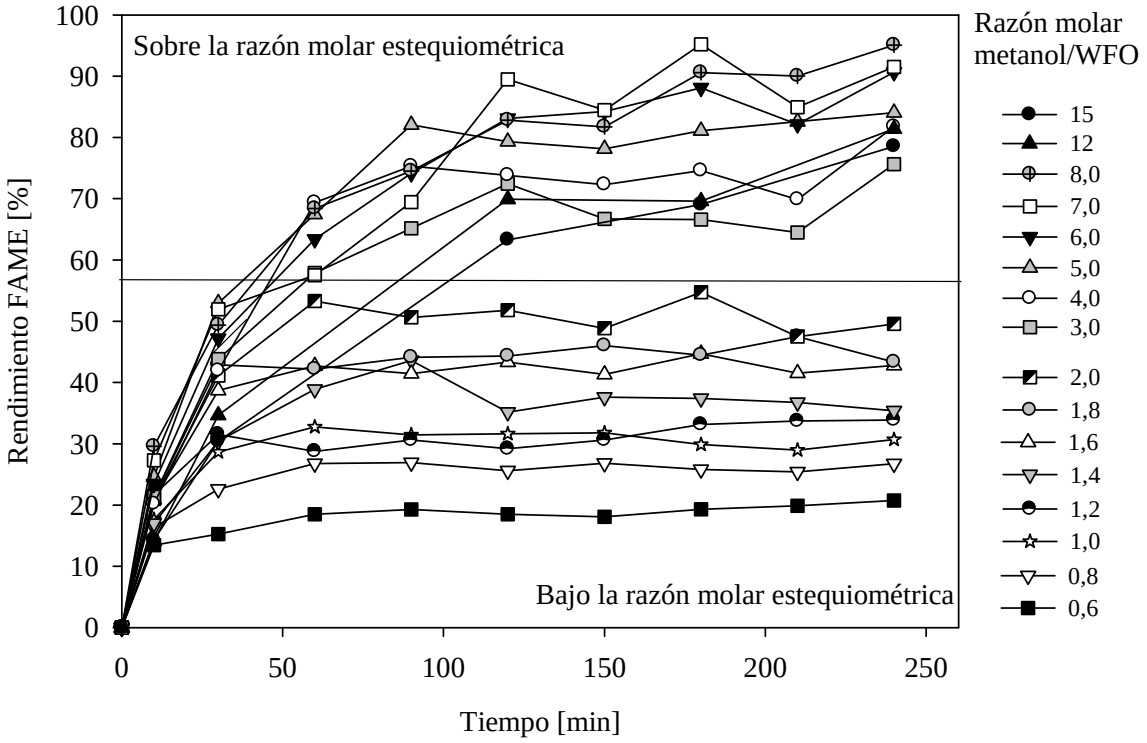

Figura 6.2 Rendimiento de FAME para diferentes moles equivalentes de metanol y WFO constante (1 mol). Condiciones de operación: 15 (% p/p) de Novozym 435, 44,5 °C, 0,75 (% v/v) de *tert*-butanol, 0,5 g de tamices moleculares de 3 Å y 200 rpm.

A pesar de los altos rendimientos alcanzados bajo estas condiciones previamente optimizadas, los estudios de cinética enzimática recientemente reportados no han considerado el uso de condiciones óptimas de reacción, obteniendo bajos rendimientos de FAME. Por ejemplo, Al-Zuhair *et al.* (2009) en 10 horas de reacción alcanzó un 35 % de FAME en un medio sin solvente utilizando lipasa de *P. cepacia* como catalizador y un 5,9 % de FAME en 62 horas de reacción utilizando lipasa de *Candida antarctica* y *n*-hexano como co-solvente. Si bien estas investigaciones han permitido comprender la cinética enzimática, las constantes y velocidad obtenidas no son aplicables a mayor escala en un proceso industrial, debido a los bajos rendimientos de producción de FAME alcanzados. Por el contrario, el presente estudio permitiría generar un proceso catalizado por lipasas factible de ser implementado a escala industrial, que incluso podría ser competitivo con un proceso convencional de catálisis química.

Los resultados de rendimiento de FAME fueron convertidos a concentración de FAME para la determinación de la tasa inicial de reacción. Estos datos de concentración de producto versus el tiempo fueron graficados para todas las concentraciones estudiadas. Posteriormente, se consideró el incremento de la producción de FAME durante los primeros 20 minutos de reacción, para lo cual se calcularon las pendientes en ese periodo (tasa inicial de reacción). Este periodo se estableció considerando pendientes con $R > 0,9$. La Figura 6.3 muestra un ejemplo de esta metodología para algunas de las concentraciones de metanol investigadas. Los resultados de la tasa inicial obtenida fueron utilizados para el cálculo de las constantes cinéticas.

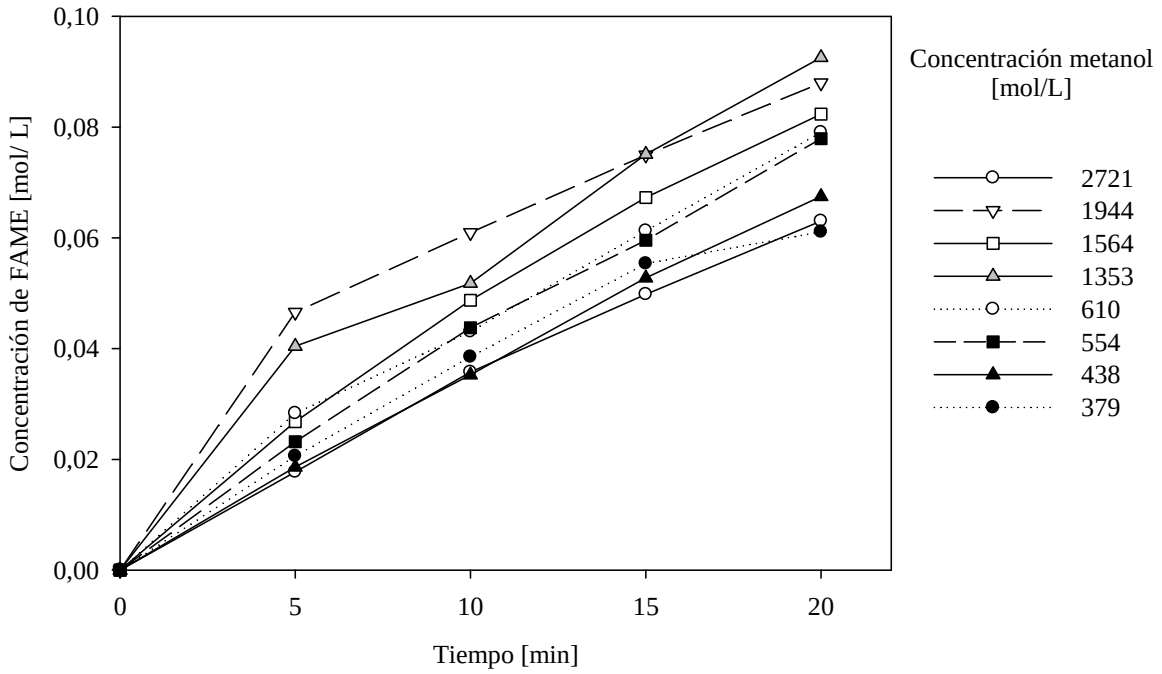

Figura 6.3 Determinación de la tasa inicial de reacción para diferentes concentraciones iniciales de metanol y concentración inicial constante de WFO [300 mol/L] (R > 0,9).

6.4.2 Efecto de la variación de la concentración de WFO en la tasa inicial de reacción

Para investigar el efecto de la variación de la concentración de WFO en la producción de FAME, se utilizó una concentración de metanol no limitante ni inhibitoria, establecida de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera parte de esta investigación. Bajo estas condiciones se investigó el efecto del WFO para razones molares metanol/WFO desde 3/0,375 a 3/1 (mol/mol). La Figura 6.4 muestra el gráfico con los resultados obtenidos de rendimiento de FAME durante la reacción. De acuerdo a estos resultados fue posible alcanzar un mayor rendimiento de FAME para bajas dosis de WFO, lo que haría suponer una inhibición por sustrato. Sin embargo, de acuerdo a Al-Zuhair *et al.* (2006) diversos reportes han predicho erróneamente que existe inhibición por sustrato en la cinética enzimática de ácidos grasos. Este error se ha debido a que en estas investigaciones se ha utilizado el porcentaje de conversión para describir la cinética de la reacción en vez de la tasa inicial de reacción. Por lo tanto, en el presente estudio se utilizó la tasa inicial de reacción para analizar la cinética enzimática, la que fue similar para todas las concentraciones estudiadas (Figura 6.4).

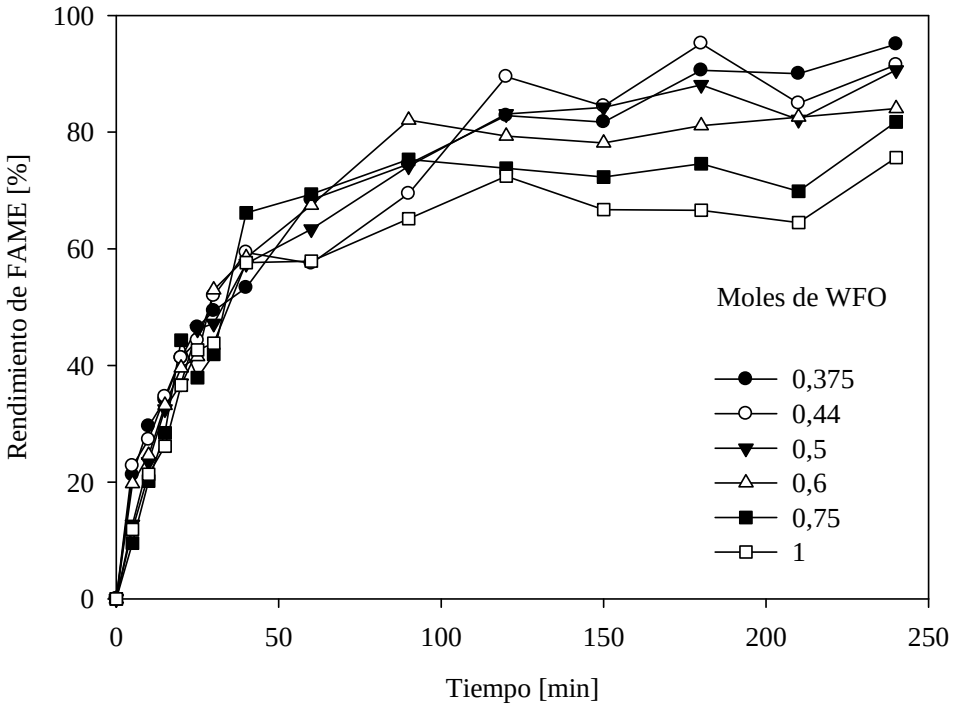

Figura 6.4 Determinación de la tasa inicial de reacción para diferentes concentraciones iniciales de WFO y concentración inicial constante de metanol [1400 mol/L] (R > 0,96).

Los resultados de rendimiento de FAME obtenidos fueron convertidos a concentración de FAME de acuerdo a los moles de FAME producidos, en función del volumen de reactantes en la reacción. Estos resultados fueron utilizados para calcular la tasa inicial de reacción durante los primeros 20 minutos. Este tiempo de reacción fue establecido de la misma forma que para el caso el metanol, con un R > 0,96 para cada curva. El cambio de la tasa inicial obtenida fue graficada en función de las concentraciones de WFO investigadas, como se observa en la Figura 6.5. Los resultados obtenidos permitieron establecer que no hubo inhibición por sustrato para el rango de concentraciones estudiadas. Resultados similares de una cinética competitiva sin inhibición por sustrato fueron reportados por Al-Zuhair *et al.* (2006). Sin embargo en un estudio posterior, los mismos autores reportaron por primera vez una inhibición por sustrato durante la transesterificación de TG (Al-Zuhair *et al.*, 2007). Previamente, la inhibición por ácidos grasos durante la esterificación también había sido reportada (Krishna y Karanth, 2001).

En el presente estudio la inexistencia de inhibición por sustrato podría estar asociada a que en esta investigación se consideró solamente la transesterificación de TG, debido a que se trabajó en un medio anhidro que evitó las reacciones de hidrólisis y esterificación. Por el contrario, en su estudio Al-Zuhair *et al.* (2007) utilizaron un medio orgánico que pudo haber favorecido reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación. Por lo tanto, la inhibición por sustrato encontrada en el estudio de Al-Zuhair *et al.* (2007) podría estar asociada a la inhibición por ácidos grasos durante la esterificación, propuesta previamente por Krishna y Karanth (2001).

Por otro lado, en este estudio se utilizaron condiciones óptimas de operación que permitirían un mejor desempeño de las enzimas para catalizar la reacción. Según Yadav y Lathi (2004) la inhibición por sustrato podría ser producida al utilizar lipasas inmovilizadas, debido a que éstas adsorberían el sustrato en exceso generándose problemas de transferencia de masa. En el presente estudio, esta inhibición se pudo evitar debido a que Novozym 435 es una enzima inmovilizada en un material hidrofílico y además, se utilizó un sistema con *tert*-butanol como co-solvente que elimina problemas de inmiscibilidad en la reacción. De forma similar, en una reciente investigación Halim y Kamaruddin (2008) reportaron que la cinética de la transesterificación catalizada por Novozym 435 en un sistema usando *tert*-butanol como co-solvente, podría ser modelada usando un mecanismo Ping Pong con inhibición solamente por metanol. Por lo tanto, en la presente investigación se utilizó este mecanismo para la modelación de la cinética de la transesterificación enzimática de WFO.

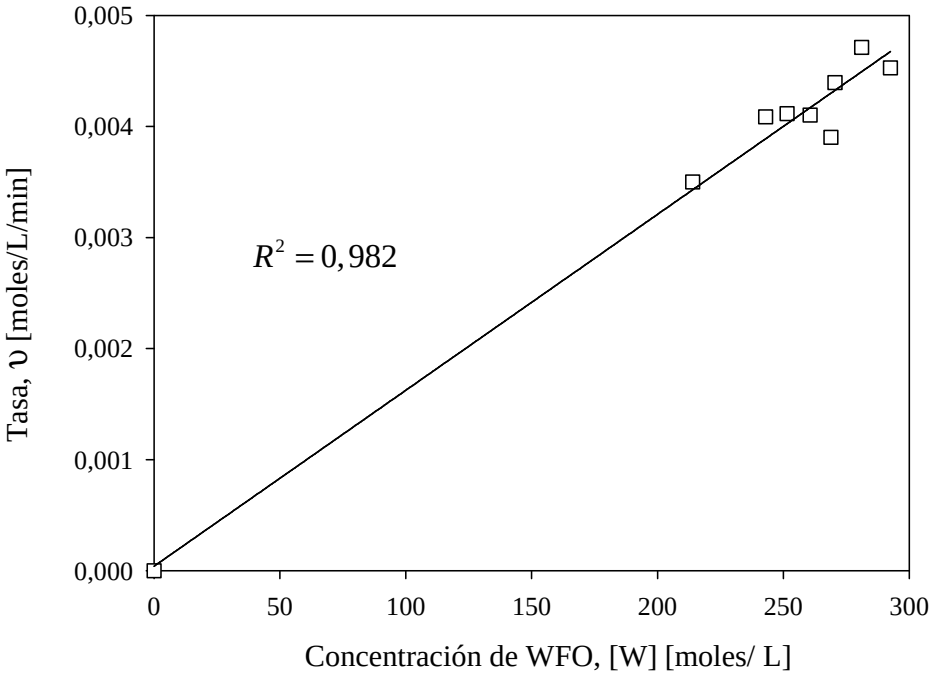

Figura 6.5 Cambio de la tasa inicial de reacción para diferentes concentraciones de WFO y metanol constante [1400 mol/L].

6.4.3 Modelo cinético para la transesterificación enzimática

Para la estimación de las constantes de saturación y la velocidad máxima, se construyó un gráfico de dobles recíprocos o gráfico de Lineweaver-Burk, tanto para el WFO variable como para el metanol variable. La Figura 6.6 muestra el gráfico de dobles recíprocos obtenido para el estudio de concentraciones variables de metanol. La constante de inhibición fue estimada usando Excel solver de acuerdo a la ecuación 6.4.

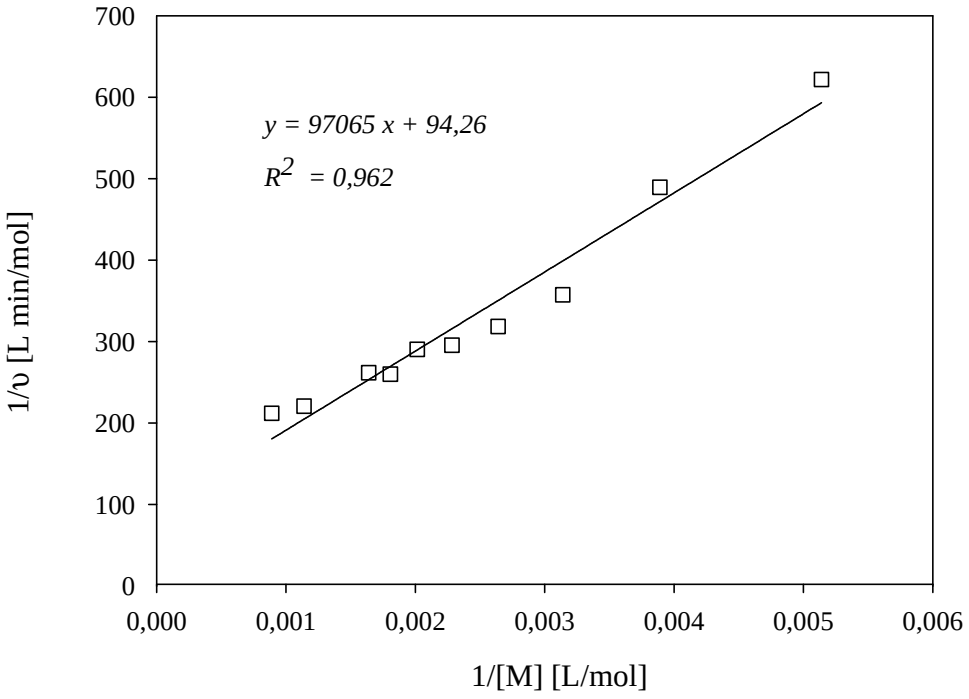

Figura 6.6 Gráfico de Lineweaver-Burk de los recíprocos de la concentración de metanol y de la velocidad inicial de reacción.

Los parámetros cinéticos estimados comparados a los reportados por literatura, son mostrados en la Tabla 6.2. En esta Tabla se observan importantes diferencias entre los resultados reportados, esto podría estar asociado a las diferencias entre las condiciones de experimentación y la forma de expresar los resultados. Krishna y Karanth (2001) utilizaron ácido butírico e isoamyl alcohol con Lipozyme IM-20 como catalizador en un sistema con *n*-hexano. Asimismo, en los experimentos realizados por Al-Zuhair *et al.* (2009) se utilizó el mismo solvente orgánico, *n*-hexano y la lipasa de *Candida antarctica* en solución. Pese a las diferencias, existen algunas similitudes en los trabajos reportados. En el estudio de Halim y Kamaruddin (2008) cuyas condiciones experimentales se asemejaron más al presente estudio, no se encontró inhibición por sustrato. Este resultado podría estar asociado al uso de *tert*-butanol como co-solvente en ambos estudios. Además, los resultados reportados en la Tabla 6.2 coinciden en el mayor efecto inhibitorio del metanol. En este sentido, Al-Zuhair *et al.*

(2007) sólo encontró inhibición por sustrato a razones molares superiores a 1/4 moles de moles de metanol/ moles de WFO

Los resultados de las constantes de saturación obtenidos (K_W y K_M) confirman una mayor afinidad por el aceite que por el metanol por parte de las enzimas. El alto valor de K_M permite establecer que es necesaria una alta dosis de metanol para incrementar la velocidad de reacción de transesterificación catalizada por Novozym 435. A pesar de los diferentes órdenes de magnitud de los otros estudios reportados (Tabla 6.2) estos muestran la misma tendencia de un K_M mayor a un K_W.

Tabla 6.2 Comparación entre los valores de $V_{máx}$, K_M, K_S y K_{IS} de diferentes referencias.

Parámetro	**Referencias**			
	(Halim y Kamaruddin, 2008)	(Krishna y Karanth, 2001)	(Al-Zuhair *et al.*, 2009)	Este trabajo
$V_{máx}$ (mol/L/min)	0,94	0,012	0,002	0,018
K_W (mol/L)	2,61	3030	0,25	397
K_M (mol/L)	10,25	3060	0,11	1030
K_{IM} (mol/L)	1,60	1,05	35,0	1815
K_{IW} (mol/L)	-	6,55*	28,0*	-

*Constantes de inhibición obtenidas de estudios con aceites vegetales comestibles.

En la mayoría de los estudios cinéticos de transesterificación o esterificación catalizadas con lipasas que consideran alcoholes de cadena corta, se ha observado solamente inhibición por alcohol, la cual es descrita por el modelo cinético de Ping Pong con inhibición competitiva por alcohol (Ec. 6.1). El modelo Ping Pong de la ecuación 6.1 con las constantes estimadas es presentado en la ecuación 6.5.

$$\upsilon = \frac{0,018}{1+\frac{1030}{[W]}\left[1+\frac{[M]}{1815}\right]+\frac{397}{[M]}} \tag{6.5}$$

De acuerdo a las Figuras 6.7 y 6.8, el modelo predice en forma adecuada el comportamiento de la reacción. Esto significa que las simplificaciones realizadas utilizando Michaelis – Menten permitieron determinar apropiadamente las constantes cinéticas.

Los resultados de la Figura 6.7 permiten establecer que la enzima presentó una baja inhibición incluso a concentraciones elevadas de metanol, manteniendo una alta tasa inicial de reacción hasta una razón molar metanol/ WFO 8/1 (mol/mol) (aprox. 2000 mol/L). Además, el modelo predice una disminución moderada de la tasa inicial para concentraciones mayores. La razón de la alta actividad de la enzima a concentraciones elevadas de metanol podría estar asociada a la incorporación del co-solvente en la reacción. La posibilidad de utilizar altas concentraciones de metanol en la catálisis enzimática permitiría alcanzar un proceso competitivo a nivel industrial. Esto se debe a que mayores razones estequiométricas de metanol permiten desplazar el equilibrio hacia los productos, generando tiempos de reacción menores y por lo tanto, factibles de ser usados a escala industrial.

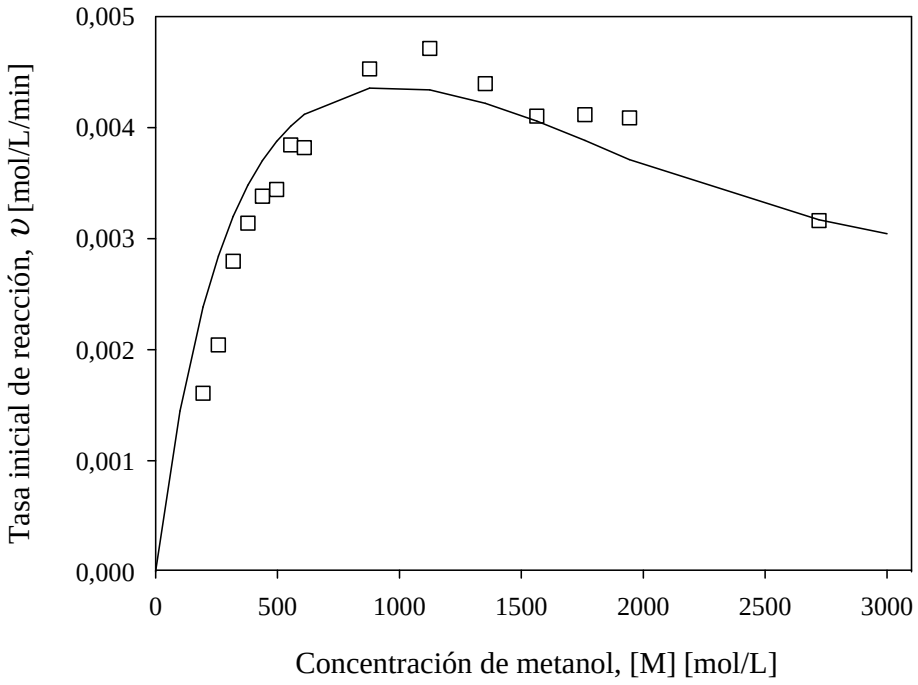

Figura 6.7 Comparación entre la tasa inicial de reacción predicha por el modelo y la tasa experimental a diferentes concentraciones de metanol y WFO constante [300 mol/L].

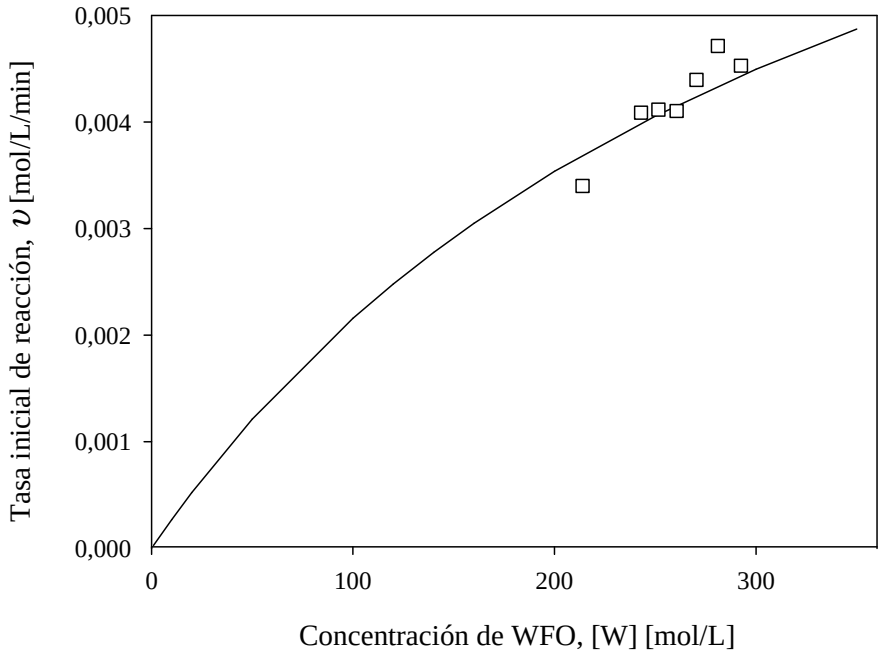

Figura 6.8 Comparación entre la tasa inicial de reacción predicha por el modelo y la tasa experimental a diferentes concentraciones de WFO y metanol constante [1400 mol/L].

6.4.4 Puesta en marcha de un reactor semi-continuo para la producción enzimática de FAME

Se investigó la producción semi-continua de FAME para lo cual se implementó un nuevo reactor enzimático con tamices moleculares para la extracción del agua durante la reacción (Figura 6.9). Para facilitar el proceso, los tamices fueron dispuestos en una columna aparte según se muestra en la Figura 6.9. Las concentraciones de metanol y WFO fueron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos por el estudio cinético (razón metanol/WFO 8/1 mol/mol). La operación de reactor se llevó a cabo durante 30 horas manteniendo las mismas enzimas en el reactor durante los ciclos sucesivos y adicionando nuevas materias primas y tamices para cada nuevo ciclo de reacción.

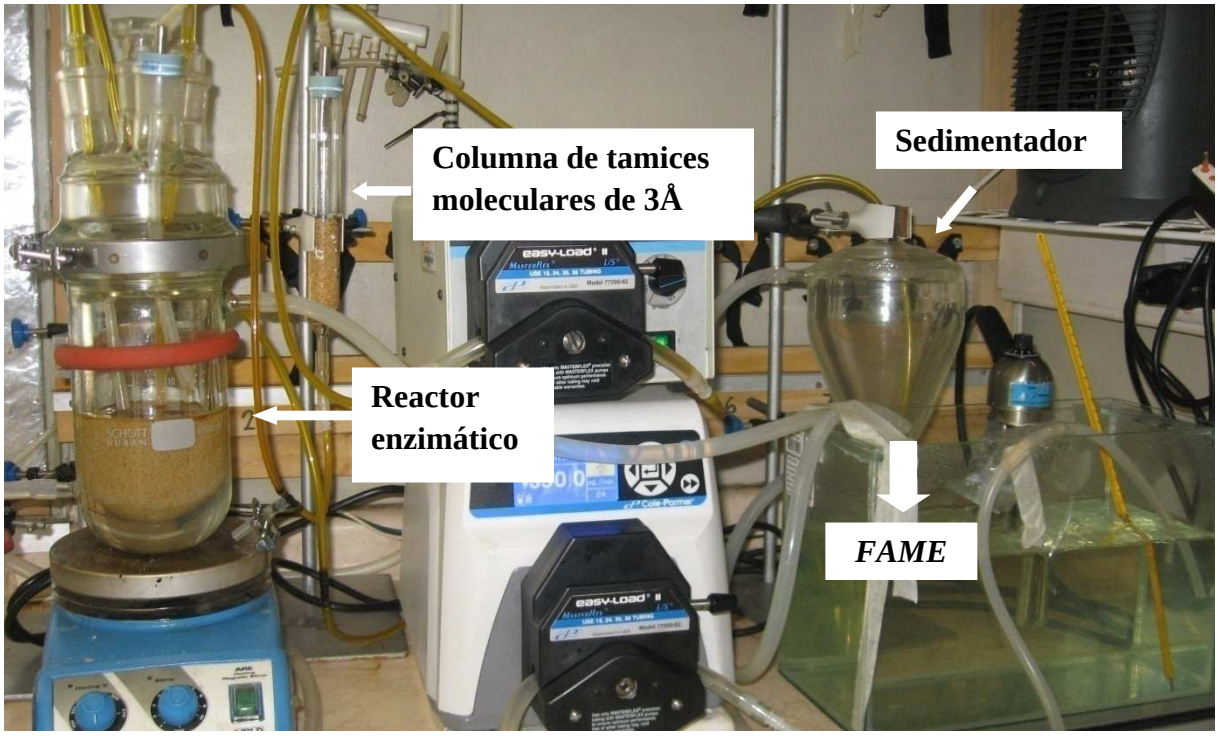

Figura 6.9 Reactor enzimático para la producción de FAME.

Los resultados obtenidos durante la puesta en marcha del reactor muestran que no existe evidencia de pérdida significativa de la actividad enzimática durante los ciclos sucesivos, debido a que el rendimiento de las reacciones se mantiene constante y sobre el 80 % de FAME (Figura 6.10). Esto demuestra que el medio anhidro y el uso de *tert*-butanol como co-solvente son herramientas efectivas para implementar un proceso enzimático semi-continuo que pueda llegar a ser económicamente competitivo. En función de alcanzar esta meta es necesario desarrollar futuras investigaciones operando el reactor en el largo plazo para establecer vida útil de las enzimas bajo las condiciones propuestas. Además, sería de interés establecer un procedimiento para la reutilización de los tamices moleculares. Otra alternativa a investigar es el uso de otros materiales absorbentes, tales como las zeolitas, lo cual permitiría bajar los costos de producción.

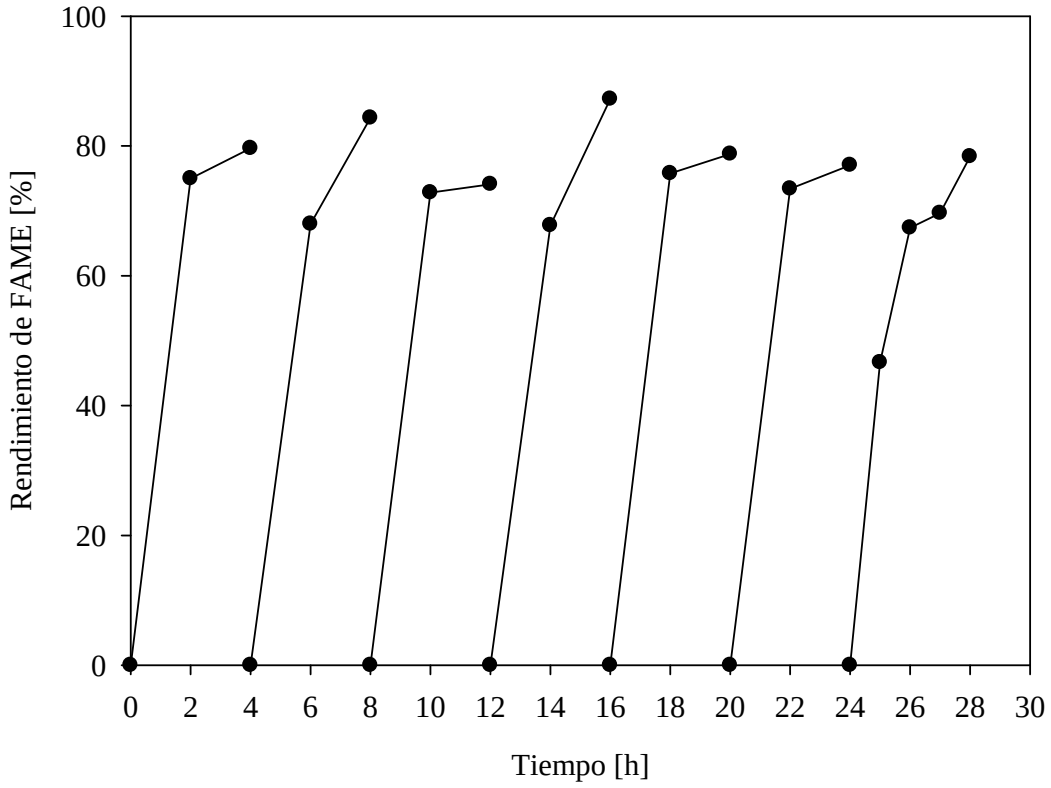

Figura 6.10 Rendimiento de FAME durante la puesta en marcha de un reactor enzimático semi-continuo en medio anhidro con reutilización de enzimas. Condiciones de operación por ciclo: 100 (% p/p) de WFO, razón metanol/aceite 8/1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435, 0,75 (v/v) de *tert*-butanol, 44,5 °C, 200 rpm y 4 horas de reacción.

Los cortos tiempos de reacción de este proceso y la reutilización de las enzimas generan una alternativa factible de ser utilizada a escala industrial. Este proceso presenta importantes ventajas en comparación al proceso convencional con catalizador químico. Esto se debe a que a pesar de que el proceso químico requiere sólo 1 hora de reacción de transesterificación, luego del proceso es necesaria una etapa de lavado para eliminar los residuos del catalizador químico. Esta etapa anexa no es necesaria en el proceso propuesto debido a la utilización de un catalizador sólido.

6.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO VI

Los resultados de la cinética de la transesterificación de WFO catalizada por la lipasa Novozym 435 en un medio anhidro, permitieron determinar que a una concentración de metanol constante no se encontraron efectos inhibitorios del sustrato dentro del rango de concentraciones estudiadas (hasta una razón molar de metanol/WFO 3/1 mol/mol). Por el contrario, a una concentración de WFO constante se encontró que hasta 1200 mol/L de metanol se incrementaba la tasa de producción de FAME, disminuyendo paulatinamente para concentraciones superiores. Con los resultados se pudo establecer la factibilidad de usar altas dosis de metanol de hasta 8/1 moles de metanol/moles de WFO que permitieron desplazar el equilibrio hacia los productos y acelerar la reacción sin pérdida de actividad enzimática. La reacción fue descrita por un modelo Ping-Pong con inhibición competitiva por metanol. Los resultados experimentales fueron usados para determinar los parámetros cinéticos del modelo: $V_{máx}$= 0,018 mol/L/min, $K_{M,\ metanol}$ = 1030 mol/L, $K_{W,WFO}$= 397 mol/L y $K_{IM,\ metanol}$= 1815 mol/L. Con los resultados obtenidos se implementó un reactor enzimático semi-continuo para la producción de FAME. Las condiciones de operación del reactor fueron: 100 (% p/p) de WFO, 15 (% p/p) de Novozym 435, razón metanol/WFO 8/1 (mol/mol), 0,75 (v/v) de *tert*-butanol y 44,5 °C a 200 rpm. El reactor fue operado reutilizando las enzimas durante ciclos consecutivos de 4 horas, en un sistema con *tert*-butanol como co-solvente y recirculando la mezcla de reactantes a través de una columna con tamices moleculares. Los resultados mostraron rendimientos sobre un 80 % de FAME durante 7 ciclos sucesivos. A diferencia de los trabajos reportados hasta la fecha, los cortos tiempos de reacción de este proceso y la reutilización de las enzimas generan una alternativa factible de ser utilizada a escala industrial, generándose un proceso potencialmente competitivo con el proceso convencional con catalizador químico.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Pese a que existen numerosos estudios relacionados con la producción de FAME catalizada con lipasas, la incorporación de WFO al proceso es un área que sólo ha comenzado a ser investigada en los últimos años. En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un proceso enzimático para la producción de FAME incorporando WFO a la reacción con aceite de raps.

En una primera etapa, la investigación llevada a cabo a través de una MSR (capítulo III) permitió establecer que la incorporación de estos aceites ácidos (WFO) incrementó el rendimiento de la reacción. Estos resultados concuerdan con los reportados por Li *et al.* (2007) quienes investigaron la producción de FAME catalizada por *R. oryzae*, estableciendo que la utilización de un aceite acidificado con FFA sintético permitiría incrementar el rendimiento de la reacción. Por el contrario, Watanabe *et al*. (2001) establecieron que residuos en WFO podrían afectar negativamente la actividad de las enzimas. En el presente trabajo, luego de estudiar una posible afinidad por sustrato (capítulo III), se estableció que la incorporación de WFO a la reacción favorecería el rendimiento, debido a que se trata de un sustrato más degradado, caracterizado por un mayor contenido de MG, DG y FFA que el aceite de raps. A pesar de que en esta etapa se incluyeron los FFA como sustratos que favorecerían la actividad enzimática, en el capítulo IV utilizando un medio anhidro (adicionando tamices moleculares de tamaño de 3 Å a la reacción), se determinó que la incorporación de ácido linoleico al aceite de raps como sustrato producía una disminución en el rendimiento de la reacción. Sin embargo, se comprobó que efectivamente los MG y DG son sustratos rápidamente degradados por la lipasa utilizada (Novozym 435). Lo anterior llevaría a establecer que efectivamente los MG y DG podrían favorecer la actividad de la enzima y por lo tanto favorecer el rendimiento de la reacción. No obstante, la presencia de FFA podría afectar negativamente el rendimiento ya que favorece las reacciones paralelas de esterificación e hidrólisis. Esto se comprobó al alcanzar rendimientos superiores al utilizar un medio anhidro, llevando a cabo la producción de FAME principalmente a través de la reacción de transesterificación, luego de la esterificación del contenido inicial de FFA en la materia prima.

En los estudios de catálisis enzimática para la producción de FAME se suele establecer que la ventaja de utilizar esta catálisis es que permite el uso de materias primas alternativas y

residuales con variables contenidos de agua y FFA (Al-Zuhair *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 2001; Fjerbaek *et al.*, 2009). Se ha reportado además que estas características no interfieren en la reacción ya que los FFA son esterificados a FAME y pequeñas dosis de agua sirven para incrementar la actividad enzimática (Fukuda *et al.*, 2001). Durante el desarrollo del proceso enzimático investigado, fue posible establecer que a pesar de que los FFA pueden ser esterificados, estos interfieren en las rutas de la reacción favoreciendo la hidrólisis al producir agua como subproducto. Esta agua producida por esterificación sumada al agua presente en la materia prima, serían las responsables de un producto ácido que no podría ser comercializado sin previos tratamientos de purificación.

En el presente trabajo, el uso de un medio anhidro permitió disminuir el contenido de MG y DG y la acidez del producto, incrementando el rendimiento de la reacción. Sin embargo, el uso de este medio al igual que en el medio control (sin la adición de tamices moleculares), no permitió reutilizar sucesivamente la lipasa Novozym 435. Esto fue resuelto incorporando *tert*-butanol como co-solvente a la reacción, lo cual permitió reutilizar la enzima 17 veces manteniendo el rendimiento sobre 50 %. Esta alta estabilidad de la enzima en reacciones sucesivas estaría relacionada con las características de *tert*-butanol como co-solvente medianamente polar. Este co-solvente permitiría remover el glicerol y el metanol de las lipasas gracias a sus propiedades hidrofílicas, permitiría mantener una alta actividad de las enzimas gracias a sus propiedades hidrofóbicas y eliminaría los problemas de inmiscibilidad entre el alcohol y el aceite (Yu *et al.*, 2010).

Estos resultados generan un cuestionamiento acerca de la mayoría de los reportes de cinética enzimática encontrados en la literatura, en los cuales se utilizan solventes que no mejoran los problemas de miscibilidad entre el alcohol y el aceite generando además otros inconvenientes en la reacción. Los solventes polares tales como *n*-hexano, (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Al-Zuhair *et al.*, 2009; Dossat *et al.*, 2002) y *n*-hexadecano (Pessoa *et al.*, 2010) favorecen la actividad enzimática, pero no son miscibles en metanol y glicerol. Por otro lado, los solventes polares como el agua (Cheirsilp *et al.*, 2008) son miscibles en metanol y glicerol pero afectan negativamente la actividad de las lipasas. Lo anterior puede entregar información errónea del comportamiento y actividad enzimática, no permitiendo utilizar la información obtenida para escalar los procesos a nivel industrial.

Debido a que lo anterior, en este trabajo se desarrollo un estudio cinético para conocer el funcionamiento de la enzima bajo las condiciones establecidas previamente, (en medio anhidro, utilizando *tert*-butanol como co-solvente y WFO como materia prima) que permitieron mejorar la miscibilidad del medio, sin afectar negativamente la actividad enzimática. Los resultados permitieron validar el modelo cinético Ping Pong con inhibición competitiva por alcohol y permitieron establecer que hasta con un razón metanol/WFO de 8/1 (mol/mol) fue factible incrementar el rendimiento de la reacción, sin afectar negativamente la actividad enzimática. Finalmente, la puesta en marcha de un reactor enzimático bajo las condiciones establecidas a lo largo de toda la investigación, permitió establecer que el trabajo realizado generó un proceso con potencial para ser implementado a escala industrial. Para lo anterior, las proyecciones de este trabajo apuntan a llevar a cabo la operación del reactor en el largo plazo con la finalidad de conocer el tiempo de vida útil de la enzima y estudiar la reutilización de los tamices moleculares u otra zeolita más económica. Todo lo anterior permitiría realizar un análisis de ciclo de vida del proceso para ser comparado con un proceso alcalino convencional y conocer su potencial para ser implementado a escala industrial.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- La adición de aceite residual de fritura (waste frying oil, WFO) en la reacción catalizada por Novozym 435 y utilizando aceite de raps como materia prima incrementó el rendimiento de metil ésteres de ácidos grasos (fatty acid methyl ester, FAME). Este efecto pudo ser principalmente atribuido al mayor contenido de monoglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG) en el WFO, comparado al aceite de raps, los cuales son sustratos más disponibles para la catálisis enzimática.

- La óptima combinación de condiciones predichas por la metodología de superficie de respuesta (MSR) para obtener un 100 % de rendimiento de FAME fueron el uso de 100 (% p/p) de WFO, razón metanol/aceite 3,8:1 (mol/mol), 15 (% p/p) Novozym 435 y 44,5 °C a 200 rpm.

- El rendimiento de FAME fue incrementado al incorporar tamices moleculares de tamaño de 3 Å a la reacción, lo cual generó un medio anhidro. Este medio evitó las reacciones paralelas de hidrólisis y esterificación produciéndose FAME principalmente por transesterificación. Además, el uso de un medio anhidro disminuyó el contenido de DG y el índice de acidez del FAME, alcanzando valores cercanos a la normativa.

- El uso de *tert*-butanol como co-solvente permitió llevar a cabo 17 ciclos sucesivos de producción de FAME, mostrando que Novozym 435 puede ser reutilizada en un medio anhidro.

- La reacción de producción de FAME de WFO catalizada por Novozym 435 en un medio anhidro y utilizando *tert*-butanol como co-solvente, fue descrita por un modelo Ping-Pong con inhibición competitiva por metanol. Los parámetros cinéticos del modelo fueron: $V_{máx}$= 0,018 mol/L/min, K_M, metanol = 1030 mol/L, K_W, WFO= 397 mol/L y K_{IM}, metanol= 1815 mol/L. Los resultados del modelo permitieron demostrar que el medio investigado permite utilizar altas dosis de metanol sin generar la pérdida de actividad de la lipasa, lo cual incrementa la velocidad de la reacción.

- La puesta en marcha de un reactor enzimático en un sistema con *tert*-butanol como co-solvente, medio anhidro y reutilización de enzimas, permitió mantener rendimientos sobre un 80 % de FAME durante 7 ciclos consecutivos de 4 horas bajo las siguientes condiciones de operación: 100 (% p/p) de WFO, 15 (% p/p) de Novozym 435, razón metanol/WFO 8/1 (mol/mol), 0,75 (v/v) de *tert*-butanol y 44,5 °C a 200 rpm.

- A diferencia de los trabajos reportados hasta la fecha, los cortos tiempos de reacción de este proceso (4 h) y la reutilización de las enzimas generan una alternativa factible de ser implementada a escala industrial, generando un proceso con catalizador enzimático que podría llegar a ser económicamente competitivo con un proceso químico convencional.

- Es de interés para investigaciones futuras en el área realizar un análisis económico o un análisis de ciclo de vida que permita comparar el proceso enzimático propuesto con el proceso químico convencional. Para lo anterior, sería necesario llevar a cabo la operación del reactor en el largo plazo de tal manera de determinar la vida útil de Novozym 435 bajo las condiciones propuestas.

NOMENCLATURA

Nomenclatura

GC/MS = Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa.

FAAE = Fatty acid alkil ester (alquil ésteres de ácidos grasos).

FAME = Fatty acid methyl ester (metil ésteres de ácidos grasos o biodiesel).

DG = Diglicéridos.

FFA = Free fatty acid (ácidos grasos libres).

MG = Monoglicéridos.

MSR = Metodología de superficie de respuesta.

Novozym 435 = Lipasa comercial de *Candida antárctica* inmovilizada en resina de acrílico.

SCO = Single cell oil.

TG = Triglicéridos.

WCO = Waste cooking oil (aceite residual de cocina).

WFO = Waste frying oil (aceite residual de fritura).

REFERENCIAS

Referencias

American Society for Testing and Materials, ASTM (2008): Annual Book of ASTM Standards: Section 5 - Petroleum Products, Lubricants, and Fossil Fuels. ASTM International, West Conshohocken.

Al-Zuhair S, Wei F, Jun L (2007) Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. Process Biochem 42:951-960.

Al-Zuhair S, Dowaidar A, Kamal H (2009) Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. Biochem Eng J 44:256-262.

Al-Zuhair S, Jayaraman K, Krishnan S, Chan W (2006) The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. Biochem Eng J 30:212-217.

Altiparmak D, Keskin A, Koca A, Gürü M (2007) Alternative fuel properties of tall oil fatty acid methyl ester–diesel fuel blends. Bioresour Technol 98:241–246.

Araújo J (1995) Oxidação de Lipidios, p. 1- 64. ***In*** Imprensa Universitária (ed.), Química de alimentos: Teoría e prática. Universidad Federal de Viçosa:Viçosa.

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Navia R (2010a) Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. Appl Microbiol Biotechnol 88:621–636.

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Muñoz R, Navia R (2010b) Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. J Biosci Bioeng 109:609-614.

Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H (2001) Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochem Eng J 8:39-43.

Barnwal B, Sharma M (2005) Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renew Sust Energ Rev 9:363–378.

Beal R (1975) Feed additive for poultry from soybean oil soapstocks. US Pat Appl 3916031, filed 31/01/1973; 1975.

Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo J, Guisan J (2009) Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. J Mol Catal B: Enzym 57:171–176.

Canakci M (2007) The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. Bioresour Technol 98:183–190.

Carraretto C, Macor A, Mirandola A, Stoppato A, Tonon S (2004) Biodiesel as alternative fuel: Experimental analysis and energetic evaluations. Energy 29:2195-2211.

COPEC (2007) Laboratorio central de combustibles. Procedimientos estándar de empresas COPEC para análisis de combustibles. Compañía de Petróleo de Chile S.A.

Cheirsilp B, H-Kittikun A, Limkatanyu S (2008) Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. Biochem Eng J 42:261–269.

Chen J, Wu W (2003) Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. J Biosci Bioeng 95:466-469.

Chen X, Du W, Liu D (2008) Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. Biochem Eng J 40:423–429.

Chen Y, Xiao B, Chang J, Fu Y, Lv P, Wang X (2009) Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energ Convers Manage 50:668-673.

Chhetri A, Tango M, Budge S, Watts K, Islam M (2008) Non-edible plant oils as new sources for biodiesel production. Int J Mol Sci 9:169-180.

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 25:294-306.

Demirbas A (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Prog Energ Combust 31:466-487.

Demirbas A (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energ Convers Manage 50:14-34.

Dizge N, Aydiner C, Imer D Y, Bayramoglu M, Tanriseven A, Keskinlera B (2009) Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. Bioresour Technol 100:1983-1991.

Dossat V, Combes D, Marty A (1999) Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. Enzyme Microb Tech 25:194–200.

Dossat V, Combes D, Marty A (2002) Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. Enzyme and Microbial Technology 30:90-94.

Dossin T, Reyniers M, Berger R, Marin G (2006) Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production. Appl Catal B-Environ 67:136-148.

Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J (2004) Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. J Mol Catal B: Enzym 30:125-129.

Du W, Xu Y, Liu D, Li Z (2005) Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. J Mol Catal B: Enzym 37:68-71.

Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. Appl Microbiol Biotechnol 79:331-337.

Encinar J M, Gonzalez J F, Rodriguez-Reinares A (2007) Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. Fuel Processing Technology 88:513-522.

Escobar J, Lora E, Venturini O, Yanez E, Castillo E, Almazan O (2009) Biofuels: Environment, technology and food security. Renew Sust Energ Rev 13:1275-1287.

FAO (2009) Undernourishment around the world. The state of food in security in the world. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0876e/i0876e02.pdf. Consultado el 4 de Junio de 2010.

Felizardo P, Correia M, Raposo I, Mendes J, Berkemeier R, Bordado J (2006) Production of biodiesel from waste frying oil. Waste Manage 26:487-494.

Fjerbaek L, Christensen K, Norddahl B (2009) A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnol Bioeng 102:1298-1315.

Freedman B, Butterfield R, Pryde E (1986) Transesterification kinetics of soybean oil. J Am Oil Chem Soc 63:1375-1380.

Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001) Review: Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J Biosci Bioeng 92:405-416.

Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, Noda H (2008) Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. Trends Biotechnol 26:668-673.

Gui M, Lee K, Bhatia S (2008) Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. Energy 33:1646-1653.

Gustone F (2009) Lipids as Source of Food and Fuel-Will There be Enough? Dissertation, 2nd International Congress on Biodiesel: The Science and The Technologies Munich, Germany.

Haas M (2005) Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. Fuel Process Technol 86 1087- 1096.

Halim S, Kamaruddin A (2008) Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a *tert*-butanol system. Process Biochem 43:1436–1439.

Hernandez-Martin E, Otero C (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. Bioresour Technol 99:277-286.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J 54:621-639.

IEA (2009) Key World Energy Statistics. International Energy Agency. http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/key_stats_2009.pdf. Consultado el 4 de Junio de 2010.

Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. J Mol Catal B: Enzym 16:53-58.

Issariyakul T, Kulkarni M, Meher L, Dalai A, Bakhshi N (2008) Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil. Chem Eng J 140:77-85.

Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H (2001) Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. J Biosci Bioeng 91:12-15.

Kose O, Tuter M, Aksoy H (2002) Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. Bioresour. Technol. 83:125-129.

Krishna S H, Karanth N G (2001) Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate - A kinetic study. Biochim Biophys Acta 1547:262-267.

Kulkarni M, Dalai A (2006) Waste cooking oils an economical source for biodiesel: A Review. Ind Eng Chem Res 45:2901-2913.

Lara P, Park E (2004) Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. Enzyme Microb Tech 34:270-277.

Leung D, Guo Y (2006) Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. Fuel Process Technol 87:883–890.

Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z (2006) Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. J Mol Catal B: Enzym:58-62.

Li N, Zong M, Wu H (2009) Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. Process Biochem 44:685-688.

Li Q, Du W, Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl Biochem Biotechnol 80:749-756.

Li W, Du W, Liu D (2007) *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell-catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in *tert*-butanol system. Process Biochem 42:1481-1485.

Lin C, Lin S (2007) Effects of emulsification variables on fuel properties of two- and three-phase biodiesel emulsions. Fuel 86:210-217.

Lu J, Deng L, Zhao R, Zhang R, Wang F, Tan T (2010) Pretreatment of immobilized *Candida sp.* 99-125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. J Mol Catal B: Enzym 62:15–18.

Lu X, Vora H, Khosla C (2008) Overproduction of free fatty acids in E. coli: Implications for biodiesel production. Metab Eng 10:333-339.

Maceiras R, Vega M, Costa C, Ramos P, Márquez M (2009) Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. Fuel 88:2130–2134.

Marchetti J, Miguel V, Errazu A (2007) Possible methods for biodiesel production. Renew Sust Energ Rev 11:1300–1311.

Nie K, Feng X, Fang W, Tianwei T (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. J Mol Catal B: Enzym 43:142–147.

Noureddini H, Gao X, Philkana R (2005) Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technol 96:769-777.

Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z (2009) Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. Bioresour Technol 100:5146-5154.

Orcaire O, Buisson P, Pierre A (2006) Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. J Mol Catal B: Enzym 42:106-113.

Owen N, Inderwild O, King D (2010) The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern? Energy Policy 38:4743–4749.

Parawira W (2009) Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. Crit Rev Biotechnol 29:82-93.

Pérez-Lombard L, Ortiz J, Pout C (2008) A review on buildings energy consumption information. Energ Buildings 40:394–398.

Pessoa F, Magalhães S, Falcão P (2010) Production of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower and soybean oils: modeling. Appl Biochem Biotechnol 161:238-244.

Phan A N, Phan T M (2008) Biodiesel production from waste cooking oils. Fuel 87:3490-3496.

Ramadhas A, Jayaraj S, Muraleedharan C (2005) Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. Fuel 84:335-340.

Röttig A, Wenning L, Bröker D, Steinbüchel A (2010) Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. Appl Microbiol Biotechnol 85:1713-1733.

Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S (2007) Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. Bioresour Technol 98:648–653.

Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. J Biotechnol 119:291-299.

Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Noda H, Fukuda H (2000) Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. J Biosci Bioeng 90:180-183.

Sarin R, Sharma M, Sinharay S, Malhotra R (2007) Jatropha–Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia. Fuel 86:1365–1371.

Sato S, Bueno De Almeida W, Araujo A (2008) Biodiesel production from soapstock. US Pat Appl 2008/0118961A1, filed 09/11/2004; 2008.

Scholz V, Nogueira da Silva J (2008) Review: Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. Biomass Bioenerg 32:95 - 100.

Shah S, Gupta M (2007) Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. Process Biochem 42:409-414.

Sharma Y, Singh B, Korstad J (2010) High yield and conversion of biodiesel from a nonedible feedstock (*Pongamia pinnata*). J Agr Food Chem 58:242–247.

Shieh C, Liao H, Lee C (2003) Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Bioresour Technol 88:103-106.

Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y (2002) Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. J Mol Catal B: Enzym 17:133-142.

Soumanou M, Bornscheuer U (2003) Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. Enzyme Microb Technol 33:97-103.

Sousa L, Lucena I, Fernandes F (2010) Transesterification of castor oil: Effect of the acid value and neutralization of the oil with glycerol. Fuel Process Technol 91:194–196.

Suehara K, Kawamoto Y, Fujii E, Kohda J, Nakano Y, Yano T (2005) Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. J Biosci Bioeng 100:437-442.

Talukder M, Wu J, Van Nguyen T, Fen N, Melissa Y (2009) Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. J Mol Catal B: Enzym 60:106-112.

Tamalampudi S, Talukder M, Hama S, Numata T, Kondo A, Fukuda H (2008) Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochem Eng J 39:185-189.

The British Standards Institution: BS EN 14214:2003. Automotive fuels. Fatty acid methylesters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods, BSI, London (2003).

Turkan A, Kalay S (2006) Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. J. Chromatogr. A 1127:34-44.

U.S. Census Bureau International Data Base, world population summary. http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.php. Consultado el 6 de Junio de 2010.

Veljkovic V, Lakicevic S, Stamenkovic O, Todorovic Z, Lazic M (2006) Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. Fuel 85:2671-2675.

Wang L, Du W, Liu D, Li L, Dai N (2006a) Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system. J Mol Catal B: Enzym 43:29-32.

Wang Y, Ou S, Liu P, Xue F, Tang S (2006b) Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil. J Mol Catal A-Chem 252:107-112.

Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, 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.

Xiong W, Li X, Xiang J, Wu Q (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Appl Microbiol Biotechnol 78:29-36.

Xu G, Zhang B, Liu S, Yue J (2006) Study on immobilized lipase catalyzed transesterification reaction of tung oil. Agr Sci China 5: 859-864.

Yadav G D, Lathi P S (2004) Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. Journal of Mol Catal B-Enzym 27:113-119.

Yu D, Tian L, Wu H, Wang S, Wang Y, Ma D, Fang X (2010) Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. Process Biochem 45:519–525.

Zeng J, Du W, Liu X, Liu D, Dai L (2006) Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. J Mol Catal B: Enzym 43:15-18.

Zhang Y, Dube M, McLean D, Kates M (2003) Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. Bioresour Technol 90:229–240.

Zheng S, Kates M, Dube M, McLean D (2006) Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. Biomass Bioenerg 30:267-272.

ANEXO 1. PUBLICACIONES

Patente

Azócar L, Betancourt R, Navia R, Fuentes O (2010) Proceso de producción de biodiesel comercializable y de baja acidez. Patente solicitada al Instituto Nacional de Propiedad Intelectual (INAPI), Chile; N° de registro 31032010.

Publicaciones directamente relacionadas con la tesis doctoral

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Navia R (2010a) Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. Appl Microbiol Biotechnol 88:621–636.

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Muñoz R, Navia R (2010b) Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. J Biosci Bioeng 109:609-614.

Ciudad G, Reyes I, Jorquera M, Azócar L, Wick L, Navia R. Novel three-phase bioreactor concept for fatty acid alkyl esters production using *R. oryzae* as whole cell catalyst. Aceptada en World J Microbiol Biotechnol. WIBI6068R1.

Azócar L, Ciudad G, Heipieper H, Muñoz R, Navia R (2010b) Novel lipase catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. Enviado a J Biosci Bioeng.

Ciudad G, Reyes I, Jorquera M, Azócar L, Wick L, Briones R, Navia R. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. Enviado a New Biotechnol. NBT-D-10-00298.

Azócar L, Beroiz L., Ciudad G, Navia R. Enzymatic transesterification reaction kinetics in a *tert*-butanol system for biodiesel production. En preparación.

Otras publicaciones

Muñoz, C., Rojas, D., Candia, O., Azócar, L., Bornhardt, C., Antileo, C. Supervisory control system to enhance partial nitrification in an activated sludge reactor. Chem. Eng. J. 145 (2009) 453–460.

Azócar, L, Muñoz, R, Ciudad G, Navia, R. Fly ashes as catalyst for biodiesel production. En preparación.

Azócar, L, Reitan A, Leirset I, Toven, K. Weight loss kinetics in torrefaction of various biomass feedstocks. En preparación.

Otros

Co guía de tesis de pregrado

Robinson Muñoz González (2010). Estudio de la producción de biodiesel a partir de aceite residual, utilizando cenizas volantes como catalizador heterogéneo. Tesis para optar al grado de Ingeniero Ambiental. Universidad de La Frontera.

Leticia Beroiz Gutiérrez (2010). Estudio cinético de la producción de biodiesel de aceite residual de fritura catalizada con lipasas. Tesis para optar al grado de Ingeniero Ambiental. Universidad de La Frontera.

Co-autor de capítulos de libro

Valdés A, Díaz L, Hernández S, Azócar L. **La biomasa y los biocombustibles**. En: Cultivos de algas para la producción de biocombustibles. En prensa.

Díaz L, Ciudad G, Azócar L. **El biodiesel.** En: Cultivos de algas para la producción de biocombustibles. En prensa.

inapi

INSTITUTO NACIONAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL — GOBIERNO DE CHILE

USO EXCLUSIVO INAPI

21 Nº Solicitud	11 Nº Registro
00313 31.03.2010	
43 Fecha de Publicación	
22 Fecha de Solicitud	45 Fecha de Registro

SOLICITUD DE PATENTE

2050

12 TIPO DE SOLICITUD

- [X] INVENCIÓN
- [ ] MODELO DE UTILIDAD
- [ ] DISEÑO INDUSTRIAL
- [ ] DIBUJO INDUSTRIAL
- [ ] ESQUEMAS DE TRAZADO O TOPOGRAFÍA DE CIRCUITOS INTEGRADOS

PRIORIDAD

31 Nº
32 FECHA
33 PAIS

31 Nº
32 FECHA
33 PAIS

31 Nº
32 FECHA
33 PAIS

DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS

- [X] RESUMEN
- [X] MEMORIA DESCRIPTIVA
- [X] PLIEGO DE REIVINDICACIONES
- [X] DIBUJOS
- [ ] PODER
- [ ] CESIÓN
- [ ] COPIA PRIORIDAD — [ ] CERTIFICADA — [ ] TRADUCIDA AL ESPAÑOL
- [ ] PROTOTIPO

54 TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD

PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL COMERCIALIZABLE Y DE BAJA ACIDEZ

71 SOLICITANTE (Razón Social y/o Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)

1. UNIV. DE LA FRONTERIA 31,76%
Avda. Francisco Salazar 01145
TEMUCO
CHILE

2. UNIV. DE CONCEPCIÓN 10,45%
Victor Lamas 1290
CONCEPCIÓN
CHILE

3. MOLINERA GORBEA LIMITADA 41,90%
O'Higgins 585,
GORBEA
CHILE

4. SOC. DE FOMENTO AGRICOLA DE TEMUCO A.G. 7,49%
Avda. San Martin Nº 628,
TEMUCO
CHILE

5. COMPAÑÍA DE PETRÓLEOS DE CHILE COPEC S.A. 8,40%
AGUSTINAS Nº 1382,
SANTIAGO
CHILE

74 REPRESENTANTE (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)

CLARKE MODET & Co. CHILE LIMITADA
HUERFANOS 835 OF.1903 PISO 19
Santiago, CHILE
TEL: (56-2) 369 9888
FAX: (56-2) 360 9050 e-mail: info@clarkemodet.cl

72 INVENTOR O CREADOR (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)

1.- Robinson Eugenio Betancourt Astete
Avda. Francisco Salazar 01145
TEMUCO
CHILE

2.- Rodrigo Javier Navia Diez
Avda. Francisco Salazar 01145
TEMUCO
CHILE

3.- Laura Haydée Azócar Ulloa
Avda. Francisco Salazar 01145
TEMUCO
CHILE

4. Oscar Farías Fuentes
Victor Lamas 1290
CONCEPCIÓN
CHILE

De conformidad con el Art. 44 de la Ley Nº 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos.

Nombre y Firma Representante

Nombre y Firma Solicitante

USO EXCLUSIVO INAPI

1er. PAGO

2do. PAGO

3er. PAGO

VISITENOS EN : www.inapi.cl

LLENAR POR COMPUTADOR O MAQUINA DE ESCRIBIR

P
a

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-010-2804-z

MINI-REVIEW

Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils

Laura Azócar · Gustavo Ciudad · Hermann J. Heipieper · Rodrigo Navia

Received: 12 June 2010 / Revised: 27 July 2010 / Accepted: 28 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract As biodiesel (fatty acid methyl ester (FAME)) is mainly produced from edible vegetable oils, crop soils are used for its production, increasing deforestation and producing a fuel more expensive than diesel. The use of waste lipids such as waste frying oils, waste fats, and soapstock has been proposed as low-cost alternative feedstocks. Non-edible oils such as jatropha, pongamia, and rubber seed oil are also economically attractive. In addition, microalgae, bacteria, yeast, and fungi with 20% or higher lipid content are oleaginous microorganisms known as single cell oil and have been proposed as feedstocks for FAME production. Alternative feedstocks are characterized by their elevated acid value due to the high level of free fatty acid (FFA) content, causing undesirable saponification reactions when an alkaline catalyst is used in the transesterification reaction. The production of soap consumes the conventional catalyst, diminishing FAME production yield and simultaneously preventing the effective separation of the produced FAME from the glycerin phase. These problems could be solved using biological catalysts, such as lipases or whole-cell catalysts, avoiding soap production as the FFAs are esterified to FAME. In addition, by-product glycerol can be easily recovered, and the purification of FAME is simplified using biological catalysts.

Keywords Biodiesel · Waste lipids · Non-edible oils · Single cell oil · Lipase · Whole cell

L. Azócar · G. Ciudad · R. Navia (✉)
Núcleo Científico Tecnológico en Biorrecursos,
Universidad de La Frontera,
Casilla 54-D,
Temuco, Chile
e-mail: rnavia@ufro.cl

H. J. Heipieper
Department of Environmental Biotechnology,
Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ,
Permoserstr. 15,
04318 Leipzig, Germany

R. Navia
Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera,
Casilla 54-D,
Temuco, Chile

Introduction

The world energy crisis is a result of population growth and increasing consumption of energy in both developed countries and emerging economies (Pérez-Lombard et al. 2008). From 1973 to 2007, worldwide primary energy consumption almost doubled from 256 to 505 million GJ (IEA 2009). Meanwhile, the earth's population has grown to an estimated 6.8 billion (US Census Bureau 2010). The predicted decline of petroleum reserves will occur at a rate of between 2% and 3% per year starting in 2010 (Campbell 2006).

Therefore, there is a strong need to replace petroleum with other, more sustainable energy sources. One promising alternative is biodiesel. The promotion of biodiesel or fatty acid methyl esters (FAME) production is justified by the fact that FAME can be used in place of diesel fuel, decreasing a country's dependence on imported petroleum while at the same time greatly reducing global CO_2 emissions when compared with diesel fuel (Carraretto et al. 2004). In addition, FAME is biodegradable, non-toxic, and essentially free of sulfur and aromatic components (Demirbas 2009). However, more than 95% of the world's biodiesel is produced from edible vegetable oils (Gui et al. 2008), increasing demand throughout the worldwide for vegetable oil production (Gustone 2009). In addition, about

Published online: 10 August 2010

70–95% of total FAME production costs are related to the primary raw material, i.e., vegetable oil.

Vegetable oils are produced on agricultural land. In developing countries, this would limit the amount of land available for agriculture, reducing food security when currently about 1 billion people suffer from malnourishment in these countries (FAO 2009). In addition, the USA would need to use 13% of its available farmland to replace 5% of the diesel used in transportation, whereas Europe would require 15% (Escobar et al. 2009). Worldwide, the human population and need for food, fiber, and other resources are increasing. Indeed, achieving future food security depends on conserving fertile soil, water, energy, and biological resources (Escobar et al. 2009; Gustone 2009).

Based on these facts, innovative raw materials will be needed for economically feasible FAME production (Haas 2005; Parawira 2009). These alternative raw materials may be diverse in their composition and are characterized by high content of free fatty acids (FFA), generating saponification reactions when alkaline catalysts are used (Fjerbaek et al. 2009). Therefore, alternative catalysts would also be needed for the application of these alternative raw materials. This review addresses the use of biologic catalysts for effective FAME production using alternative oils as feedstocks.

Background

Transesterification and the conventional biodiesel production process

Transesterification is the term used to describe the class of organic reactions wherein an ester is transformed into another through the interchange of alkoxy moiety (Parawira 2009). Biodiesel production is based on the transesterification reaction between triglycerides (TG) and methanol, in the presence of a catalyst, producing FAME with glycerol as a by-product (Fjerbaek et al. 2009; Parawira 2009). The reaction occurs in stages, with mono- and diglycerides (MG and DG) resulting as intermediate products (Marchetti et al. 2007).

The most commonly used catalysts in the industry are basic homogeneous catalysts. In a conventional industrial biodiesel production process, a mixture of methanol and vegetable oil with a molar ratio of 6:1 is applied to carry out the transesterification reaction, resulting in FAME production within 1 h of reaction time, using NaOH as the catalyst (Marchetti et al. 2007; Parawira 2009). As the solubility of the oil in methanol is low, two phases are present during such processes. Therefore, stirring (at about 200 rpm) and high temperatures (60°C) are necessary to guarantee acceptable reaction kinetics. In addition, an alkoxy formed from the NaOH and methanol mixture is used as a homogeneous catalyst (Marchetti et al. 2007).

After the transesterification reaction is complete, the mixture is allowed to settle under gravity. The heavier glycerol settles in the bottom layer, whereas the upper layer is made up of the FAME. The glycerol is separated, and the FAME is washed with water to remove the catalyst. In addition, a neutralization step is required to handle sodium soap residues from FAME production. The excess methanol present in FAME is recovered by distillation, whereas the glycerol may be refined for further use or directly discarded.

Acid and basic homogeneous catalysts

Base-catalyzed methanolysis is an addition–elimination reaction involving the nucleophilic attack of the methoxide anion on a carbon atom of the carbonyl moiety of acylglycerols (Marchetti et al. 2007). As the methoxide anion results from the reaction of methanol with the hydroxide ions, the concentration of methoxide ions increases with the amount of alkali. KOH and NaOH are the basic catalysts utilized for methoxide formation.

In using alternative raw materials with a high acid value, alkaline catalysts react with FFA to produce soap in a secondary reaction during transesterification (Kulkarni and Dalai 2006). This soap remains in the glycerol and in the biodiesel phase, and requires necessary yet expensive glycerol purification methods and processes for biodiesel washing. Therefore, basic catalysts are not suitable for producing esters from alternative raw materials containing FFA higher than 1 mg/g oil (Canakci 2007; Fjerbaek et al. 2009; Parawira 2009).

Acid catalysts are suitable for producing esters from alternative raw materials (Canakci 2007; Marchetti et al. 2007; Veljkovic et al. 2006; Wang et al. 2006b, c; Zheng et al. 2006). Using sulfuric acid (as well as other acids as catalysts), FFA can be esterified to FAME without soap formation. Therefore, acid catalysts can be also used in a pretreatment step, before the alkaline reaction (Marchetti et al. 2007; Veljkovic et al. 2006). In addition, TG can react with methanol to produce biodiesel and glycerol in a transesterification reaction using acid catalysis.

In a comparison of the advantages of using acid catalysts versus acid pretreatment with alkaline catalysts in transesterification reactions of high FFA feedstocks, the far longer reaction times and high costs of reaction equipment make acidic catalysis less favorable than the commercially applied alkaline catalysis using NaOH (Zhang et al. 2003). In addition, both acid and basic homogeneous catalysts require neutralization and separation from the reaction mixture. Environmental and economic problems related to the use of large amounts of energy and wastewater generation are also characteristic of these processes (Dossin

et al. 2006). Using homogeneous catalysts such as NaOH, about 20 L of wastewater is discharged per 100 L of biodiesel produced (Suehara et al. 2005), generating a high environmental impact. In addition, the energy balance indicates that each ton of biodiesel requires about 50 kW of electricity, of which 60–70% is consumed in glycerin refining (Barnwal and Sharma 2005).

Biotechnological tools could be an alternative for improving the conventional biodiesel production process (Röttig et al. 2010). The use of biological catalysts such as purified lipases or as a whole cell (from lipase-producing microorganisms) does not result in soap formation when alternative raw materials with high acid value are used in esterification of FFA to FAME. In addition, glycerol can easily be recovered, and the purification of FAME is simplified. In fact, immobilized catalysts can be easily separated and removed from the reaction mixture, and are therefore economically and environmentally suitable for biodiesel production (Röttig et al. 2010).

Raw materials for biodiesel production

Feedstocks for biodiesel production are mainly composed of TG, i.e., esters with three molecules of fatty acids and one glycerol molecule. The fatty acids of TG are long-chain carboxylic acids (from C_{12} to C_{20}), which may be saturated or unsaturated. At ambient temperature, most of the saturated TG is solid (*fats*) while unsaturated TG are liquid (*oils*). Several different raw materials may be used for biodiesel production according to this description: edible vegetable oils, non-edible vegetable oils (Gui et al. 2008), waste lipids (Azócar et al. 2010; Canakci 2007; Felizardo et al. 2006), and oleaginous microorganisms (Chisti 2007, 2008; Li et al. 2008a; Lu et al. 2008; Meng et al. 2009).

Edible oils

The main types of vegetable oils used in FAME production are rapeseed and sunflower oils in Europe and soybean oil in North and South America. Some advantages of these raw materials are their low saturation level, low FFA content (low acid value), and similar physicochemical properties (Table 1). The low saturation level allows FAME to be obtained with an appropriate pour point, similar to that of diesel fuel. The low FFA content allows for using the typical homogeneous alkaline catalyst in FAME production, avoiding soap generation resulting from saponification reactions. Due to the similar physicochemical properties of the vegetable oils typically used, the transesterification process does not require modifications for processing them (Table 1). In Southeast Asia, FAME is also being produced from palm oil used as feedstocks. This oil is characterized by a high saturated fatty acid level and a high acid value (Table 1). Due to the high amounts of saturated fats in palm oil, the biodiesel produced using this feedstocks presents inadequate low temperature properties. In addition, Asian countries are not self-sufficient in edible oil production, so non-edible seed oils for biodiesel production have been explored as raw materials (Sarin et al. 2007).

Non-edible oils

A wide variety of high FFA oils are available in large quantities. These oils are mainly used for making low-cost soap and are known as non-edible oils (Ramadhas et al. 2005). Non-edible oils, e.g., from jatropha (*Jatropha curcas* L.), karanja (*Pongamia pinnata*), mahua (*Madhuca indica*), polanga (*Calophyllum inophyllum*), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), rubber (*Ficus elastica*), soapnut (*Sapindus mukorossi*), and castor (*Ricinus communis* L.) are less expensive than edible oils and could be available to produce biodiesel (Barnwal and Sharma 2005).

Table 1 shows the properties and fatty acid composition of non-edible oils; most of them are characterized by an elevated viscosity and FFA content. However, the heating value and flash point are similar to those of edible oils. Therefore, using a suitable catalyst, FAME produced from these raw materials may present suitable performance in a diesel engine.

Rubber trees have seed kernels (50–60% of each seed) which contain 40–50% brown oil. The annual rubber seed production potential in India is about 150 kg/ha. The estimated availability of rubber seeds in India is about 30,000 t/year, which could yield about 5,000 t of rubber seed oil per year (Ramadhas et al. 2005). Jatropha and karanja are plants which are particularly suitable for FAME synthesis as they contain toxic compounds and hence have limited applications. Recently, jatropha has been considered as one of the most promising potential oil sources for producing biodiesel in Asia, Europe, and Africa. Jatropha is grown on marginal and degraded land, so it does not compete with food production. The oil content in jatropha seed is reported to be in the range of 30% to 50% of the weight of the seed and from 45% to 60% of the weight of the kernel itself (Chhetri et al. 2008). The oxidation stability of jatropha and pongamia oil was found to be close to that of soybean and rapeseed oil, which is explained by their matching composition of unsaturated fatty acids. Therefore, blends of jatropha and palm oil biodiesel have been proposed as efficient mixtures for improving low temperature behavior as well as proper oxidation stability (Sarin et al. 2007). Soapnut is a fruit of the soapnut tree generally found in tropical and sub-tropical climates in various regions of the world including Asia, America, and Europe. Soapnut is a potential raw material for FAME production, as this oil was found to have a

Appl Microbiol Biotechnol

Table 1 Physicochemical properties and fatty acid composition of feedstocks for biodiesel production

Properties	Raw material															
	Edible vegetable oils				Non-edible oils					Waste lipids						
	Sunflower	Rapeseed[a]	Soybean	Palm[a]	Rubber	Jatropha	Pongamia	Soapnut	Castor	WFO	WFO	Processed grease	Unprocessed grease	Soapstock	Tall oil	TSO
Kinematic viscosity (cSt)[b]	58	34	65	40	66	49.9	26.9	–	270	37	36.4	–	–	–	70	28
Density (kg/m^3)	918	927	–	918	910	918	911	–	962	925	924	–	–	–	–	918
Acid value (mg KOH/g oil)	0.2	0.8	0.2	5.3	34	14	19.9	9.1	4.7	4.5	1.3	14.8	41.8	29.8	158	193
Water content (%)	–	<0.01	–	2.1	–	–	–	–	0.2	1.3	0.4	55	19	4.9	5.2	–
Flash point (°C)	220	>100	230	267	–	240	–	–	245	>100	485	–	–	–	–	–
Saturation level (%)	10	–	15	47	19	21.1	16	–	–	–	–	22	47	–	2.1	–
Iodine value (gI_2/100 g of oil)	–	105	–	52.4	119	–	–	–	86	111	141	–	–	–	–	135
Heating value (MJ/kg)	40	–	40	–	38	40	–	–	38	–	41	–	–	–	40	–
Fatty acid composition (% *w/w*)																
Palmitic acid ($C_{16:0}$)	6.8	4.2	11.8	42.6	10.2	13.4	8.9	4.7	1.3	12.2	20.4	12.7	26	17.2	0	–
Stearic acid ($C_{18:0}$)	3.3	1.3	3.2	4.4	8.7	5.4	8.2	1.5	0.8	4.1	4.8	8.2	16.5	4.4	2.1	–
Oleic acid ($C_{18:1}$)	16.9	66.6	23.3	40.5	24.6	45.8	65.8	52.6	3	28.5	52.9	41.5	39.6	15.7	52.7	–
Linoleic acid ($C_{18:2}$)	73.7	18.7	5.5	10.1	39.6	32.3	12.1	4.7	4.4	49.5	13.5	30.9	4.4	55.6	38.3	–
Linolenic acid ($C_{18:3}$)	0	7.7	6.3	0.2	16	0	0	0	0.5	3.5	0.8	3.0	0.6	7.1	6.9	–
Others	2.6	1.5	0	2.2	0.9	3.1	5	36.5	87[c]	2.2	7.6	3.7	12.9	0	0	–
References	1	2	1	3–4–5	1	6–7	7–8	6	9–10	2	11–12	13	13	14	15	16

TSO tobacco seed oil, *1* Ramadhas et al. 2005, *2* Azócar et al. 2010, *3* Barnwal and Sharma 2005, *4* Demirbas 2005, *5* Talukder et al. 2009, *6* Chhetri et al. 2008, *7* Sarin et al. 2007, *8* Sharma et al. 2010, *9* Scholz and Nogueira da Silva 2008, *10* Sousa et al. 2010, *11* Demirbas 2009, *12* Leung and Guo 2006, *13* Canakci 2007, *14* Beal 1975, *15* Altiparmak et al. 2007, *16* Veljkovic et al. 2006

[a] Unrefined oils

[b] At 40°C

[c] Ricinoleic acid

composition of 9.1% FFA, 84.43% triglycerides, 4.88% sterol, and 1.59% other compounds (Chhetri et al. 2008).

Castor is a tree or shrub that can grow more than 10 m high and produces a very poisonous seed with an oil yield of 30–36% of the seed's mass. Castor oil is in great demand by the pharmaceutical and cosmetics industry, and it is possible to obtain as much as 2,000 kg oil per hectare. About 1.3 Mton of castor oil seed are produced in total each year, corresponding to about 550 kton of oil (Scholz and Nogueira da Silva 2008). However, harvesting castor oil is fairly complex and requires a large amount of manual labor. When harvested by hand, the ripe fruit (humidity of 45%) is selectively cut, and later, the capsules are removed. It is therefore a suitable crop only for the small-scale farming structure (Scholz and Nogueira da Silva 2008). In addition, the high viscosity and water content reduces the use of castor oil in conventional alkaline processes.

To date, oil from jatropha, pongamia, and rubber seed are the most feasible alternatives proposed. Because of the higher availability of these oils, they may be more economically feasibility than edible oils for biodiesel production. Further research to explore this opportunity for the biodiesel industry should be carried out.

Waste lipids

Waste lipids such as waste grease, waste frying oils (WFOs), and soapstock are potential feedstocks, which could reduce biodiesel production costs (Canakci 2007; Felizardo et al. 2006; Gui et al. 2008; Haas 2005; Kulkarni and Dalai 2006; Leung and Guo 2006; Zheng et al. 2006). In addition, both tall oil, a by-product of the manufacture of pulp and paper (Altiparmak et al. 2007), and tobacco (*N. tabacum* L.) seed oil, a by-product of tobacco leaf production (Veljkovic et al. 2006), have been proposed as new feedstocks to biodiesel production.

Canakci (2007) investigated the potential use of waste lipids in biodiesel production. These waste lipids were classified in two categories: yellow grease and brown grease. Yellow grease is produced from vegetable oil or animal fat that has been heated and used for cooking. Yellow grease must have a FFA level of less than 15%. If the FFA level exceeds 15%, it is called brown grease, sometimes referred to as trap grease. In the USA, the price of yellow grease varies from US$ 0.04 to 0.10/kg and that of brown grease from US$ 0.05 to 0.010/kg. At present, in the USA, an average of 1.4 restaurants per 1,000 inhabitants produces 500 million tons of grease and animal fats per year. This quantity could replace about 5.7 million liters of diesel fuel (Canakci 2007).

WFOs, also known as waste cooking oil (WCO), are generated from vegetable oils used at high temperatures in food frying. This process causes chemical reactions such as hydrolysis, polymerization, and oxidation, changing the physical and chemical properties of fatty acids (Kulkarni and Dalai 2006). To date, the total quantity of WFO produced in Europe, North America, and some Asian countries has reached 16.6 Mton (Gui et al. 2008). Considering that the total FAME production in 2009 was 11 Mton and demand is increasing by about 3.5 Mton/year (Gustone 2009), the use of WFO alone could supply the total oil demand for FAME production of the current year.

Soapstock is a by-product of the refining of vegetable oils and consists of a heavy, alkaline, aqueous emulsion of lipids, containing about 50% water, high FFA content, phospho-acylgcycerols, triacylglycerols, pigments, and other minor nonpolar components (Haas 2005). Soapstock waste has been mostly used as animal feed, raw material for soap production, and feedstocks for fatty acids production. Soapstock from soybean oil production is generated at a rate of about 6% in volume of the refined crude oil (Haas 2005). From soybean production of about 36 Mton in 2009 (Gustone 2009), 2.16 Mton of soybean soapstock was produced worldwide.

When using waste lipids for FAME production, the process must be flexible, due to the physicochemical properties of waste oils, which are from vegetable oils. As shown in Table 1, moisture content varies from 0.4% to 55%, while acid value ranges from 1.3 to 193 mg KOH/g oil for raw materials of different origin.

Single cell oils for biodiesel production

Due to the lack of feedstocks available on a global scale to produce FAME from oleaginous sources, single cell oils (SCO) are currently being investigated (Hu et al. 2008), as some microorganisms are capable of accumulating lipids in their cells with a yield of more than 20%. In addition, the production of SCO does not require arable land and does not compete with food production, as residual biomass can be used as a carbon source. The main microorganisms which are being investigated are microalgae, bacteria, yeast, and fungi (Li et al. 2008a).

Microalgae Microalgae can utilize carbon dioxide as carbon source and sunlight as energy for oil accumulation under specific environmental conditions (Li et al. 2008a). Oil accumulation yield depends on the species and culture conditions such as pH, salinity, and nitrogen sources (Li et al. 2008a), with nitrogen limitation and light intensity as the key parameters (Solovchenko et al. 2008). It has been found that many microalgae such as *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp., *Crypthecodinium cohnii*, *Cylindrotheca* sp., *Dunaliella primolecta*, *Isochrysis* sp., *Monallanthus salina*, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Schiz-*

ochytrium sp., and *Tetraselmis sueica* can accumulate oils (Chisti 2007); *B. braunii* and *Chlorella* sp. have been studied the most due to their high lipid content of 25–75% and 28–32%, respectively (Chisti 2007). *B. braunii* is able to biosynthesize and stores both hydrocarbons (highly saturated lipids) in high levels and lipids, mainly in the external cell wall (Largeau et al. 1980; Metzger et al. 2008). These synthesized lipids have been reported as fatty acids, epoxides, alkylphenols, and ether lipids (Metzger et al. 1991).

Microalgae can grow photoautotrophically or heterotrophically; heterotrophic microalgae are able to produce fatty acids. The use of an organic carbon source results in higher biomass production and higher lipid accumulation in the cell compared with autotrophic growth (Miao and Wu 2006; Xu et al. 2006b).

Microalgae are a potential raw material for producing different biofuels such as biogas, bioethanol, hydrogen, FAME, and hydrocarbons (Posten and Schaub 2009). However, microalgae have presented some significant problems associated with their growth conditions in bioreactor systems related to light requirements and large acreages (Vicente et al. 2009). In addition, a supply of carbon dioxide and fresh water is also necessary, elevating the production costs.

According to Samorì et al. (2010), the bottlenecks of biofuels production from microalgae are its higher overall cost compared with fossil fuels, as the operation of open ponds and bioreactors is expensive and the harvesting of algal biomass requires large amounts of energy. In addition, the critical step in the development of biodiesel from microalgae is lipid extraction, and hence, oil extraction technology must be improved and probably redefined in order to make microalgae competitive.

Bacteria Bacteria can accumulate mainly specialized lipids such as polyhydroxybutyrate and other polyhydroxyalkanoates, fatty alcohols, and glyco-, sulfo-, phospho-, and peptidolipids, as well as wax esters and hydrocarbons (Leman 2009). In addition, some bacteria are also capable to synthesize triacylglycerols. Due to their higher growth rate and the simplicity of their culture methods, bacteria could present advantages for biodiesel production compared with microalgae. Therefore, investigations on the use of oleaginous bacteria for biodiesel production as raw material have been recently performed (Uthoff et al. 2009).

Alvarez et al. (2000) and Alvarez and Steinbüchel (2002), isolated *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus rurbe*r NCIMB 40126 from soil, which were able to accumulate up to 87% and 26% dry wt. of triacylglycerols, respectively. In a recent review of Meng et al. (2009), other triacylglycerols accumulating bacteria have been proposed as oleaginous microorganisms for biodiesel production. The oil content in each bacterium was reported to be: *Nocardia* sp. 12–24% dry wt.; *Arthrobacter* sp. >40% dry wt.; *Acinetobacter calcoaceticus* 27–70% dry wt.; and *Bacillus alcalophilus* 18–24% dry wt. (Meng et al. 2009).

According to Lu et al. (2008), there are three main topics that should be investigated before microbial biodiesel production using bacteria can be considered as a full scale technology: (1) to reach fatty acids overproduction through re-engineering of the cellular metabolism, (2) to avoid glycerol overproduction, and (3) to investigate toxicological consequences of accumulating FFA in bacterial cultures. In this sense, some bacteria such as *Escherichia coli* have been genetically modified to increase their fatty acids production yield, principally in FFA form (50%). The objective behind increasing FFA accumulation yield is to avoid glycerol production as by-product in biodiesel synthesis by promoting the direct esterification reaction (Lu et al. 2008).

A promising research using genetically modified bacteria is the production of microdiesel or the biosynthesis of biodiesel. The process consists in the direct fatty acid ethyl ester production in metabolically engineered *E. coli*. Kalscheuer et al. (2006) reached biodiesel accumulation of 26% in *E. coli*. This was achieved by heterologous expression of the pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase of *Zymomonas mobilis*, and the unspecific acyltransferase of *Acinetobacter baylyi* strain ADP1 in *E. coli* (Kalscheuer et al. 2006). In addition, using this approach, ethanol formation was combined with fatty acids esterification in the same bacteria (Kalscheuer et al. 2006). This concept was the basis for a pilot-scale microdiesel production process development (Elbahloul and Steinbüchel 2010). In this study, using oleic acid and glucose as carbon source, densities up to 61 g of cell dry mass per liter and a biodiesel content of 25% were reached. Therefore, the microdiesel process may save costs for substrates such as oil and alcohol (Uthoff et al. 2009) and should therefore be further investigated as a new alterative process with industrial application.

Yeast There are several reports of different yeast species able to accumulate lipids, such as *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcuscurvatus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulan*, and *Yarrowia lipolytica*, which can accumulate lipid content ranging from 25% to 70% (Li et al. 2008a; Meng et al. 2009). The most commonly produced lipids are triglycerides, including a fraction of saturated fatty acids (Meng et al. 2009).

Oil accumulation depends on the culture conditions such as C/N ratio, nitrogen source, temperature, pH, oxygen, and inorganic salts concentration (Li et al. 2008a). Higher C/N ratio (Hassan et al. 1996) and organic nitrogen sources have

been shown to favor oil accumulation (Huang et al. 2010). In addition, efforts to reduce oil production costs have involved integrating wastewater treatment and oil production using *R. glutinis*, adding monosodium glutamate wastewater as the organic carbon source, obtaining 20% oil accumulation and 45% chemical oxygen demand degradation (Xue et al. 2008).

Fungi There are reports of different fungi species, which are able to accumulate lipids such as *Aspergillus oryzae*, *Mortierella isabellina*, *Humicola lanuginosa*, *Mortierella vinacea*, and *Mucor circinelloides*, but there are few reports on the utilization of these fungi for biodiesel production (Li et al. 2008a). These fungi have mainly been explored for the production of special lipids such as docosahexaenoic acid, γ-linolenic acid, eicosapentaenoic acid, and arachidonic acid (Li et al. 2008a; Papanikolaou et al. 2004).

Vicente et al. (2009) studied the filamentous fungi *M. circinelloides* as potential feedstocks for biodiesel production, as it can accumulate around 25% of lipids using a wide range of carbon sources, even in large-scale growth.

According to Vicente et al. (2009), unlike microalgae, microorganisms such as bacteria, yeast, and fungi can be grown in conventional bioreactors, which improve biomass yield and reduce biomass and oil production costs. Table 2 provides a comparison of different SCO used as raw material for biodiesel production.

Biocatalysis

Biocatalysis for biodiesel production using edible oils

Although lipases are generally used for catalyzing the hydrolysis of carboxylic esters, they are also applied in a wide range of bioconversion reactions including esterification and transesterification (Noureddini et al. 2005; Orcaire et al. 2006). Biocatalysts investigated in biodiesel production can be classified as free (liquid lipases), immobilized extracellular lipases, and whole-cell biocatalysts (Du et al. 2008; Röttig et al. 2010). The use of free enzymes on an industrial scale is debatable, as their performance may present low yields and high costs since they are not reusable. On the other hand, the use of immobilized enzymes presents advantages such as stability and reusability compared with free lipases (Uthoff et al. 2009). In addition, as the use of extracellular lipases requires complex recovery, purification, and immobilization processes, using whole-cell biocatalysts in biodiesel production has been also studied (Du et al. 2008; Röttig et al. 2010).

Several investigations have been carried out with edible oils using free, immobilized, and whole-cell biocatalysts (Table 3). Noureddini et al. (2005) described a screening for free lipases and found that Lipase PS provides the best catalytic activity for soybean oil transesterification. Using 2.5 wt.% of Lipase PS, a FAME production yield of about 35% was obtained, while other lipases did not surpass a FAME production yield of 5%. These results were similar to those of earlier research carried out by Kaieda et al. (2001), reporting that Lipase PS exhibited a higher methanol resistance and higher FAME production yield even with low water content, reaching a FAME conversion yield of about 32% in the absence of water.

Du et al. (2005) carried out a study with Lipozyme TL. This lipase has a strict 1,3-positional specificity; therefore, a theoretical biodiesel production yield of only 66% may be expected. However, a biodiesel production yield of over 90% was obtained in this study, which was believed to be due to acyl migration during the reaction process. In fact, in that research, the lipase immobilizing material—silica gel—was determined to be the responsible factor for acyl migration acceleration. This is due to the lipophilic nature of the immobilizing material, which creates a lipophilic microenvironment that interacts with the lipase (Noureddini et al. 2005). This suggests that immobilized lipase activity is higher than free lipase activity because its sites became more exposed and effective. *Candida* sp. 99–125 lipase was immobilized in a textile membrane to demonstrate its behavior as a catalyst of the transesterification reaction of salad oil in a solvent system (Nie et al. 2006). A FAME conversion yield of 90% with *n*-hexane as co-solvent and the feasibility of reusing the enzymes up to 10 times provided evidence of the advantages of using immobilized enzymes.

Novozym 435 has been the most commonly investigated enzymatic catalyst for transesterification processes, reaching high FAME production yield (Table 3). In a kinetic study, a maximum conversion from soybean oil to FAME was reached in a semibatch reactor, using a sequential addition of less than stoichiometric quantities of ethanol at 25°C, 50 wt.% of Novozym 435, and an ethanol/oil molar ratio 20.6:1 (Pessoa et al. 2010). In addition, Xu et al. (2006a) reached an 85% FAME conversion yield over 18 h of reaction time, while Royon et al. (2007) obtained a methanolysis yield of 97% after 24 h at 50°C with Novozym 435 in the presence of *tert*-butanol.

Rhizopus oryzae IFO4697 cells producing a 1,3-positional specificity lipase have been also investigated as biocatalysts for FAME production (Ban et al. 2002; Ban et al. 2001; Hama et al. 2006, 2007; Li et al. 2007a, b; Oda et al. 2005; Zeng et al. 2006). To examine the effects of carbon source type and methanolysis activity on *R. oryzae* cell growth, glucose and different oils were tested for cell cultivation. Cells expressed methanolysis activity only with oils, showing that oils can act as a carbon source as well as inducers for lipase production (Zeng et al. 2006).

Table 2 Single cell oil comparison as feedstocks for biodiesel production

Microorganisms	Lipid content (% dry wt.)	Main lipid composition	Advantages	Disadvantages	References
Microalgae	20–70	Fatty acid Free fatty acid Hydrocarbon Unusual lipid	High lipid accumulation yield Some species can produce hydrocarbons directly Possibility of heterotrophic growth Convert carbon dioxide to potential biofuel Can provide several different types of renewable biofuels, including methane produced by anaerobic digestion of the algal biomass	Expensive, complicated scale-up Necessity of light Low growth rate	(Chisti 2007, 2008; Li et al. 2008a; Papanikolaou et al. 2004)
Bacteria	18–70	Free fatty acid Unusual lipid Wax esters Triacylglycerides Polyhydroxyalkanoates	High growth rate Easy culture method Relatively easy-to-use biological engineering technology, genetic engineering, and metabolic engineering to modify bacteria performance to improve oil accumulation Can be grown in conventional bioreactor	Production of complex lipid Few species able to accumulate triacylglycerides	(Li et al. 2008a; Lu et al. 2008; Meng et al. 2009)
Yeast	25–70	Triglycerides Free fatty acid	High growth rate High lipid accumulation Easy culture method Can be grown in conventional bioreactor	Need organic carbon sources	(Li et al. 2008a; Meng et al. 2009; Xue et al. 2008)
Fungi	25	Unusual lipid Fatty acid	High growth rate Easy culture method Can be grown in conventional bioreactor	Need organic carbon sources	(Li et al. 2008a; Meng et al. 2009; Papanikolaou et al. 2004; Vicente et al. 2009)

Table 3 Effective transesterification process using free, immobilized lipases, and whole-cell processes with edible oils

Biocatalyst		Oil from	Operation conditions						FAAE (%)	References
			Molar ratio Methanol/oil	Catalyst (wt.%)	*T* (°C)	*t* (h)	Stir (rpm)	Other conditions		
Free	Lipase PS	Soybean	7.5:1	4.8	35	1	700	0.5 g water	35	(Noureddini et al. 2005)
	Lipozyme TL	Soybean	3:1	10	40	72	150	SAA	63	(Du et al. 2005)
Immobilized	Lipozyme TL	Soybean	3:1	4	40	30	150	Im. in silica gel. SAA	90	(Du et al. 2005)
	Lipase PS	Soybean	7.5:1	33[a]	35	1	700	Hydrophobic sol–gel support. 0.5 g water	67	(Noureddini et al. 2005)
	Candida sp. 99–125 lipase	Salad oil	3:1	10,000 U	40	10	180	Petroleum ether as solvent- SAA	95	(Nie et al. 2006)
	Novozym 435	Sunflower	Ethanol 20.6:1	50	25	4	–	Semibatch reactor SAA	90	(Pessoa et al. 2010)
		Soybean	Ethanol 14.4:1	50	25	5	–	Semibatch reactor SAA	100	(Pessoa et al. 2010)
		Cotton	6:1	1.7	50	24	–	*Tert*-butanol	97	(Royon et al. 2007)
		Soybean Rapeseed	3:1	4	30	34	130	SAA	97	(Shimada et al. 2002)
	Mix[b]	Rapeseed	4:1	4	35	12	130	*Tert*-butanol	95	(Li et al. 2006)
Whole cell	*Rhizopus oryzae*	Soybean	5.2:1	12	35	24	130	3% water–*t*-butanol	72	(Li et al. 2007a)
	IFO 4697	Soybean	3:1	35 mL	35	72	150	0.1% (*v*/*v*) GA	70–83	(Ban et al. 2002)
	BPS	Soybean	3:1	5	30	72	150	SAA	86	(Zeng et al. 2006)
		Soybean	3:1	1.68 mg BPS	30	50	150	Packed bed reactor SAA	81–89	(Hama et al. 2006)
		Rapeseed	4:1	10	35	13	130	*Tert*-but/oil (*v*/*v*) 1.5:1	60	(Li et al. 2007b)

SAA stepwise alcohol addition, *GA* glutaraldehyde-treated cell, *BSP* biomass support particles

[a] 475 mg of free lipase immobilized in 3 g of gel

[b] Mix immobilized in acrylic resin: 3% Lipozyme TL IM+1% Novozym 435

To identify the role of lipase in methanolysis activity, lipase localization of *R. oryzae* cells was determined. *R. oryzae* produced two types of lipases with different molecular masses: 34 and 31 kDa (ROL 34 and ROL 31, respectively). ROL 34 was detected to be bound to the cell wall, whereas ROL 31 was bound to the cell membrane. When cells were cultivated with olive oil and oleic acid, the intracellular methanolysis activity correlated with the amounts of membrane-bound lipases, which suggests that ROL 31 (located in the membrane) plays a crucial role in the methanolysis activity of *R. oryzae* cells (Hama et al. 2006).

R. oryzae immobilized in biomass support particles (BPS) has been also studied. Ban et al. (2001) carried out methanolysis of soybean oil with BSP-immobilized *R. oryzae* cells, reaching 90% FAME yield, the same level as the processes using extracellular lipases. In addition, immobilized *R. oryzae* cells cultured in shake flasks in an airlift bioreactor were compared in regard to their activity in repeated use of soybean oil for methanolysis. FAME content dropped to around 60 wt.% using immobilized cells in a shake-flask bioreactor; however, it remained at over 80 wt.% using immobilized cells in an airlift reactor, after at least five reactions (Oda et al. 2005). Moreover, in recent studies, an airlift reactor system using *R. oryzae* immobilized within BPS was investigated, reaching FAME content over 90% in the first cycle and still around 80% after the tenth cycle (Hama et al. 2007).

These immobilized biocatalysts present advantages compared with alkaline catalysts, including an easier glycerol recovery and the avoidance of a FAME washing step. However, lipase cost and reaction times are significantly higher than those of alkaline catalysts. Extended operational time and activity loss problems are being studied, as enzyme cost is still a barrier to their use in biodiesel production at an industrial scale (Du et al. 2008). Nevertheless, as discussed in the previous chapter, the use of alternative raw materials is necessary. Thus, the primary interest should be on expanding research in the field of employing biocatalysts to promote the use of alternative raw materials.

Biocatalysts for biodiesel production using alternative raw materials

The transesterification process using jatropha oils and biocatalysts has been already studied (Shah and Gupta 2007; Tamalampudi et al. 2008) (Table 4). Shah and Gupta (2007) carried out a screening of commercially available lipases PS, *Pseudomonas cepacia* lipase; AK, *Pseudomonas fluorescens* lipase; M, *Mucor javanicus* lipase; AYS and *Candida rugosa* lipase to catalyze biodiesel production from jatropha oil. In this study, Lipase PS was found to result in the best reaction yield, reaching 98% FAME conversion in the presence of water (Shah and Gupta 2007). These results are in line with those obtained using edible oils (Kaieda et al. 2001; Noureddini et al. 2005; Salis et al. 2005). In another study, the activity of *R. oryzae* (ROL) immobilized onto BPS was compared with that of Novozym 435. The results showed that the presence of water in jatropha oil has a positive effect on the methanolysis rate when ROL was used as catalyst, whereas when Novozym was used, it had a negative effect on biodiesel production from this oil.

Most studies of transesterification with biocatalysis have compared the use of waste oil with non-edible oils (Table 4). Using *Thermomyces lanuginosus* lipases immobilized on a microporous polymer, 97% FAME content from edible sunflower oil was obtained, while only 90.2% FAME content was obtained from WFO (Dizge et al. 2009). The study authors concluded that this could be due to contaminants formed in WFO which affect the enzyme. On the other hand, a recent study has established that FAME production can be improved in a lipase-catalyzed process using WFO as feedstocks, which is largely due to its higher contents of monoacylglycerols, diacylglycerols, and FFA (in comparison with rapeseed oil), which are more available substrates for the enzymatic catalysis (Azócar et al. 2010; Royon et al. 2007). The diversity of these findings indicates that more investigation is needed to understand the mechanisms involved when WFO and biocatalysts are used in biodiesel production.

The use of other waste oils such as soapstock, soybean oil deodorizer distillate, and waste oil from activated bleaching earth (waste ABE) in the presence of biocatalysts have been also studied in FAME production, reaching yields of over 80% (Table 4). Sato et al. (2008) patented a process, which produces FAME via enzymatic catalysis using soapstock waste as feedstocks; the soapstock waste is generated by vegetable oil refineries during the alkali refining process for producing edible oils. This process is characterized by neutralization steps before and after the reaction.

Soluble lipase NS81006 and NS81020, produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus oryzae/Aspergillus niger*, have been also proposed as catalysts for FAME production using acid oil (a residual oil from vegetable oil refining) (Table 4) (Chen et al. 2008). The results indicate that enzyme concentration, temperature, methanol to oil molar ratio, and stirring rate were the most significant factors affecting FAME production yield. These factors are similar to the operational conditions investigated when edible oils are used as raw material in biodiesel production with biocatalysts.

Operational conditions in biodiesel production using biocatalysts

Operational conditions investigated for FAME production are similar when edible, non-edible, and waste oils are used

Table 4 Effective transesterification process using alternatives feedstocks and biocatalysis

Raw material		Biocatalyst	Operation conditions						FAAE (%)	References
			Molar ratio Methanol/oil	Catalyst (wt.%)	T (°C)	t (h)	Stir (rpm)	Other conditions		
Non-edible oil	Jatropha oil	ROL	3:1	4	30	60	150	SMA	80	(Tamalampudi et al. 2008)
		Novozym 435	3:1	4	30	90	150	SMA	76	(Tamalampudi et al. 2008)
		PS-D[a]	Ethanol 4:1	5	50	8	200	Water 5% (*w*/*w*)	98	(Shah and Gupta 2007)
Waste oil	WFO	Novozym 435	3.8:1	15	45	12	200	SMA	100	(Azócar et al. 2010)
		Novozym 435	25:1	10	50	4	150	–	89	(Maceiras et al. 2009)
		Candida sp. 99–125	1:1[b]	25	45	1.2 mL/min		Hexane and water	91	(Chen et al. 2009)
		T. lanuginosus[c]	6:1	1.1	65	24	250	Water 15% (*w*/*w*)	90	(Dizge et al. 2009)
		Novozym 435	4:1	4	40	12	200	*Tert*-butanol system	88	(Halim and Kamaruddin 2008)
		P. expansum	3:1	84 U/g oil	35	7	200	SMA–adsorbent and *t*-amyl alcohol	93	(Li et al. 2009)
	Soapstock	Novozym 435	Ethanol ~3:1	3	45	6 days	100	Neutralization of the reaction	85	(Sato et al. 2008)
		Lipase[d]	~8:1	61 U/g oil	28	8	600	SMA–water 10% (*w*/*w*)	89	(Chen et al. 2008)
	SODD	Lipozyme TL IM and Novozym 435	3.9:1	5	40	12	150	*Tert*-butanol system	94	(Wang et al. 2006a)
	Waste ABE	*C. cylindracea*	4:1	238 U/g oil	37	8	120	–	83	(Lara and Park 2004)
SCO	Microalgae oil	*Candida* sp. 99–125	3:1	30	38	12	180	–	98	(Xiong et al. 2008)

ROL whole cells of *Rhizopus oryzae*, *SMA* stepwise methanol addition, *SOOD* soybean oil deodorizer distillate, *ABE* activated bleaching earth

[a] *P. cepacia* lipase immobilized on celite

[b] Molar ratio was kept at 1:1 in a flux reactor

[c] Immobilized onto a microporous polymer

[d] Soluble lipase NS81006 and NS81020, produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus oryzae*/*Aspergillus niger* microorganism

(Tables 3 and 4). This could enable the production of FAME from mixed raw material, which has been demonstrated in a recent study (Azócar et al. 2010). The main variables involved are: temperature, alcohol type, lipase regeneration efficiency, oil moisture, and FFA concentration in raw oils.

Reaction temperature The solubility of alcohols in oil increases with temperature, promoting a faster transesterification reaction. Nevertheless, the optimum lipase activity is also temperature dependent, and a temperature that is too high will lead to enzyme denaturing (Nie et al. 2006). Using surface response methodology, Shieh et al. (2003) found the optimum temperature in the transesterification reaction using Lipozyme IM-77 at 36.5°C. With Candida sp. 99–125 immobilized on a textile membrane, the highest FAME production yield from salad oil was observed at 40°C (Nie et al. 2006). Using edible and waste oils, recent studies have determined the operational stability of Novozym 435 at 50°C (Azócar et al. 2010; Royon et al. 2007).

The thermostability of immobilized lipases may be attributed to the interaction between lipase and sol–gel support. The sol–gel support is a chemically inert and hydrophobic polymer, prepared by polycondensation of hydrolyzed tetramethoxysilane and *iso*-butyltrimethoxysilane. Lipase stability is therefore promoted by enzyme interactions with the polymer surface. Interactions such as hydrogen bonding and ionic forces are believed to be responsible for the enhanced thermostability of the immobilized lipases. Therefore, enzymatic catalysts used at high temperatures could increase transesterification yield and require shorter reaction times.

Alcohol type and solvent use Short-chain alcohols such as methanol could lead to enzyme inactivation (Ban et al. 2001; Du et al. 2004; Kaieda et al. 2001). The reason for this problem is the low solubility of alcohols in oil. Alcohols with carbon chain lengths higher than three completely dissolve in oil in a stoichiometric ratio, i.e., 3 mol of alcohol are dissolved in 1 mol of oil. However, the solubility of the methanol/oil system is only 1.5:1 and 2:1 mol/mol for the ethanol/oil mixture (Shimada et al. 2002).

An excess amount of alcohol is usually utilized to carry out the transesterification process. This excess can inactivate lipases through contact of the enzyme with insoluble methanol or ethanol, existing as drops in the oil phase (Shimada et al. 2002). In addition, enzymes are generally unstable and can be denatured by short-chain alcohols (Ban et al. 2002). Several alternatives have been proposed to solve this inhibition problem: the stepwise addition of alcohol, the use of organic solvents, and the use of long-chain and secondary alcohols.

Methanolysis has been carried out through three successive additions of 1 mol of methanol (1/3 M equivalent per addition), until reaching the stoichiometric amount. This alternative is called *three-step protocol or stepwise addition* (Azócar et al. 2010; Du et al. 2004; Nie et al. 2006; Shimada et al. 2002; Zeng et al. 2006). Shimada et al. (2002) applied three consecutive additions of 1/3 M equivalent of methanol during 48 h of reaction time, using 4 wt.% of Novozym 435. The FAME production yield was 97.3%. However, as methanol solubility in FAME is higher than in TG, a new study was carried out using a two-step reaction (Azócar et al. 2010). The first step was started with a 1/3 M equivalent, and the second step was at 8 h of reaction time with 2/3 M equivalent, reaching a FAME production yield of 100% in 12 h of reaction time when WFO was used as raw material (Azócar et al. 2010).

Solvents in enzymatic alcoholysis such as petroleum ether, *n*-hexane, and *n*-heptane have enabled a high FAME production yield (of about 90%) (Nie et al. 2006). However, methanol and glycerol solubility are low in these relatively hydrophobic solvents, and therefore, there may be negative effects on lipase activity and stability (Royon et al. 2007). *Tert*-butanol has also been used as a reaction medium in FAME production with different raw materials because both methanol and oil are soluble in this solvent (Halim and Kamaruddin 2008; Li et al. 2006, Li et al. 2008b; Royon et al. 2007; Wang et al. 2006a) (Tables 3 and 4). Li et al. (2006) reached a biodiesel production yield of 95% in 12 h of reaction using a *tert*-butanol/oil volume ratio of 1:1. Royon et al. (2007) obtained a 97% conversion in 24 h with 35% *tert*-butanol. The use of *tert*-butanol as a solvent presents several advantages, as it is non-toxic and a lower enzyme dosage is needed. However, disadvantages such as solvent recovery, additional energy cost, and possible explosion risks need to be considered (Shimada et al. 2002).

Different acyl acceptors such as long-chain and secondary alcohols have been also studied (Fjerbaek et al. 2009). Du et al. (2004) obtained a conversion yield of 92% in 14 h reaction time with methyl acetate (CH_3COOCH_3) as a new acyl acceptor, producing triacetylglycerol (a chemical compound with a higher commercial value than glycerol) as a by-product. In spite of these acyl acceptor options, which can avoid lipase inhibition, because acyl acceptors must be economical and available in large quantities, only methanol and ethanol are realistic options for industrial production of biodiesel (Fjerbaek et al. 2009).

Lipase activity loss and regeneration Lipase activity loss can be caused by short-chain alcohols and glycerol (Du et al. 2008). In a study on continuous methanolysis using immobilized lipase from *Candida antarctica*, Shimada et al. (2002) suggested that non-reactive methanol migrates from

the reaction mixture to the glycerol layer, covering the immobilized lipase particles and resulting in lipase inactivation because of the high concentration of methanol in the glycerol layer.

To solve this problem, the use of methyl acetate has been proposed, as it does not produce glycerol in the reaction (Du et al. 2004). Moreover, a lipase wash with an organic solvent such with acetone after reaction has been proposed for glycerol removal (Xu et al. 2006a). Chen and Wu (2003) investigated Novozym 435 activity loss and regeneration. In that study, the authors proposed that the immobilization material (acrylic resin) could adsorb polar components such as methanol or ethanol, provoking enzyme inactivation. In addition, they established that immobilized lipase activity could be enhanced by 56% and 75% of its original activity, using alcohols such as 2-butanol or *tert*-butanol in an immersion pretreatment of the enzyme (Chen and Wu 2003).

Lipase activity loss in whole-cell catalysts has been also studied. Activity loss could be caused by glycerol and FAME accumulation inside the cell (Li et al. 2007a). In addition, methanol can produce an irreversible inactivation of lipase due to enzyme denaturalization. Therefore, several approaches have been proposed to maintain *R. oryzae* cell activity. Stepwise addition of methanol has been recommended to minimize the negative effects on the activity of *R. oryzae* whole cell (Ban et al. 2001). Methanolysis with *R. oryzae* whole cell in a *tert*-butanol system also exhibited acceptable stability. In fact, after ten reaction batches, FAME production yield was maintained at about 90% of the initial conversion yield (Li et al. 2007a). Glutaraldehyde (GA) treatment is another alternative for avoiding *R. oryzae* activity loss in transesterification reaction. Transesterification yield using cells treated with 0.1% GA solution ranged from 70% to 83% of ME production after six batch cycles (Ban et al. 2002).

A *tert*-butanol system has been proposed also to maintain the effective transesterification in successive cycles when reusing the biocatalyst (Halim and Kamaruddin 2008; Li et al. 2006; Li et al. 2008b; Royon et al. 2007; Wang et al. 2006a). Wang et al. (2006a) used soybean oil deodorizer distillate as a raw material and carried out the transesterificaction reaction in a *tert*-butanol medium, detecting no obvious loss in FAME yield even after 120 cycles of lipase reuse (Table 4).

Water and FFA effect FFA from alternative raw materials can be esterified by lipases producing FAME. However, the esterification of 1 mol of FFA generates 1 mol of water as a by-product. High water content (about 10%) will favor hydrolysis, whereas low water concentration will favor esterification (Nie et al. 2006). This means that hydrolysis could be promoted in reactions with waste oils, transforming oil to FFA. Later, after hydrolysis, FFA can be transformed into FAME by esterification.

Enzyme activity in a non-aqueous medium could be positively affected by water presence. To study the effect of the amount of water present in the reaction mixture on methanolysis, a study was carried out varying the water content from 0% to 40% (by weight of oil) (Nie et al. 2006). FAME production increased until the water content reached 10–15%, and decreased thereafter. In another study, the transesterification of acidified rapeseed oil with whole-cell *R. oryzae* immobilized in *tert*-butanol system was investigated (Li et al. 2007b). It was found that increased FFA content in oil increased both the reaction rate and FAME yield. Moreover, 3% water content presented the highest ME yield in whole-cell mediated methanolysis of rapeseed oil for biodiesel production.

It has been established that most lipases need an optimal amount of water to maintain their activity in organic media. However, a recent study established that Novozym 435 itself appears to contain sufficient water to preserve its catalytic activity without requiring the presence of an oil/water interface (Halim and Kamaruddin 2008). In that study, FAME yield from WCO was lower than the yield from refined palm oil. It was observed that WCO has slightly higher water content compared with the used edible oil, promoting the hydrolysis of the substrate and thus decreasing the transesterification yield. Therefore, because optimal water activity for the enzymatic transesterification reaction system includes substrates, enzymes, solvent, and carrier material, the water content must be evaluated for each lipase in regard to optimal yield and stability (Fjerbaek et al. 2009).

Future trends in biodiesel production

In order to improve the economical feasibility of FAME production, new feedstocks have been investigated to avoid the use of edible oils. These alternative feedstocks are mostly characterized by high FFA content; therefore, biotechnological processes are a feasible option for producing FAME from these kinds of oils. The new feedstocks can be grouped into three categories: non-edible oils, waste lipids, and oleaginous microorganisms known as single cell oils. The use of WFO alone could supply the worldwide demand for oil for FAME production in the current year. Oils from jatropha, pongamia, and rubber seed are the most feasible non-edible oil alternatives proposed. In addition, although microalgae have been largely defunded as an oil source for FAME production, yeast, fungi, and bacteria are promising alternatives. Yeasts fungi and bacteria can be grown in conventional bioreactors, which improve biomass yield and reduce biomass and microbial oil production costs

In addition, microdiesel is a promising process that should be further investigated for a possible scale-up.

To date, the feasible alternatives proposed for producing FAME by means of biotechnological processes use edible oils and waste lipids, reaching high production yields close to those established by the current legislation, under similar operation conditions. Due to the higher availability of these non-edible oils, and because FAME can be produced from them using biotechnological processes, they clearly represent an economically feasible alternative to edible oils.

Acknowledgements This work was supported by the Chilean PBCT-CONICYT project TPI-16, FONDECYT project 1090382, and CONICYT project 79090009.

References

Altiparmak D, Keskin A, Koca A, Gürü M (2007) Alternative fuel properties of tall oil fatty acid methyl ester–diesel fuel blends. Bioresour Technol 98:241–246

Alvarez H, Steinbüchel A (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 60:367–376

Alvarez H, Kalscheuer R, Steinbüchel A (2000) Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. Appl Microbiol Biotechnol 54:218–223

Azócar L, Ciudad G, Heipieper HJ, Muñoz R, Navia R (2010) Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. J Biosci Bioeng 109:609–614

Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H (2001) Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochem Eng J 8:39–43

Ban K, Hama S, Nishizuka K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Noda H, Fukuda H (2002) Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. J Mol Catal B: Enzym 17:157–165

Barnwal B, Sharma M (2005) Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renew Sust Energ Rev 9:363–378

Beal R (1975) Feed additive for poultry from soybean oil soapstocks. US Pat Appl 3916031. Filed 31 Jan 1973

Campbell C (2006) The Rimini protocol an oil depletion protocol: heading off economic chaos and political conflict during the second half of the age of oil. Energ Policy 34:1319–1325

Canakci M (2007) The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. Bioresour Technol 98:183–190

Carraretto C, Macor A, Mirandola A, Stoppato A, Tonon S (2004) Biodiesel as alternative fuel: experimental analysis and energetic evaluations. Energy 29:2195–2211

Chen J, Wu W (2003) Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. J Biosci Bioeng 95:466–469

Chen X, Du W, Liu D (2008) Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. Biochem Eng J 40:423–429

Chen Y, Xiao B, Chang J, Fu Y, Lv P, Wang X (2009) Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energ Convers Manage 50:668–673

Chhetri A, Tango M, Budge S, Watts K, Islam M (2008) Non-edible plant oils as new sources for biodiesel production. Int J Mol Sci 9:169–180

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 25:294–306

Chisti Y (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnol 26:126–131

Demirbas A (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Prog Energ Combust 31:466–487

Demirbas A (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energ Convers Manage 50:14–34

Dizge N, Aydiner C, Imer DY, Bayramoglu M, Tanriseven A, Keskinlera B (2009) Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. Bioresour Technol 100:1983–1991

Dossin T, Reyniers M, Berger R, Marin G (2006) Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production. Appl Catal B-Environ 67:136–148

Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J (2004) Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. J Mol Catal B-Enzym 30:125–129

Du W, Xu Y, Liu D, Li Z (2005) Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. J Mol Catal B-Enzym 37:68–71

Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. Appl Microbiol Biotechnol 79:331–337

Elbahloul Y, Steinbüchel A (2010) Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered *Escherichia coli* strain harboring the p(Microdiesel) plasmid. Appl Environ Microb 76:4560–4565

Escobar J, Lora E, Venturini O, Yanez E, Castillo E, Almazan O (2009) Biofuels: Environment, technology and food security. Renew Sust Energ Rev 13:1275–1287

FAO (2009) Undernourishment around the world. The state of food in security in the world. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0876e/i0876e02.pdf. Accessed 4 June 2010

Felizardo P, Correia M, Raposo I, Mendes J, Berkemeier R, Bordado J (2006) Production of biodiesel from waste frying oil. Waste Manage 26:487–494

Fjerbaek L, Christensen K, Norddahl B (2009) A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnol Bioeng 102:1298–1315

Gui M, Lee K, Bhatia S (2008) Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. Energy 33:1646–1653

Gustone F (2009) Lipids as source of food and fuel—will there be enough? Dissertation, 2nd International Congress on Biodiesel: The Science and The Technologies Munich, Germany

Haas M (2005) Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. Fuel Process Technol 86:1087–1096

Halim S, Kamaruddin A (2008) Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a *tert*-butanol system. Process Biochem 43:1436–1439

Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, Miura K, Yamaji H, Kondo A, Fukuda H (2006) Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. J Biosci Bioeng 101:328–333

Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, Numata T, Tamalampudi S, Kondo A, Noda H, Fukuda H (2007) Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhyzopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochem Eng J 34:273–278

Hassan M, Blanc P, Granger L, Pareilleux A, Goma G (1996) Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by

Cryptococcus curvatus grown in batch and fed-batch culture. Process Biochem 31:355–361

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J 54:621–639

Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. Appl Energ 87:38–46

IEA (2009) Key world energy statistics. International Energy Agency. http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/key_stats_2009.pdf. Accessed 4 June 2010

Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H (2001) Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. J Biosci Bioeng 91:12–15

Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A (2006) Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. Microbiol 152:2529–2536

Kulkarni M, Dalai A (2006) Waste cooking oils an economical source for biodiesel: a review. Ind Eng Chem Res 45:2901–2913

Lara P, Park E (2004) Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. Enzyme Microb Tech 34:270–277

Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, Dhamelincourt P (1980) Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 19:1043–1051

Leman J (2009) Lipids Production. In: Schaechter M (ed) Encyclopedia of microbiology, 3rd edn. San Diego State University, California, pp 393–406

Leung D, Guo Y (2006) Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. Fuel Process Technol 87:883–890

Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z (2006) Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. J Mol Catal B-Enzym 43:58–62

Li W, Du W, Liu D (2007a) Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. J Mol Catal B-Enzym 45:122–127

Li W, Du W, Liu D (2007b) *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell-catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in *tert*-butanol System. Process Biochem 42:1481–1485

Li Q, Du W, Liu D (2008a) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl Microbiol Biot 80:749–756

Li W, Du W, Liu D, Yao Y (2008b) Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and *tert*-butanol system. Biochem Eng J 41:111–115

Li N, Zong M, Wu H (2009) Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. Process Biochem 44:685–688

Lu X, Vora H, Khosla C (2008) Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. Metab Eng 10:333–339

Maceiras R, Vega M, Costa C, Ramos P, Márquez M (2009) Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. Fuel 88:2130–2134

Marchetti J, Miguel V, Errazu A (2007) Possible methods for biodiesel production. Renew Sust Energ Rev 11:1300–1311

Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renew Energ 34:1–5

Metzger P, Largeau C, Casadevall E (1991) Lipids and macromolecular lipids of the hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii*. Chemical structure and biosynthesis. Geochemical and biotechnological importance. In: Herz W, Kirby GW, Steglich W, Tamm C (eds) Progress in the chemistry of organic natural products. Springer, Berlin, pp 1–70

Metzger P, Rager M, Fosse C (2008) Braunicetals: Acetals from condensation of macrocyclic aldehydes and terpene diols in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 69:2380–2386

Miao X, Wu Q (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour Technol 97:841–846

Nie K, Feng X, Fang W, Tianwei T (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. J Mol Catal B-Enzym 43:142–147

Noureddini H, Gao X, Philkana R (2005) Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technol 96:769–777

Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, Fukuda H (2005) Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. Biochem Eng J 23:45–51

Orcaire O, Buisson P, Pierre A (2006) Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. J Mol Catal B-Enzym 42:106–113

Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresour Technol 95:287–291

Parawira W (2009) Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalyzed transesterification: a review. Crit Rev Biotechnol 29:82–93

Pérez-Lombard L, Ortiz J, Pout C (2008) A review on buildings energy consumption information. Energ Buildings 40:394–398

Pessoa F, Magalhães S, Falcão P (2010) Production of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower and soybean oils: modeling. Appl Biochem Biotechnol 161:238–244

Posten C, Schaub G (2009) Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—a process view. J Biotechnol 142:64–69

Ramadhas A, Jayaraj S, Muraleedharan C (2005) Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. Fuel 84:335–340

Röttig A, Wenning L, Bröker D, Steinbüchel A (2010) Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. Appl Microbiol Biotechnol 85:1713–1733

Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S (2007) Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. Bioresour Technol 98:648–653

Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. J Biotechnol 119:291–299

Samorì C, Torri C, Samorì G, Fabbri D, Galletti P, Guerrini F, Pistocchi R, Tagliavini E (2010) Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. Bioresour Technol 101:3274–3279. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.068

Sarin R, Sharma M, Sinharay S, Malhotra R (2007) Jatropha–palm biodiesel blends: an optimum mix for Asia. Fuel 86:1365–1371

Sato S, Bueno De Almeida W, Araujo A (2008) Biodiesel production from soapstock. US Pat Appl 2008/0118961A1. Filed 09 Nov 2004

Scholz V, Nogueira da Silva J (2008) Review: prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. Biomass Bioenerg 32:95–100

Shah S, Gupta M (2007) Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. Process Biochem 42:409–414

Sharma Y, Singh B, Korstad J (2010) High yield and conversion of biodiesel from a nonedible feedstock (*Pongamia pinnata*). J Agr Food Chem 58:242–247

Shieh C, Liao H, Lee C (2003) Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Bioresour Technol 88:103–106

Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y (2002) Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. J Mol Catal B-Enzym 17:133–142

Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. J Appl Phycol 20:245–251

Sousa L, Lucena I, Fernandes F (2010) Transesterification of castor oil: effect of the acid value and neutralization of the oil with glycerol. Fuel Process Technol 91:194–196

Suehara K, Kawamoto Y, Fujii E, Kohda J, Nakano Y, Yano T (2005) Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. J Biosci Bioeng 100:437–442

Talukder M, Wu J, Van Nguyen T, Fen N, Melissa Y (2009) Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: comparison of methanolysis methods. J Mol Catal B-Enzym 60:106–112

Tamalampudi S, Talukder M, Hama S, Numata T, Kondo A, Fukuda H (2008) Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochem Eng J 39:185–189

US Census Bureau (2010) International Data Base, world population summary. http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.php. Accessed 6 June 2010

Uthoff S, Bröker D, Steinbüchel A (2009) Minireview: current state and perspectives of producing biodiesel-like compounds by biotechnology. Microb Biotechnol 2:551–565

Veljkovic V, Lakicevic S, Stamenkovic O, Todorovic Z, Lazic M (2006) Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. Fuel 85:2671–2675

Vicente G, Bautista L, Rodriguez R, Gutiérrez F, Sádaba I, Ruiz-Vázquez R, Torres-Martínez S, Garre V (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. Biochem Eng J 48:22–27

Wang L, Du W, Liu D, Li L, Dai N (2006a) Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system. J Mol Catal B-Enzym 43:29–32

Wang Y, Ou S, Liu P, Xue F, Tang S (2006b) Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil. J Mol Catal A-Chem 252:107–112

Wang Y, Ou S, Liu P, Zhang Z (2006c) Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. Energ Convers Manage 48:184–188

Xiong W, Li X, Xiang J, Wu Q (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Appl Microbiol Biot 78:29–36

Xu G, Zhang B, Liu S, Yue J (2006a) Study on immobilized lipase catalyzed transesterification reaction of tung oil. Agr Sci China 5:859–864

Xu H, Miao X, Wu Q (2006b) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. J Biotechnol 126:499–507

Xue F, Miao J, Zhang X, Luo H, Tan T (2008) Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using mono-sodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresour Technol 99:5923–5927

Zeng J, Du W, Liu X, Liu D, Dai L (2006) Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhyzopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. J Mol Catal B-Enzym 43:15–18

Zhang Y, Dube M, McLean D, Kates M (2003) Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. Bioresour Technology 89:1–16

Zheng S, Kates M, Dube M, McLean D (2006) Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. Biomass Bioenerg 30:267–272

Journal of Bioscience and Bioengineering
VOL. 109 No. 6, 609–614, 2010

ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/jbiosc

Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock

Laura Azócar,[1] Gustavo Ciudad,[1] Hermann J. Heipieper,[2] Robinson Muñoz,[1] and Rodrigo Navia[1,3,*]

Scientific and Technological Bio-resource Nucleus, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile[1] Department of Environmental Biotechnology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstr., 15, 04318 Leipzig, Germany[2] and Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile[3]

Received 18 August 2009; accepted 1 December 2009
Available online 24 December 2009

The application of waste frying oil (WFO) mixed with rapeseed oil as a feedstock for the effective production of fatty acid methyl esters (FAME) in a lipase-catalyzed process was investigated. The response surface methodology (RSM) was used to optimize the interaction of four variables: the percentage of WFO in the mixed feedstock, the methanol-to-oil ratio, the dosage of Novozym 435 as a catalyst and the temperature. Furthermore, the addition of methanol to the reaction mixture in a second step after 8 h was shown to effectively diminish enzyme inhibition. Using this technique, the model predicted the optimal conditions that would reach 100% FAME, including a methanol-to-oil molar ratio of 3.8:1, 100% (wt) WFO, 15% (wt) Novozym 435 and incubation at 44.5 °C for 12 h with agitation at 200 rpm, and verification experiments confirmed the validity of the model. According to the model, the addition of WFO increased FAME production yield, which is largely due to its higher contents of monoacylglycerols, diacylglycerols and free fatty acids (in comparison to rapeseed oil), which are more available substrates for the enzymatic catalysis. Therefore, the replacement of rapeseed oil with WFO in Novozym 435-catalyzed processes could diminish biodiesel production costs since it is a less expensive feedstock that increases the production yield and could be a potential alternative for FAME production on an industrial scale.

© 2009, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[**Key words:** Biodiesel; fatty acid methyl esters; lipase-catalyzed processes; waste frying oil; Novozym 435; rapeseed oil; response surface methodology]

Biodiesel or long chain fatty acid methyl esters (FAME) is a biofuel conventionally produced from edible vegetable oils through a transesterification reaction that uses methanol as an acyl acceptor and a homogeneous alkaline catalyst (1). Since 70–80% of the total FAME production cost corresponds to the vegetable oil, waste frying oils (WFO) have been proposed as a low cost alternative feedstock (2, 3). Although the WFO supply would not be sufficient to meet the FAME demand, FAME production from WFO-edible oil mixtures seems to be a viable option (4).

WFO are generated from vegetable oils used at high temperatures in food frying. This process causes hydrolysis, polymerization and oxidation reactions, changing the physicochemical characteristics of the oil (5). In addition, WFO is known for its high acid value due to the higher level of free fatty acids (FFA). Acid values higher than 1 mg KOH/g oil are typical of WFO and may cause undesirable saponification reactions when an alkaline catalyst is used in the transesterification reaction (1). The production of soap consumes the catalyst, diminishes FAME production yield and prevents the effective separation of the produced FAME from the glycerin phase (1).

Lipase-catalyzed processes avoid soap generation when WFO is used as a feedstock since FFA are directly esterified to produce FAME (6). Therefore, in lipase-catalyzed processes, glycerol can easily be recovered without additional steps for the removal of saponified products, neutralization and concentration of the FAME, which are typically required for the alkaline-catalyzed processes (6).

Several groups have investigated the use of lipases to produce FAME from edible oils (6–12). To avoid lipase inhibition by short chain alcohols, the stepwise addition of methanol has already been proposed (11). In order to improve lipase-catalyzed processes, different operational conditions, such as temperature, lipase dosage, stirring and methanol/oil molar ratio, with different lipases and edible oils have been investigated (6–10).

So far, only a few investigations on FAME production from WFO using lipases have been conducted. Using *Rhizopus oryzae* as the biocatalyst, FFA from a synthetic WFO were esterified to produce FAME with an improved reaction yield (13). In addition, using *Thermomyces lanuginosus* lipases immobilized on a microporous polymer, 97% FAME content from edible sunflower oil was reached, while only 90.2% FAME content was obtained from WFO (14). Watanabe et al. (15) tested the immobilized lipase Novozym 435 and obtained a 5.5% reduction in FAME conversion yield when using WFO compared to edible oil as the feedstock. They concluded that the oxidized fatty acid compounds in WFO may be responsible for this decrease.

* Corresponding author. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile. Tel.: +56 45 325477; fax: +56 45 325050.
E-mail addresses: lazocar@ufro.cl (L. Azócar), gciudad@ufro.cl (G. Ciudad), hermann.heipieper@ufz.de (H.J. Heipieper), rnavia@ufro.cl (R. Navia).

1389-1723/$ - see front matter © 2009, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jbiosc.2009.12.001

As the effects of using WFO in lipase-catalyzed processes are not clear and feedstock mixtures seem to be an interesting option, the use of WFO-edible oil mixtures as a feedstock for FAME production using an immobilized lipase (Novozym 435) has been investigated in this work.

The aim of this study was to elucidate the effect of WFO incorporation in feedstock mixed with rapeseed oil on FAME production yield using Novozym 435 as the catalyst by means of the response surface methodology (RSM). In addition, specific WFO and rapeseed oil characteristics were investigated to identify the properties that were responsible for these results. Finally, a preliminary study to establish the optimal time for methanol addition during the reaction was proposed.

MATERIALS AND METHODS

Materials Both filtered WFO collected from restaurants and crude rapeseed oil from a local factory from Southern Chile were used as the feedstock. *Candida antarctica* lipase immobilized on acrylic resin (Novozym 435) from Sigma-Aldrich was used as the catalyst. Methyl heptadecanoate, 1,2,3-butanetriol and 1,2,3-tricaprinoylglycerol were used as internal standards and were chromatographically pure. All other chemicals were of analytical grade.

Response surface methodology Response surface methodology (RSM) was used to analyze and optimize the interaction effects of four variables on FAME production yield (Table 1): the WFO content in the feedstock mixture (% wt), the final methanol-to-oil ratio (mol/mol), the temperature (°C) and the Novozym 435 dosage (% wt based on oil weight). A central composite matrix with 5 levels was used and 30 runs were carried out in a random order (Table 2). Each run was performed in triplicate.

All reactions were incubated in flasks containing 1 mL of oil at 200 rpm. The volume of the flasks was selected to maintain perfect agitation of the samples when using both the highest dosage of catalyst and the lowest methanol-to-oil molar ratio. Under these conditions, different combinations of feedstock mixture, dosage of catalyst, methanol-to-oil molar ratio and temperature were used according to Table 2. Methanol was added in two steps to avoid lipase inhibition using an adaptation of the methodology of Shimada et al. (11). In the first step, one-third of the total molar ratio was added according to Table 1, while in the second step, the remaining two-thirds of the total molar ratio was added according to Table 1 to generate the final methanol-to-oil molar ratio.

To establish the reaction and second methanol addition times, a preliminary study was performed. This experiment was carried out for 48 h using the RSM central point, with 50% (wt) WFO in a mixed feedstock, a methanol/oil molar ratio of 3:1 and 9% (wt) Novozym 435 at 45 °C and stirring 200 rpm.

Samples were immediately stored at 4 °C to stop the reaction. The upper layer was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) for FAME quantification.

Statistical analysis The experimental data obtained (Table 2) were fitted to a second-order polynomial equation. This equation describes the relationship between the predicted response variable (FAME production yield) and the independent variables (Table 1). The polynomial model for FAME yield may be written as follows (Eq. (1)):

$$\mathrm{FAME}_{\mathrm{yield}} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} X_i + 1 \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i<j=1}^{4} \beta_{ij} X_i X_j \qquad (1)$$

Where β (0 = intercept, i = linear, ii = quadratic and ij = interaction) and X_i, X_j ($i = 1, 4$; $j = 1, 4$; $i \neq j$ represent the coded independent variables) are the model coefficients. With the fitted quadratic polynomial equation, contour plots were developed to analyze the interaction between terms and their effects on FAME production yield.

Feedstock characterization To identify and quantify the fatty acids in the feedstock, GC-MS was utilized (see Analytical procedures section). Before injection into the GC-MS equipment, the WFO and rapeseed oil were methylated according to Araújo (5). Specific gravity was measured at 20 °C using a manual densimeter. Kinematic viscosity was measured at 40 °C using a capillary viscosimeter. The acid value was determined by titration with KOH using phenolphthalein as an indicator. The peroxide value was determined by titration with $Na_2S_2O_3$, and the iodine value was determined by the Wijs method (5).

TABLE 1. Variable and levels used in the surface response methodology.

Independent variables	Symbols	Levels				
		−2	−1	0	1	2
WFO in feedstock (wt%)	X_1	0	25	50	75	100
Methanol-to-oil ratio (mol/mol)	X_2	1.50	2.25	3.00	3.75	4.50
Temperature (°C)	X_3	35	40	45	50	55
Novozym 435 (wt%)	X_4	3	6	9	12	15

TABLE 2. Central composite design arrangement and responses.

Run	Variable levels				FAME production yield (%)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	Predicted	Experimental
	WFO	Methanol	Temperature	Novozym 435		
1	25	2.25	40	6	23.8	22.8
2	75	2.25	40	6	30.8	22.8
3	25	3.75	40	6	28.3	28.5
4	25	2.25	40	12	50.0	48.3
5	75	3.75	40	6	26.2	25.1
6	75	2.25	40	12	65.8	68.7
7	50	3.00	35	9	48.3	62.1
8	0	3.00	45	9	62.6	63.6
9	50	3.00	45	9	85.8	84.2
10	25	3.75	40	12	91.7	90.7
11	75	3.75	40	12	98.3	96.0
12	50	3.00	45	9	85.8	83.3
13	50	1.50	45	9	39.2	40.0
14	50	3.00	45	9	85.8	87.3
15	50	3.00	45	3	13.5	14.3
16	75	3.75	50	6	38.0	36.4
17	25	2.25	50	6	54.4	52.5
18	75	2.25	50	6	51.4	54.4
19	25	3.75	50	6	50.1	54.1
20	50	3.00	45	9	85.8	87.2
21	50	3.00	45	9	85.8	86.1
22	100	3.00	45	9	66.2	67.6
23	50	3.00	45	9	85.8	87.5
24	75	3.75	50	12	94.7	97.6
25	25	3.75	50	12	98.1	96.4
26	50	3.00	45	15	96.5	97.8
27	50	4.50	45	9	67.4	68.7
28	75	2.25	50	12	71.0	65.8
29	25	2.25	50	12	65.3	68.1
30	50	3.00	55	9	75.2	73.9

The following parameters were measured according to ASTM Standard Methods (16): water and sediments (ASTM Standard D 1976-97), pour point (ASTM Standard D 97-04), sulfur (ASTM Standard D 7039-04) and flash point (ASTM Standard D 56-02a).

The fatty acid contents of both the reaction input (in the feedstock) and output (after the FAME production reaction) were quantified to elucidate the possible effects of fatty acids on Novozym 435 activity. This experiment was carried out in triplicate using rapeseed oil as the feedstock, a methanol/oil molar ratio of 3:1 and 9% (wt) Novozym 435 at 45 °C and 200 rpm for 6, 8, 12, 24 and 48 h. Both the input and output fatty acid contents were analyzed and the data were subjected to Student's *t*-test to establish significant differences.

To establish the degree of oil conversion, monoacylglycerols (MG), diacylglycerols (DG), triacylglycerides (TG) and FFA in the oil feedstock were quantified by GC-MS (see Analytical procedures section).

Analytical procedures Identification and quantification of fatty acids in the feedstock and FAME quantification were carried out using a Clarus 600 chromatograph coupled to a Clarus 500T mass spectrometer from Perkin Elmer (GC-MS). An Elite-5ms capillary column with a length of 30 m, thickness of 0.1 µm and internal diameter of 0.25 mm was used. The vials were prepared by adding 3 µg of sample to 100 µL methyl heptadecanoate as an internal standard (initial concentration of 1300 mg/L). The following temperature program was used: 50 °C for 1 min and then increasing temperature at a rate of 1.1 °C/min up to 187 °C. Both the injector and detector temperatures were 250 °C and He was used as the carrier gas.

MG, DG and FFA in the feedstock were quantified using an HP 6890 series gas chromatography system (GC-MS) with an adaptation of the EN-14214 (17) methodology. TG was determined by mass balance. A 50-m long BPX-5 column with a thickness of 0.5 µm and an internal diameter of 0.32 mm was used. The vials were prepared by combining 10 mg of sample with 0.8 µL of 1,2,3-butanetriol and 10 µL of 1,2,3-tricaprinoylglycerol dissolved in pyridine as internal standards. 2,2,2-trifluoro-*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-acetamide (MSTFA) was added to the vials, which were then shaken and incubated for 15 min to transform the sample into more volatile sililade components. Subsequently, the preparation was dissolved in 0.8 mL of n-heptane. The following temperature program was used: 15 °C for 1 min and three consecutive ramps of 15 °C/min to 180 °C, 7 °C/min to 230 °C and 10 °C/min to 320 °C and 320 °C for 15 min. The detector temperature was 380 °C and a split rate 10 was used for injection of 1 µL of sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Methanol addition Methanol solubility is less than 1.5:1 methanol/oil (mol/mol), but a molar ratio of 3:1 methanol/oil is

necessary to complete the transesterification reaction for FAME production (11). However, very high initial concentrations of methanol could lead to the inhibition of the lipase used in this study due to its low solubility in oil (8, 11). Therefore, the experiment was designed so that the methanol was added in two steps (Fig. 1). The experiment was started with an initial concentration of one-third of the necessary moles of methanol. When about one-third of the oil was converted to FAME after 8 h, the remaining two-thirds of the methanol were added (Fig. 1). The addition of the higher concentration of methanol in the second step was determined based on Shimada et al. (11), who established that methanol is more soluble in FAME than in TG.

This two-step technique of methanol addition was shown to diminish the reaction time by obviously preventing enzyme inhibition. Li et al. (18) showed that in spite of the high yield reached using stepwise methanol addition, both the reaction time and rate of FAME conversion were slower. In experiments using a three-step methanol addition and 4% (wt) Novozym 435 as the catalyst, high FAME production yields were reached but only after 50 h of reaction (8, 15). Similarly, in another recent study, an incubation time of 50 h was also used (10). Usually, the second methanol addition starts after one-third (33.3%) of the FAME content has been generated and the initially added methanol has been completely consumed (8, 11). This methodology produces a stationary phase of FAME production yield, diminishing the reaction productivity.

As Novozym 435 was shown to be a robust and stable catalyst compared to other lipases in the presence of short chain alcohols (19), all of the experiments in this study were performed using this commercially available immobilized enzyme. When approximately 28.6% of the FAME content was reached after 8 h of reaction, the second aliquot of methanol was added. This stepwise addition of methanol increased the reaction productivity by avoiding the stationary production phase and led to a *plateau* in FAME production at 12 h. Similar reductions in the reaction time by shortening the stationary phase of FAME production have already been reported (18). Therefore, in the RSM experiments, the first amount of methanol (one-third of the molar ratio shown in Table 1) was added at the start of the reaction, while the second aliquot of methanol (two-thirds of the molar ratio shown in Table 1) was added after 8 h, and the total reaction time was 12 h.

Optimization of methanolysis conditions Four variables previously shown to have significant effects on FAME production yield were investigated. The methanol-to-oil ratio, temperature and Novozym 435 dosage were established based on previous studies in the literature (6, 8, 9). According to previous experiments (data not shown), the effect of the WFO content in the feedstock mixture was also tested in the lipase-catalyzed process. The experimental central composite design matrix is presented in Tables 1 and 2.

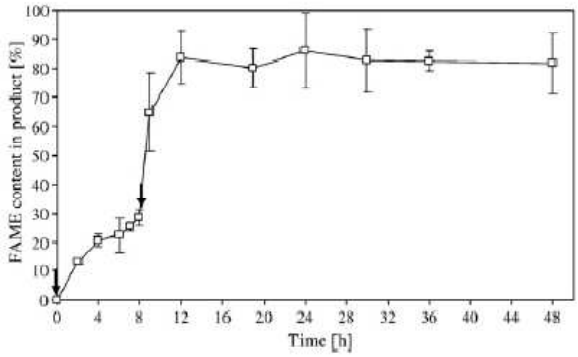

FIG. 1. FAME content in the product during the course of the reaction. Operational conditions: 50% (wt) WFO in the mixed feedstock, methanol-to-oil ratio of 3:1 (mol/mol), 9% (wt) Novozym 435 and 45 °C at 200 rpm. The arrow indicates the methanol addition.

TABLE 3. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial model.

Source	Sum of squares	df	Mean square	*F* value	*p*-value
Model	63749.8	14	4553.56	115.86	0.000*
Residual error	3144.0	80	39.30	–	–
Lack of fit	585.0	10	58.50	1.60	0.125
Pure error	2559.0	70	36.56	–	–
Total	66893.8	94	–	–	
$R^2 = 0.953$					
Adjusted $R^2 = 0.945$					

* Significant at 1% level.

Table 2 shows the minimum FAME production yield of 14% obtained for run 15, when the lowest percentage of catalyst was used (3% wt Novozym 435). It was recently reported that high FAME production yields may be reached using low enzyme concentrations, but these concentrations require long reaction times (about 50 h) (10). In the present investigation, the maximum FAME production yields reached the EN-14214 normative (17) (>96.5%) for runs 11 and 25.

To understand and optimize the relationship between the tested variables, the obtained experimental data (Table 2) were analyzed by second-order polynomial equations by means of the RSM. The analysis of variance (ANOVA) of the quadratic polynomial model showed low *p*-values and both high determination coefficients (R^2) and high adjustment of the determination coefficients (adjusted R^2) (Table 3). The low *p*-value obtained indicates that the model accurately represented the relationship between response and the variables. The R^2 value obtained indicates that the variation in FAME production yield correlated with 95.3% of the independent variables and the obtained adjusted R^2 value indicates a 94.5% correlation between the independent variables. The lack of fit refers to the fact that a simple linear regression model may not adequately fit the experimental data. Table 4 shows that the obtained *p*-value was 0.125 (>0.1), which does not indicate a significant lack of fit and, therefore, gave no reason to evaluate a more complex model.

The *p*-values obtained from the regression analysis results showed that all of the coefficients of the linear, interaction and quadratic terms had a significant effect on FAME production yield (Table 4). All of the linear and quadratic terms, as well as the interaction terms X_1X_3, X_2X_4 and X_3X_4, were significant at the 1% level. The interaction terms X_1X_2, X_1X_4 and X_2X_3 were significant at the 5% level. Therefore, the final response model equation in terms of the variable factors can be written as follows (Eq. (2)):

$$\begin{aligned} FAME_{yield} = & -896.52 + 1.90 \cdot X_1 + 91.40 \cdot X_2 + 28.06 \cdot X_3 \\ & + 20.00 \cdot X_4 - 0.01 \cdot X_1^2 - 14.46 \cdot X_2^2 - 0.24 \cdot X_3^2 \\ & - 0.85 \cdot X_4^2 - 0.12 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.02 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.03 \cdot X_1 \cdot X_4 \\ & - 0.59 \cdot X_2 \cdot X_3 + 4.13 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0.26 \cdot X_3 \cdot X_4 \end{aligned} \quad (2)$$

The main factors that affect the FAME production yield were the linear terms X_1, X_2, X_3 and X_4, the quadratic term X_2^2 and the interaction term X_2X_4. The linear terms with positive coefficients indicate an increase in FAME production yield (Table 4). As X_1 is a positive term, it is possible to establish that WFO incorporation could increase FAME production yield.

To validate the model, an experimental point was compared to the model prediction (Eq. (2)), and an error of less than 8% was obtained. In addition, the optimal methanolysis conditions were obtained through the regression model (Eq. (2)) according to the limit criterion of the maximum response of FAME production yield. The obtained optimal conditions were 100% (wt) WFO, a methanol-to-oil ratio of

TABLE 4. Results of regression analysis of a full second-order polynomial model for optimization of reaction conditions.

Term	Estimated coefficients	p-value
Intercept	−896.521	>0.001*
X_1	1.899	>0.001*
X_2	91.397	>0.001*
X_3	28.056	>0.001*
X_4	19.993	>0.001*
X_1X_1	−0.009	>0.001*
X_2X_2	−14.433	>0.001*
X_3X_3	−0.240	>0.001*
X_4X_4	−0.854	>0.001*
X_1X_2	−0.122	0.017**
X_1X_3	−0.020	0.008*
X_1X_4	0.029	0.022**
X_2X_3	−0.586	0.020**
X_2X_4	4.125	>0.001*
X_3X_4	−0.256	>0.001*

* Significant at 1% level.
** Significant at 5% level.

3.8:1 (mol/mol), 15% (wt) Novozym 435 and 44.5 °C, which generated 100% FAME production yield. These predicted conditions show that WFO incorporation increases FAME production yield.

Moreover, using this model, it was also possible to predict several optimal conditions to reach the highest FAME production yields while simultaneously reducing production costs and enzyme use. For instance, 96% FAME production yield could be reached using 75% (wt) WFO in the mixed feedstock, with a methanol-to-oil ratio of 3.75:1 (mol/mol), 12% (wt) Novozym 435 and 40 °C.

To illustrate that several optimal combinations are able to produce the highest FAME production yields, contour plots were generated. Figs. 2 and 3 show the effect of variable interaction on FAME production yield in contour plots predicted by the model. The contour plots were generated to show the effect of two variables on the response, while the other two independent variables were held constant.

Fig. 2 shows the interaction relationship between two independent variables (WFO in the mixed feedstock and Novozym 435 dosage) and their effects on the response variable FAME production yield, while the other two variables were held at zero. At these conditions, an increase in Novozym 435 dosage led to an enhancement in FAME production yield. This change is additionally increased when WFO is incorporated at up to 80% in the mixed feedstock. WFO seems to be a more available substrate compared to rapeseed oil for Novozym 435 catalysis under the conditions

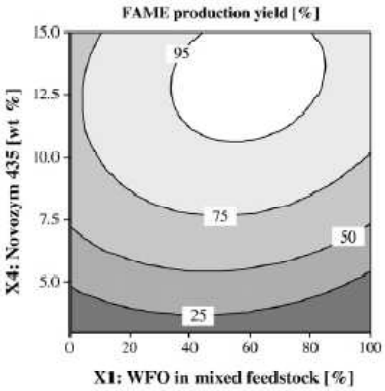

FIG. 2. Contour plot of FAME production yield predicted from the model at 45 °C and a methanol-to-oil ratio of 3:1 (mol/mol).

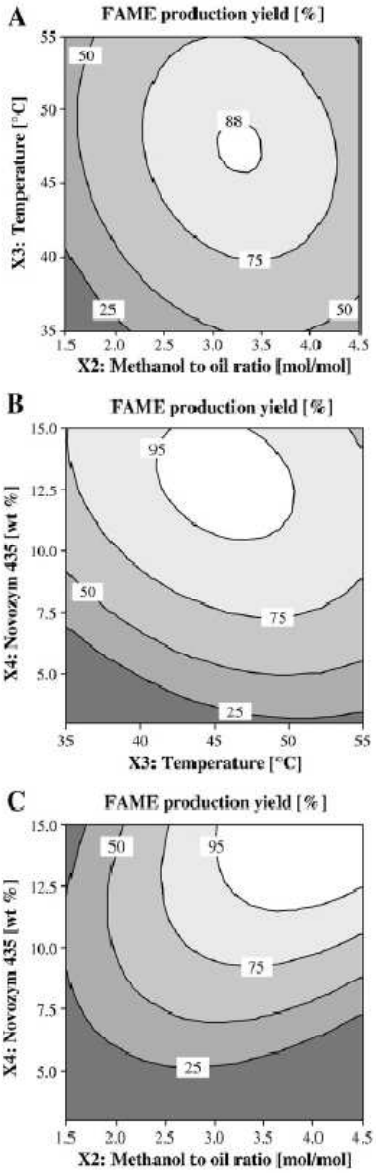

FIG. 3. Contour plots of FAME production yield predicted from the model for 50% (wt) WFO at (A) 9% (wt) Novozym 435, (B) a methanol-to-oil ratio of 3:1 (mol/mol) and (C) 45 °C

investigated. FAME production yield was more sensitive to Novozym 435 dosage, since high doses were necessary to obtain high FAME production yields. In this sense, in order to decrease the production costs for future economically sound industrial applications, further experiments should be conducted to investigate the effect of WFO incorporation using another inexpensive biologic catalyst instead of Novozym 435. In addition, because Novozym 435 has shown high residual activity in successive applications (19), further experiments with a subsequent recovery protocol and reuse of the immobilized catalyst should be conducted under the optimal conditions established in this work.

TABLE 5. Properties and composition of oil feedstocks.

	Feedstock	
	WFO	Rapeseed oil
Physiochemical properties		
Specific gravity (kg/m^3 at 20 °C)	925	927
Kinematic viscosity at 40 °C (cst)	37	34
Acid value (mg KOH/g)	4.5	0.8
Iodine value (g I_2/100 g oil)	111	105
Peroxide value (mEq/kg)	15.2	4.1
Water and sediments (%v/v)	1.3	< 0.01
S (mg/L)	2.0	7.0
Pour point (°C)	−6.7	−23.3
Flash point (°C)	>100	>100
Fatty acid composition (wt%)		
Palmitic (C16:0)	12.2	4.2
Stearic (C18:0)	4.1	1.3
Oleic (C18:1)	28.5	66.6
Linoleic (C18:2)	49.5	18.7
Linolenic (C18:3)	3.5	7.7
Arachidic (C20:0)	0.2	0.4
Eicosenic (C20:1)	0.1	1.0
Eicosapentaenoic (C20:5)	0.2	0.1
Erucic (C22:1)	0.0	0.1
Others	1.7	0.0
Acylglycerols and FFA composition (wt%)		
Monoacylglycerol	0.1	0.0
Diacylglycerol	3.3	0.5
Triacylglycerol	93.5	98.7
Free fatty acid	3.1	0.8

Samples were filtered before to the analysis.

Recently, Issariyakul et al. (4) investigated the use of mixed WFO and rapeseed oil using an alkaline catalyst. However, lower ester production yields were observed when WFO was incorporated in the reaction mixtures. These results agreed with Fukuda et al. (6), who established that the FFA in WFO can be completely converted to FAME using lipases as catalysts, whereas soap is produced when an alkaline catalyst is used, which diminishes the production yield. Although the cost of lipases is significantly higher than that of alkaline catalysts, their use may partially solve the main drawbacks of the conventional biodiesel production process: the use of pure vegetable oils (which account for around 80% of the cost of the total process) and the competition with food products (3). We have shown that the incorporation of WFO in the feedstock to partially replace rapeseed oil in processes catalyzed by Novozym 435 may diminish the production costs while simultaneously increasing the production yield, which makes it a potential alternative method for FAME production on an industrial scale.

FAME production yield was more sensitive to both the methanol-to-oil ratio and Novozym 435 dosage compared to temperature (Figs. 3A and B). FAME production yield was enhanced when the temperature increased to 45–50 °C; however, the opposite tendency was observed for temperatures higher than 50 °C. These results agree with the results obtained by Kose et al. (9), who established that at about 50 °C, FAME production yield decreases as a result of enzyme deactivation at high temperatures.

An enhancement in FAME production yield was observed when both the methanol-to-oil ratio and Novozym 435 dosage increased (Fig. 3C). When using a high immobilized biocatalyst load, large amounts of alcohol were needed to provide sufficient liquid to maintain a uniform suspension of the biocatalyst (19). In addition, as Novozym 435 is a robust biocatalyst in the presence of short chain alcohols, the excess alcohol kept the glycerol in solution, which prevented deactivation of Novozym 435 by glycerol blockage of the entrance to catalyst pores (19). Therefore, the levels of Novozym 435 used and the stepwise methanol addition seem to avoid the possible diffusion limitations, which resulted in high production yields.

Properties of feedstock that affect methanolysis optimization The feedstock characteristics were investigated to determine the properties responsible for the results obtained in the RSM, particularly the increase in the FAME yield when WFO was incorporated in the process (Table 5).

Differences were found in most of the physical properties of the oil feedstock measured (Table 5). The food frying process produced an increase in both acid and peroxide values from WFO due to the hydrolysis and oxidation reactions, respectively (5). The high peroxide value of the WFO could positively affect the FAME characteristics by increasing the oxygen content, which enhances its burning efficiency (20). However, a higher oxygen content in oils may also promote a higher nitrogen oxide concentrations during the burning process (20).

The analyzed WFO was originally an edible soybean oil and sunflower oil mixture, which is characterized by a typical iodine value of about 130 g I_2/100 g oil. As the iodine value is diminished by polymerization reactions during the frying process, a similar iodine value compared to rapeseed oil was found for WFO (Table 5). A lower iodine value increases the pour point and may also improve the oxidative stability of the oil (2). However, a high pour point can negatively affect FAME performance in an engine, when used at low temperatures. The kinematic viscosity of WFO was also measured and was slightly higher compared to rapeseed oil, probably as a result of polymerization reactions. As WFO is refined oil, the sulfur content was lower in WFO compared to rapeseed oil, which is an unrefined oil. In addition, a higher FFA content in WFO compared to rapeseed oil was observed, which may enhance FAME production yield using a biological catalyst, such as Novozym 435, through direct FFA esterification (13).

The FFA esterification reaction produces 1 mol of water per 1 mol of FAME produced. In this work, water and sediments were quantified and low levels were found in both rapeseed oil and WFO, with a slightly higher water and sediments content for WFO (Table 5). However, as WFO has a high FFA content, incorporation of WFO in the mixed feedstock may increase the water content through FFA esterification reactions. Although lipases need an optimal amount of water to maintain their activity in organic media, a recent work established that Novozym 435 itself appears to contain sufficient water to preserve its catalytic activity without requiring the presence of an oil/water interface (10). It has also been shown that Novozym 435 needs a nearly anhydrous reaction medium to be effective (21). According to these previous studies, when WFO was incorporated in a mixed feedstock, the reaction yield diminished as a result of the high water content. Therefore, an improvement in FAME production yield when WFO is incorporated into a feedstock should not be produced due to the presence of water in the transesterification reaction.

Differences between the fatty acid compositions of WFO and rapeseed oil were also detected (Table 5). In order to analyze the role of fatty acids in FAME production, the input and output fatty acid

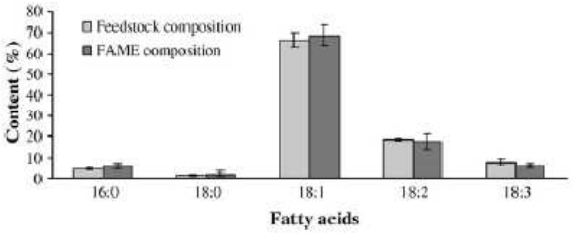

FIG. 4. Input and output fatty acid compositions (without significant differences using Student's *t*-test with $P<0.05$). Operational conditions: 0% WFO in the mixed feedstock, a methanol-to-oil ratio of 3:1 (mol/mol), 9% (wt) Novozym 435 and 45 °C at 200 rpm.

compositions were compared (Fig. 4). Substrate inhibition involving the esterification of FFA has been extensively reported, whereas substrate inhibition during transesterification of vegetable oils has been only recently investigated (7). In this study, no significant differences between input and output fatty acid composition were detected. Therefore, different fatty acid compositions of the feedstocks should not have a significant effect on FAME production yield. These results agree with those of Al Zuhair et al. (7), who established that fatty acids in palm oil and in palm oil methyl esters remained almost constant using lipases as catalysts.

Products from oil conversion, i.e., MG, DG, TG and FFA, in the used feedstock were compared using GC-MS. MG, DG and FFA account for about 6.5% of the WFO composition compared to only 1.3% in the case of rapeseed oil (Table 5). Turkan and Kalay (12) established that in Novozym 435-catalyzed transesterification, the first step (i.e., conversion of TG to DG) is the rate-determining step, since TG is converted to FAME without significant accumulation of MG and DG. This fact indicates that MG, DG and FFA can be more easily converted to FAME compared to TG. Therefore, WFO is a more available substrate in the process investigated, compared to rapeseed oil, and incorporation of WFO in feedstock increased the FAME production yield.

Conclusions According to the RSM, the optimized predicted combination of conditions to obtain 100% FAME production yield was the use of 100% (wt) WFO, a methanol-to-oil ratio of 3.8:1 (mol/mol), 15% (wt) Novozym 435 and 44.5 °C at 200 rpm. Methanol addition in two steps was previously optimized. An earlier second addition of methanol after 8 h of reaction time was an effective technique to decrease the total reaction time to 12 h while preventing enzyme inhibition. The model obtained from the RSM predicted that several optimal conditions were able to reach the highest FAME production yield. According to this model, the addition of WFO increased the FAME production yield, and this effect was mainly attributed to the higher contents of monoacylglycerols, diacylglycerols and free fatty acids of WFO compared to rapeseed oil, which are more available substrates for enzymatic catalysis. Therefore, a partial replacement of rapeseed oil by WFO in processes catalyzed by Novozym 435 may diminish the cost of biodiesel production by using a less expensive feedstock that simultaneously increases the production yield, and this method is a potential alternative for FAME production on an industrial scale. In addition, further experiments should be conducted to investigate the effect of WFO incorporation using other inexpensive biological catalysts, while Novozym reuse should investigated under the optimal conditions established in this work.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Chilean PBCT-CONICYT project TPI-16, the Chilean FONDEF Project D05I10391 and the Chilean FONDECYT Projects 3080021 and 1090382.

References

1. **Freedman, B., Butterfield, R., and Pryde, E.:** Transesterification kinetics of soybean oil, J. Am. Oil Chem. Soc., **63**, 1375–1380 (1986).
2. **Canakci, M.:** The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks, Bioresour. Technol., **98**, 183–190 (2007).
3. **Gui, M. M., Lee, K. T., and Bhatia, S.:** Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock, Energy, **33**, 1646–1653 (2008).
4. **Issariyakul, T., Kulkarni, M. G., Meher, L. C., Dalai, A. K., and Bakhshi, N. N.:** Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil, Chem. Eng. J., **140**, 77–85 (2008).
5. **Araújo, J.:** Oxidação de Lipidios, in: Imprensa Universitária (Ed.), Química de alimentos, Teoría e prática, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, 1995, pp. 1–64 (1995).
6. **Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H.:** REVIEW biodiesel fuel production by transesterification of oils, J. Biosci. Bioeng., **92**, 405–416 (2001).
7. **Al-Zuhair, S., Wei, F., and Jun, L.:** Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase, Process Biochem., **42**, 951–960 (2007).
8. **Du, W., Xu, Y., Liu, D., and Zeng, J.:** Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, J. Mol. Catal. B: Enzym., **30**, 125–129 (2004).
9. **Kose, O., Tuter, M., and Aksoy, H.:** Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium, Bioresour. Technol., **83**, 125–129 (2002).
10. **Ognjanovic, N., Bezbradica, D., and Knezevic-Jugovic, Z.:** Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability, Bioresour. Technol., **100**, 5146–5154 (2009).
11. **Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.:** Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, J. Mol. Catal. B: Enzym., **17**, 133–142 (2002).
12. **Turkan, A. and Kalay, S.:** Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanisms of lipases, J. Chromatogr. A, **1127**, 34–44 (2006).
13. **Li, W. and Du, W.:** D.: *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell-catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system, Process Biochem., **42**, 1481–1485 (2007).
14. **Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., and Keskinlera, B.:** Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer, Bioresour. Technol., **100**, 1983–1991 (2009).
15. **Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.:** Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor, J. Am. Oil Chem. Soc., **78**, 703–707 (2001).
16. **American Society for Testing and Materials (ASTM):** Annual Book of ASTM Standards: Section 5—Petroleum Products, Lubricants, and Fossil Fuels, ASTM International, West Conshohocken, 2008.
17. **The British Standards Institution:** BS EN 14214:2003. Automotive Fuels. Fatty Acid Methylesters (FAME) for Diesel Engines. Requirements and Test Methods, BSI, London, 2003.
18. **Li, N., Zong, M., and Wu, H.:** Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*, Process Biochem., **44**, 685–688 (2009).
19. **Hernandez-Martin, E. and Otero, C.:** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM, Bioresour. Technol., **99**, 277–286 (2008).
20. **Lin, C. and Lin, H.:** Engine performance and emission characteristics of a three-phase emulsion of biodiesel produced by peroxidation, Fuel Process. Tech., **88**, 35–41 (2007).
21. **Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V.:** Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis, J. Biotechnol., **119**, 291–299 (2005).

ANEXO 2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

A2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

La metodología analítica utilizada incluyó la metodología para biodiesel EN-14214, la metodología de Araújo, 1996, los procedimientos estándar de empresas COPEC para análisis de combustibles y de acuerdo a ASTM *Standard Methods* (ASTM 2008).

A2.1 Cuantificación e identificación de ácidos grasos (Adaptado de EN-14214)

Principio del método:

Determinación del porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en la muestra y de su concentración, mediante cromatografía en fase gaseosa utilizando calibración interna.

Reactivos:

- Metil ester de ácido heptadecanoico pureza para cromatografía (C17:0).
- *n*-hexano o *n*-heptano.

Materiales y equipos:

- Cromatógrafo de gases Clarus 600, acoplado a un espectrómetro de masa Clarus 500T de Perkin Elmer (GC/MS).
- Columna capilar Elite 5-MS (95 % difenil-5 % dimetil) o equivalente, de 30 m de largo, 0,1 µm de espesor y diámetro interno de 0,25 mm.
- Viales.

Procedimiento:

- Preparar como estándar interno metil heptadecanoato de concentración conocida utilizando n-heptano o *n*-hexano como solvente (aprox. 1000-2000 mg/L).
- Preparar la muestra en un vial pesando 3 mg de muestra y agregando 100 µL de estándar interno. Aforar con hexano a 500 µL.
- Inyectar 1 µL de muestra en el cromatógrafo de gases utilizando helio como gas carrier y el siguiente programa de temperatura: 50 °C por 1 minuto, calentado hasta 187 °C a una tasa de 1,1 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C.

Cálculos:

- Cálculo de la concentración de FAME en la muestra:

$$C_{FAME} = \frac{\left[\left(\sum A\right) - A_{EI}\right] \bullet C_{EI}}{A_{EI}} \qquad \text{(A.1)}$$

Donde:

C_{FAME} : Concentración de FAME en la muestra (mg/L).

$\sum A$: Área total peaks.

A_{EI} : Área estándar interno (metil éster de ácido heptadecanóico).

C_{EI} : Concentración estándar (mg/L).

- Cálculo del porcentaje de FAME en la muestra:

$$FAME = \frac{\left(\sum A\right) - A_{EI}}{A_{EI}} \bullet \frac{C_{EI} - V_{EI}}{m_M} \bullet 100\% \qquad \text{(A.2)}$$

FAME : Porcentaje de metil ésteres en la muestra (m/m).

$\sum A$: Área total peaks.

A_{EI} : Área estándar interno (metil éster de ácido heptadecanóico).

C_{EI} : Concentración estándar (mg/L).

m_M : Masa de la muestra (mg).

A2.2 Metilación para cuantificación en GC (Araújo, 1995).

Principio del método:

La metilación es la metodología previa para la identificación y cuantificación de ácidos grasos de triglicéridos por cromatografía. Esta se realiza en dos etapas, en la primera los triglicéridos liberan los ácidos grasos libres a través de la saponificación con metilato de sodio. Posteriormente, los ácidos grasos libres son esterificados por la acción de metanol acidificado con ácido clorhídrico.

Reactivos:

- Solución de KOH/ MeOH 0,5 M.
- Solución de HCl/ MeOH (4:1 v/v).
- Éter de petróleo.
- Hexano.

Procedimiento:

- Hidrolizar 50 µL de aceite con 1 mL de KOH/MeOH 0,5 M a 100 °C/ 5 minutos.
- A la mezcla hidrolizada añadir 400 µL de HCl/MeOH (4:1 v/v) y calentar a 100 °C durante 15 minutos.
- Luego de que la mezcla esterificada esté fría, añadir 2 mL de agua y extraer con éter de petróleo (2x 3 mL).
- Agitar la muestra y dejar reposar durante 1 minuto hasta la separación en dos fases
- Retirar el sobrenadante y guardar.
- Lavar la parte sedimentada con 3 mL de éter de petróleo y dejar reposar nuevamente
- Retirar el sobrenandante y guardar junto con el anterior (punto 5).
- Evaporar el solvente del volumen total recuperado y disolver el remanente en 750 µL de hexano (o acetona).
- Realizar inyección en GC/MS de acuerdo al apartado A1.1.

A2.3 Determinación del contenido de acilglicéridos (Adaptado de EN-14214).

Principio del método:

Consiste en la transformación de los MG y DG en los derivados siliados más volátiles, en presencia de piridina y de N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA) para su posterior cuantificación mediante cromatografía de gases, utilizando un estándar interno.

Reactivos:

- 1,2,3 tricaprinoilglicerol pureza para cromatografía (tricaprina).
- N-heptano.
- MSTFA.

- Piridina.

Materiales y equipos:

- Cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masa.
- Columna capilar BPX-5 de 50 m x 0,32 mm d.i. x 0,5 µm de espesor o equivalente.
- Viales.

Procedimiento:

- Preparar como estándar interno tricaprina disuelto en piridina de concentración conocida.
- Preparar muestras en los viales pesando alrededor de 10 mg de muestra (registrar la masa) y 10 µL de estándar interno.
- Agregar 10 µL de MSTFA, agitar y dejar reacción por 15 minutos para la transformación de la muestra en sus compuestos siliados más volátiles.
- Disolver la preparación en el mismo vial, en 0,8 mL de n-heptano.
- Inyectar 1 µL de muestra en el cromatógrafo de gases utilizando helio como gas *carrier* y el siguiente programa de temperatura: 15 °C por 1 minuto, con rampas consecutivas de 15 °C/min hasta 180 °C, 7 ºC/min hasta 230 ºC y 10 ºC/min hasta 320 ºC, manteniéndose a esta temperatura por 15 minutos. Temperatura del inyector 380 °C y split en una razón de 10.
- Utilizando esta metodología es posible determinar los MG y DG. Los TG pueden ser determinados por balance de masa.

Cálculos:

$$AG = \frac{A_{AG}}{A_{EI}} \bullet \frac{C_{EI} \ -V_{EI}}{m_M} \bullet 100\% \qquad \text{(A.3)}$$

Donde:

AG : Porcentaje de acilglicerol (MG ó DG) en la en la muestra (m/m).

A_{AG} : Área del acilglicerol (MG o DG).

A_{EI} : Área estándar interno (tricaprina).

C_{EI} : Concentración estándar (mg/L).

V_{EI} : Volumen estándar (L).

m_M : Masa de la muestra (mg).

A2.4 Índice de acidez y contenido de ácidos grasos libres (FFA) (Araújo, 1995).

Principio del método:

El índice de acidez se define como el número de mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres de 1 gramo de aceite o grasa. Se fundamenta en el hecho de que el extremo carboxílico de los lípidos es neutralizado por los hidroxilos de un álcali, pudiendo determinarse cuantitativamente esta reacción por medio de una valoración ácido-base. El contenido de ácidos grasos libres. A través del mismo principio es posible determinar el porcentaje de ácidos grasos libres presentes en un aceite o grasa.

Materiales y equipos:

- Vasos de precipitado
- Balanza Analítica de ± 0,05 g.
- Balanza común.

Reactivos:

- NaOH o KOH 0,1 M.
- Etanol 95 %.
- Fenolftaleína.

Procedimiento:

- Neutralizar 100 mL de alcohol hirviendo mediante la adición de NaOH o KOH 0,1 M, en presencia de fenolftaleína (agregar 3 gotas).
- Pesar aproximadamente 10 g de aceite y disolver en el alcohol neutralizado.
- Titular en presencia de fenolftaleína, usando NaOH o KOH 0,1 M y agitando constantemente hasta alcanzar el punto de equivalencia: momento que una gota produce un cambio de color ligero pero evidente, que persiste al menos por 30 segundos.

Cálculos:

- Índice de acidez

$$IA = \frac{PM_{KOH} \bullet V_M \bullet M_M}{m} \qquad (A.4)$$

Donde:

IA : Índice de acidez (mg KOH/g aceite).

PM_{KOH} : Peso molecular del KOH (56,1 g/mol).

V_M : Volumen de solución valorada de KOH o NaOH utilizada (mL).

M_M : Molaridad de la solución de de KOH o NaOH utilizada (mol/L).

m : Masa de la muestra (g).

- Contenido de ácidos grasos libres

$$FFA = \frac{V_{M(mL)} \bullet M_M \bullet PM_{ac}}{m} \bullet 100\% \qquad (A.5)$$

Donde:

FFA : Porcentaje de FFA en la muestra (m/m).

PM_{ac} : Peso molecular ácido oleico (282 g/mol).

M_M : Molaridad de la solución de de KOH o NaOH utilizada (mol/L).

m : Masa de la muestra (g).

A2.5 Índice de peróxido (Araújo, 1995).

Principio del método:

El índice de peróxido es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico. La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.

Materiales y equipos:

- Matraces erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado de 250 mL.
- Placa calefactora con agitador magnético.
- Dispositivo de titulación con bureta.

Reactivos:

- Cloroformo.
- KI saturada, 100 ml (recién preparada).
- Ácido acético glacial.
- Tiosulfato sódico 0,01 N.
- Solución de almidón 10 g/L.

Procedimiento:

- Pesar 2 gramos de muestra en un matraz con tapón de vidrio esmerilado.
- Añadir solución de 30 mL de ácido acético, 10 mL de cloroformo y agitar.
- Agregar 0,5 mL de solución saturada de KI (en agua recién hervida) y cerrar el matraz
- Esperar exactamente 1 minuto y agregar 30 mL de agua.
- Valorar el yodo liberado con una la solución de tiosulfato 0,1 N hasta que desaparezca el color amarillo.
- Añadir 0,5 mL de almidón soluble al 1 % y continuar con la titulación con tiosulfato 0,1 N hasta que desaparezca la coloración azul.
- A la vez hacer un blanco que no debe gastar más de 0,01 mL de tiosulfato 0,1 N.
- Repetir cuatro veces la medición y desechar la primera, utilizando los últimos tres resultados para calcular el promedio del índice de peróxido.
- Se recomienda realizar todo el procedimiento bajo campana.

Cálculos:

El índice de peróxido (IP), expresado en miliequivalentes de oxígeno por Kg de aceite se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{\left[V_M - V_B\right] \bullet N \bullet 1000}{m} \qquad \text{(A.6)}$$

Donde:

IP : Índice de peróxido (meq O_2/ kg)

V_M : Volumen de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en la muestra (mL).

V_B : Volumen de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el blanco (mL).

N : Normalidad de la solución de tiosulfato sódico empleada (eq/L).

m : Masa de la muestra (g).

A2.6 Índice de Yodo (Araújo, 1995).

Principio del método:

Es la cantidad de yodo absorbida por 100 gramos de grasa o aceite. Constituye una medida del grado de insaturación (número de dobles de enlaces). Se puede utilizar el método de Hanus o de Wijs para su determinación.

Materiales y equipos:

- Matraces erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado de 250 mL.
- Placa calefactora con agitador magnético.
- Dispositivo de titulación con bureta.

Reactivos:

- Solución de Wijs.
- Solución de yoduro potásico al 10 % (p/v).
- Tiosulfato sódico 0,1 M.
- Solución de almidón 1 % (p/v) recién preparada.
- Dispositivo de titulación con bureta.

Procedimiento:

- Pesar 0,1-0,6 gramos de muestra en el matraz erlenmeyer con tapón de vidrio y añadir 10 mL de tetracloruro de carbono.
- Añadir 25 mL de solución de Wijs y dejar en un lugar oscuro durante 30 minutos. El tapón debe humedecerse con solución de yoduro potásico al 10 % (p/v).
- Añadir 15 mL de solución de yoduro potásico al 10 % (p/v) y 100 mL de agua destilada.
- Titular con tiosulfato sódico 0,1 M añadiendo como indicador solución de almidón 1 % (p/v) recién preparada.
- Hacer un blanco sin la adición de la muestra.
- Se recomienda realizar todo el procedimiento bajo campana.

Cálculos:

$$IY = \frac{\left[V_B - V_M\right] \bullet N \bullet meq \bullet 100}{m} \qquad \text{(A.7)}$$

Donde:

IY : Índice de yodo (g I_2/ 100 g aceite).

V_M : Volumen de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en la muestra (mL).

V_B : Volumen de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el blanco (mL).

N : Normalidad de la solución de tiosulfato sódico empleado (eq/L).

meq : Miliequivalentes de yodo.

m : Masa de la muestra problema (g).

Si la normalidad del tiosulfato sódico es exactamente 0,1 N la ecuación A.8 se puede simplificar para llegar a la siguiente fórmula:

$$IY = \frac{\left[V_B - V_M\right] \bullet 1,269}{m} \qquad \text{(A.8)}$$

A2.7 Viscosidad cinemática (Adaptado de Procedimientos (COPEC, 2007))

Principio del método:

La viscosidad cinemática se determina en función del tiempo que demora un volumen de lípido en fluir por gravedad a 40 °C, a través de un viscosímetro capilar calibrado.

Materiales y equipos:

- Baño de agua con termorregulador.
- Viscosímetro capilar.
- Cronómetro.

Reactivos:

- Hexano grado técnico para lavar el viscosímetro.

Procedimiento

- Calentar el agua del baño a 40 °C.
- Ambientar el viscosímetro: sumergir el viscosímetro limpio y seco en posición vertical en el baño termorregulador sujeto con una pinza para soporte.
- Ambientar la muestra: verter una porción de la muestra en el vaso de precipitado o matraz y sumergirla en el baño (para el caso de la grasa se sugiere ambientarla a mayor temperatura).
- Succionar la muestra en el viscosímetro invirtiéndolo e introduciendo la parte angosta en la muestra ambientada y succionando por la parte ancha, llenando con la muestra hasta el segundo aforo.
- Poner el viscosímetro nuevamente en posición vertical y sumergir en el baño por lo menos hasta el primer aforo.
- Cuando todo el aceite este por debajo del primer aforo comenzar a medir el tiempo.
- Registrar el tiempo que demora en bajar el aceite desde el primer aforo hasta el segundo a 40 °C.

Cálculos:

$$\nu = t \bullet 0,01538 \qquad \text{(A.9)}$$

Donde:

ν : Viscosidad cinemática (mm^2/s).

t : Tiempo (s).

A2.8 Densidad a 15 °C (Adaptado de EN-14214)

Principio del método:

La densidad es determinada por la marca que establece el nivel del líquido de un densímetro flotando de manera vertical en el líquido analizado (aceite o FAME). Ésta es definida por el empuje creado por líquido analizado, el cual es función de su densidad.

Materiales y equipos:

- Densímetro de inmersión

Procedimiento:

- Verter en una bureta una cantidad suficiente de muestra de tal manera que el densímetro flote y no toque el fondo de la bureta.
- Registrar el nivel del líquido del densímetro y la temperatura de la muestra.
- La medición debe ser realizada entre 20-60 °C y posteriormente el resultado debe ser corregido para obtener la densidad a 15 °C.

Cálculos:

$$\rho = R + 0,723 \bullet (T_M^{\circ} - 15) \qquad \text{(A.10)}$$

Donde:

ρ : Densidad (kg/m^3).

R : Nivel del líquido del densímetro registrado (kg/m^3).

T° : Temperatura de la muestra (°C).

A2.9 Agua y sedimentos (ASTM Standard D 1976-97)

Principio del método:

Es el volumen de agua libre y sedimentos en combustibles o aceites separado a través de centrifugación con tolueno saturado.

Materiales y equipos:

- Centrífuga.
- Baño de agua.
- Tubos para centrífuga de vidrio de 100 mL, con tapón y graduación de 203 mm de altura.
- Estufa.

Reactivos:

- Tolueno saturado. Para su preparación seguir los siguientes pasos:

- Llenar una botella de 1 litro con 700 u 800 mL de tolueno y agregar 25 mL de agua destilada. Tapar la botella y agitar vigorosamente.
- Soltar la tapa y colocar la botella a 60 °C +/-3 °C durante 30 minutos.
- Repetir 3 veces agitándolo.
- Dejar reposar durante 48 horas antes de usar.

Procedimiento:

- Calentar 100 mL de la muestra a analizar hasta 50 °C y agitar vigorosamente.
- Agregar 50 mL de tolueno saturado a un tubo de centrífuga y 50 mL de la muestra a analizar. Realizar el ensayo en duplicado.
- Cerrar cada tubo con un tapón y agitar para que se mezcle la muestra y el solvente.
- Soltar los tapones y sumergir los tubos en el baño de agua durante 10 minutos a 60 °C +/-1 °C. Agitar bien la mezcla y colocar en la centrífuga.
- Centrifugar entre 1284 a 1977 rpm durante 10 minutos.

- Retirar los tubos con suavidad y voltearlos para observar la separación. Cuantificar los volúmenes de solvente, agua y sedimento.

Cálculos:

$$Agua\ \ y\ \ sedimentos\ \ = \frac{V_R}{V_o} \bullet 100 \qquad \text{(A.11)}$$

Donde:

Agua y sedimentos : Porcentaje de agua y sedimentos en la muestra (v/v).

V_R : Promedio del volumen de residuo de ambas muestras (mL).

V_o : Volumen muestra (mL).

A2.10 Punto de inflamación (ASTM Standard D 56-02a)

Principio del método:

Es la temperatura más baja a la cual los vapores que se desprenden de un combustible se inflaman en presencia de una llama o fuente de calor.

Materiales y equipos:

- Equipo de Punto de inflamación Pensky Mastens.

Procedimiento:

- Verificar que la muestra se encuentre a 18 °C bajo el punto de inflamación esperado. Si no fuera así, enfriar la muestra.
- Llenar la copa con la muestra hasta la línea de enrase.
- Colocar la copa en el baño, ajustar la tapa, el agitador y termómetro asegurando hermeticidad.
- Conectar el calefactor regulando un incremento de la temperatura de 5 a 6 °C por minuto.
- Agitar a 90-120 rpm y definir una temperatura esperada de inflamación.
- Registrar el punto de inflamación observado y realizar la corrección barométrica.

Cálculos:

- Factor de corrección:

$$C = 0,033 \bullet [760 - p] \tag{A.12}$$

- Punto de inflamación:

$$PI = PI_{observado} + C \tag{A.13}$$

Donde:

C : Factor de corrección (°C).

p : Presión barométrica (mmHg).

PI: Punto de inflamación (°C).

A2.11 Contenido de azufre (ASTM Standard D 7039-04)

Principio del método:

Consiste en la excitación por medio de rayos monocromáticos de electrones específicos del azufre, lo que produce emisión de radiación fluorescente que es dispersada y medida por un detector de rayos X.

Materiales y equipos:

- Equipo espectroscopia de fluorescencia por dispersión de longitud de onda.
- Celdas plásticas para el equipo.
- Film plástico.

Reactivos:

- Patrones de calibración.
- Alcohol isopropílico.

Procedimiento:

- Realizar la limpieza de la cámara del equipo con alcohol isopropílico.

- Hacer una curva de calibración con los patrones.
- Agregar una muestra a la celda aproximadamente hasta la mitad.
- Tapar la celda con el film plástico evitando tocar el mismo.
- Realizar la medición (los resultados son obtenidos directamente en ppm).

A2.12 Punto de escurrimiento (ASTM Standard D 97-04)

Principio del método:

Es la temperatura mínima a la cual la muestra escurre cuando se le da una inclinación y ésta perdura durante 5 segundos.

Materiales y equipos:

- Equipo de punto de escurrimiento, el cual consiste en tres baños graduados a tres temperaturas diferentes: 32 °F (0 °C), 0 °F (-18 °C) y -34 °F (-36 °C). Además consta de camisas metálicas que son cilindros impermeables en donde se introducen las muestras.
- Termómetros 5F y 6F.
- Recipientes de ensayo de vidrio transparente y fondo plano.
- Tapón de corcho del diámetro del recipiente de vidrio.

Reactivos:

- Etanol (refrigerante).

Procedimiento:

- Verificar el nivel del refrigerante en los tres baños el cual debe estar a 25 mm del borde superior de la camisa.
- Adicionar 45 mL de muestra al recipiente de vidrio, taparla con el corcho y colocarle el termómetro.
- Colocar alrededor de la base del recipiente una empaquetadura de goma, cuero u otro, que impida su contacto con la camisa metálica del equipo.

- Introducir el tubo en la el baño de 32 °F. Observar la muestra cada 5 °F sacando el recipiente de ensayo e inclinándolo. Si a los 45 °F persiste el escurrimiento cambiar al segundo baño.
- Realizar el mismo procedimiento en el segundo baño. Si a los 15 °F persiste el escurrimiento traspasar la muestra al tercer baño y repetir el procedimiento.
- El análisis finaliza cuando al inclinar el vaso la muestra no escurre y se informa la temperatura de la inclinación anterior.