

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

**PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE UNA
MEZCLA DE GRASAS Y ACEITES RESIDUALES
EMPLEANDO CATÁLISIS QUÍMICA Y
ENZIMÁTICA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

M.C. VEYMAR GUADALUPE TACIAS PASCACIO

ASESORES:

DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ

DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

H. VERACRUZ, VER., MÉX.

AGOSTO, 2017



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

H. Veracruz, Ver. 18 de Agosto 2017
Unidad de Investigación en Alimentos
Oficio: ITV/UNIDA/258/2017

C. Veymar Guadalupe Tacías Pascacio
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos titulada:

"Producción de biodiésel a partir de una mezcla de grasas y aceites residuales empleando catalisis química y enzimática"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

DR. JOSÉ ALBERTO MONROY RIVERA
JEFE DE LA UNIDAD

EL H. JURADO

DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ
PRESIDENTE

DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA
SECRETARIO

DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
VOCAL 1

DR. MIGUEL ÁNGEL GARCÍA-ALVARADO
VOCAL 2

DR. JOSÉ JOEL ESPINOSA DE LOS MONTEROS
FERNANDEZ
VOCAL 3

DR. LUIS ALBERTO PERALTA PELÁEZ
VOCAL 4

JAMR*



Calle. Miguel Ángel de Quevedo 2775,
Col. Formando Hogar,
C.P. 21897, H. Veracruz, Ver.
Tel.: (229) 914 1500
www.itver.edu.mx





"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

El presente trabajo de tesis titulado "Producción de biodiésel a partir de una mezcla de grasas y aceites residuales empleando catálisis química y enzimática" presentado por el (la) C. Veymar Guadalupe Tacías Pascacio, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

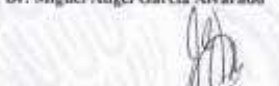
DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Asesor 
Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Asesor 
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Revisor 
Dra. Rosa María Oliart Ros

Revisor 
Dr. Miguel Ángel García Alvarado

Revisor 
Dr. José Joel Espinosa de los Monteros Fernández

Revisor 
Dr. Luis Alberto Peralta Peláez

JAMR*



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779,
Col. Formando Hogar,
C.P. 91887, H. Veracruz, Ver.
Tel.: (229) 934 1500
www.itver.edu.mx



**PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE UNA MEZCLA DE
GRASAS Y ACEITES RESIDUALES EMPLEANDO CATÁLISIS
QUÍMICA Y ENZIMÁTICA**

Por:

Veymar Guadalupe Tacias Pascacio

Trabajo de tesis propuesto a la

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

Como requisito parcial para

obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Agosto, 2017

H. Veracruz, Ver., México

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por hacer de mí una persona perseverante, constante y con los objetivos claros; por las oportunidades, las bendiciones, los sueños cumplidos, y sobre todo gracias por todas las buenas personas, ¡mis amigos!, que has enviado para acompañarme en el camino, y que me han inspirado a ser una mejor persona.

A mi familia, que siempre está ahí para apoyarme cuando lo necesito.

A la Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, por su dirección, enseñanzas, consejos y su amistad, pero sobre todo, muchas gracias por la confianza que depositó en mí, ese es el mejor regalo que alguien me puede dar.

Al Dr. Arnulfo Rosales Quintero, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y proveerme de lo necesario para llevar a cabo el proyecto; gracias también por su amistad.

Al Dr. Roberto Fernández Lafuente, por compartirme tus conocimientos, por asesorarme en todo, y por enseñarme a trabajar en equipo. Gracias también por tu hospitalidad, confianza y amistad.

Al Dr. Miguel García Alvarado, por su valiosa ayuda en la parte estadística de este trabajo.

AL Dr. Luis Alberto Peralta, por su asesoría, su apoyo e interés en este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Aguilar y el **Dr. Joel**, por sus observaciones para conducir correctamente mi proyecto de tesis.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para mis estudios de doctorado y por todas las oportunidades y el apoyo brindado en favor de mi formación y desarrollo profesional.

Al Instituto Tecnológico de Veracruz, en especial a la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos**, por permitirme ser parte de tan prestigiosa institución y por proporcionarme todas las facilidades para llevar a cabo mi proyecto de investigación.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid, por recibirme en sus laboratorios y por todo el apoyo que se me dio para poder concluir con éxito mi estancia de investigación.

RESUMEN

Tacias Pascacio Veymar Guadalupe. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos/Instituto Tecnológico de Veracruz. Agosto 2017. **Producción de biodiésel a partir de una mezcla de grasas y aceites residuales empleando catálisis química y enzimática.** Asesores: Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dra. María Gpe. Aguilar Uscanga, Dr. Arnulfo Rosales Quintero.

El biodiésel es un biocombustible que posee propiedades fisicoquímicas similares al diésel de petróleo, y es miscible con éste en cualquier proporción, es biodegradable y una fuente de energía renovable. Su principal desventaja es el alto costo derivado del uso de materias primas de alta calidad en su producción. Una alternativa a este inconveniente es el aprovechamiento de grasas y aceites residuales de cocina (GAR), que tienen un costo hasta 60% menor que el del aceite “fresco” (aceite vegetal comestible que no ha sido utilizado en el proceso de cocción de alimentos). El biodiésel es producido por transesterificación de triglicéridos con un alcohol (metanol, principalmente) en presencia de un catalizador, que a nivel industrial es generalmente un álcali como el KOH o NaOH. Cuando se usan GAR como materia prima, los ácidos grasos libres y el agua reaccionan con el álcali produciendo jabón, disminuyendo con esto el rendimiento de la reacción.

El objetivo de este trabajo fue comparar el desempeño de diferentes tipos de catalizadores químicos y enzimáticos en la producción de biodiésel a partir de una mezcla de GAR.

El proyecto se dividió en tres etapas: 1) Definición y caracterización de la materia prima, 2) Producción de biodiésel empleando catálisis química y 3) Producción de biodiésel mediante catálisis enzimática. Los resultados obtenidos en la primera etapa permitieron definir la composición de una mezcla de GAR de ocho tipos de restaurantes: Formales, Comida rápida, Taquerías, Antojitos, Cocinas económicas, Bares, Gorditas y Rosticerías. En la etapa dos se establecieron las condiciones óptimas de operación para la catálisis homogénea alcalina (KOH), la catálisis homogénea ácida (H_2SO_4) y catálisis heterogénea alcalina (CaO), obteniéndose un rendimiento de metil ésteres de 84%, 91% y 75%, respectivamente. En la etapa tres, se desarrollaron y caracterizaron nuevos biocatalizadores, de los cuales TLL-Octadecil metacilato resultó ser el mejor, con un rendimiento de 78 %, el cual es cercano al obtenido por catálisis alcalina convencional, 20% superior al biocatalizador comercial más utilizado (Novozyme 435) y 65% mayor a su contraparte comercial TL IM de Novozyme.

ABSTRACT

Tacias Pascacio Veymar Guadalupe. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos/Instituto Tecnológico de Veracruz. August 2017. **Biodiesel production from a mixture of waste cooking oils and fats by chemical and enzymatic catalysis**. Advisors: PhD. Beatriz Torrestiana Sánchez, PhD. María Gpe. Aguilar Uscanga, PhD. Arnulfo Rosales Quintero.

Biodiesel is a biodegradable fuel and a source of renewable energy which can be mixed with petroleum diesel, in any proportion because it has similar physicochemical properties. However, the main disadvantage of biodiesel is the high cost derived from the quality of the raw materials used in the process production. An alternative to overcome this drawback is to use waste cooking oils and fats (WCOF), which are up to 60% cheaper than "fresh" oil. Biodiesel is produced by transesterification of triglycerides with an alcohol (methanol, mainly) in presence of a catalyst, which in industry is commonly an alkali such as KOH or NaOH. When WCOF are used as raw material, alkali reacts with the free fatty acids and water, leading to soap formation, and decreasing the reaction yield.

In this context, the objective of this work was to compare the performance of different chemical and enzymatic catalyst in the biodiesel production from a mixture of WCOF.

The project was conducted in three steps: 1) to define and characterize the raw material, 2) to obtain biodiesel by chemical catalysis and 3) to produce biodiesel by enzymatic catalysis. Results from the first step allowed defining the composition of the mixture of WCOF from eight types of restaurants: Formals, Fast Food, Taquerías, Antojitos, Economic Kitchens, Bars, Gorditas and Roastings. In the second step, the operation conditions for the three types of chemical catalysts, alkaline homogeneous with KOH, acid homogeneous catalysis (H_2SO_4) and alkaline heterogeneous catalysis (CaO) were optimized; resulting in methyl esters yields of 84%, 91% and 75%, respectively. In the last step, new biocatalysts were developed and characterized, from which TLL-Octadecyl methacrylate showed the highest yield conversion (78%). The yield conversion obtained with this biocatalyst was close to the obtained by conventional alkaline catalysis; it was 20% higher than the commercial biocatalyst commonly used (Novozyme 435) and 65% higher than its commercial counterpart TL IM from Novozyme.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades del biodiésel	3
2.2. Materias primas para la producción de biodiésel	6
2.2.1. Grasas y aceites residuales.....	8
2.3. Producción de biodiésel	10
2.4. Catálisis química	14
2.4.1. Catálisis homogénea alcalina.....	15
2.4.2. Catálisis homogénea ácida.....	17
2.4.3. Catálisis heterogénea ácida y alcalina.....	19
2.5. Catálisis enzimática	21
2.5.1. Lipasas.....	21
2.5.2. Mecanismo de acción de las lipasas.....	28
2.5.3. Activación interfacial.....	29
2.5.4. Inmovilización de lipasas.....	31

2.5.5. Lipasas en la producción de biodiésel.....	33
2.6. Separación y purificación del biodiésel.....	42
2.7. Normatividad para establecer la calidad del biodiésel.....	45
III. JUSTIFICACIÓN.....	48
IV. OBJETIVOS.....	49
4.1. Objetivo general.....	49
4.2. Objetivos específicos.....	49
V. RESULTADOS.....	51
5.1. Definición y caracterización de la materia prima para la producción de biodiésel.....	51
Publicación 1: Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio.....	52
5.2. Desarrollo y caracterización de biocatalizadores para su uso en la producción de biodiésel.....	65
Publicación 2: Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity.....	67
Publicación 3: Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports.....	82
5.3. Evaluación de nuevos biocatalizadores en la producción de biodiésel.....	89
Publicación 4: Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support.....	90

5.4. Optimización de las condiciones de operación de la catálisis química y enzimática en la producción de biodiésel.....	101
Manuscrito 5: Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization.....	102
DISCUSIÓN.....	143
CONCLUSIONES.....	145
RECOMENDACIONES.....	146
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 2.1. Porcentaje de acidez de diferentes grasas y aceites.....	10
TABLA 2.2. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de catalizadores usados en la reacción de transesterificación.....	13
TABLA 2.3. Clasificación de los catalizadores heterogéneos.....	20
TABLA 2.4. Algunas aplicaciones industriales de las lipasas.....	27
TABLA 2.5. Comparación de la catálisis enzimática y la catálisis química (ácida y alcalina) para la producción de biodiésel.....	33
TABLA 2.6. Productores microbianos de lipasas usadas en estudios de producción de biodiésel en sistemas libres o con solvente.....	39
TABLA 2.7. Comparación de diferentes tecnologías de separación y purificación de biodiésel.....	44
TABLA 2.8. Comparación de especificaciones de las normas europea (EN 14214) y americana (ASTM D 6751).....	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 2.1. Reacción de transesterificación.....	11
FIGURA 2.2. Esquema general de la reacción catalizada por una lipasa no específica...	23
FIGURA 2.3. Esquema general para la reacción catalizada por una lipasa específica sn-1,3.....	24
FIGURA 2.4. Mecanismo de acción de las lipasas.....	28
FIGURA 2.5. Distintas conformaciones de lipasas.....	29
FIGURA 2.6. Activación interfacial de las lipasas en presencia de superficies hidrofóbicas.....	30
FIGURA 2.7. Inmovilización de lipasas en soportes hidrofóbicos.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una fuerte dependencia hacia los combustibles fósiles, ya que éstos son ampliamente utilizados en la industria, la agricultura y el transporte; sin embargo, la constante reducción global en las reservas del petróleo y el posible agotamiento de éste, sumado a los altos costos de extracción y el incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero, lluvias ácidas, y demás problemas medioambientales, han estimulado la búsqueda de combustibles renovables que pueda reducir el consumo o reemplazar completamente a los combustibles derivados del petróleo.

El biodiésel, representa una buena alternativa para reemplazar parte del petróleo utilizado, ya que tiene propiedades similares al diésel, no es tóxico, es biodegradable, renovable y tiene menos emisiones de gases de efecto invernadero (Dias *et al.*, 2009; Alptekin y Canakci, 2011; Ibeto *et al.*, 2011). El biodiésel es producido por transesterificación de triglicéridos con un alcohol de bajo peso molecular (metanol, principalmente), en presencia de un catalizador (alcalino, ácido o enzimático). Por la excelente calidad del producto, altos rendimientos y cortos tiempos de reacción, a nivel industrial el biodiésel es obtenido por transesterificación alcalina de aceites comestibles (Poppe *et al.*, 2015).

Uno de los inconvenientes del biodiésel es que el uso extensivo de aceites vegetales comestibles como materia prima para su producción, puede derivar en una crisis relacionada con el suministro de alimentos e inducir un desequilibrio económico (Canesin *et al.*, 2014); además, el biodiésel obtenido de esta materia prima (aceite de colza, girasol y soya, principalmente), la cual representa alrededor del 70-80% de los costos de producción, es generalmente un 10-50% más costoso que el diésel obtenido del petróleo, siendo ésta una de sus principales desventajas (Leung y Guo, 2006; Ataya *et al.*, 2007).

La necesidad de combatir la escasez de combustibles sin afectar otro sector de vital importancia (como el alimentario), ha fomentado la búsqueda y estudio de nuevas alternativas de materias primas para la producción de biodiésel, que además permitan obtener un producto que sea económicamente competitivo con el diésel de petróleo. Una posible solución a estos inconvenientes es el uso de las grasas y aceites residuales generados en la industria alimentaria, las cuales, en vista de su fácil disponibilidad y bajo costo, pueden mejorar significativamente la viabilidad económica de la producción de biodiésel, además de que permite el reciclaje de residuos y no compite con la industria alimentaria (Chhetri *et al.*, 2008; Predojević, 2008).

Las grasas y aceites residuales, como materia prima para la producción de biodiésel, tienen como limitante principal la presencia de ácidos grasos libres y agua, los cuales afectan fuertemente la catálisis alcalina convencional, ya que reaccionan con el catalizador, conduciendo a la formación de jabón y a la consecuente disminución del rendimiento de metil ésteres (Poppe *et al.*, 2015). Sin embargo, estos inconvenientes podrían ser superados utilizando otro tipo de catalizadores, como los catalizadores ácidos homogéneos o heterogéneos, básico heterogéneos, o los enzimáticos. Con respecto a la catálisis enzimática, la cual debido al alto costo no es utilizada en la producción industrial de biodiésel, existe la necesidad y una enorme área de oportunidad para el desarrollo de nuevos biocatalizadores que sean competitivos con los biocatalizadores comerciales, económicamente accesibles y de larga vida útil (Chen *et al.*, 2009; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017).

Por esta razón y tomando en cuenta que hasta la fecha no ha sido reportado, es necesario realizar un estudio y evaluación de los diferentes tipos de catalizadores disponibles (o nuevos) para llevar a cabo la transesterificación, de tal forma que su desempeño pueda ser comparado de forma sistemática, y esto permita identificar qué tipo de catalizador genera los mejores resultados en la producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del biodiésel

El biodiésel ha sido definido por la sociedad americana para pruebas y materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) como mono alquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga derivados de materias primas renovables, tales como aceites vegetales o grasas animales, para su uso en motores de encendido de ignición por compresión (Saleh *et al.*, 2010).

Es un biocombustible no tóxico, biodegradable y una fuente de energía renovable. Pertenece a los combustibles ecológicos debido a su composición cualitativa (77% carbono, 12% hidrógeno, 11% oxígeno, trazas de nitrógeno y azufre) (Tomasevic y Siler-Marinkovic, 2003) y se considera carbono neutral, porque las plantas que proporcionan la materia prima para la producción de biodiésel, toman más dióxido de carbono del que éste libera a la atmósfera cuando se usa como fuente de energía (Gunvachai *et al.*, 2007; Ferella *et al.*, 2010).

El biodiésel ha recibido creciente atención, debido a que presenta propiedades fisicoquímicas similares al diésel de petróleo, y es miscible con éste en cualquier proporción. Posee varias ventajas técnicas sobre el combustible diésel, tales como la lubricidad inherente, baja toxicidad, derivación a partir de materias primas renovables e incluso domésticas, punto de inflamación superior, biodegradabilidad, contenido de azufre insignificante, y menores emisiones globales de gases de escape (Fukuda *et al.*, 2001; Yousef *et al.*, 2005; Phan y Phan, 2008; Moser, 2009; Atadashi *et al.*, 2010). Se ha reportado que cuando se utiliza biodiésel existe una disminución promedio de 14% para CO₂, 17.1% para CO y 22.5% para densidad de los gases de combustión (Utlu y Koçak, 2008).

Por otro lado, las desventajas importantes del biodiésel incluyen el alto costo de materias primas, menor tiempo de almacenamiento y la estabilidad oxidativa, menor contenido de energía volumétrica, y problemas de operación a bajas temperaturas (Knothe, 2005; DeOliveira *et al.*, 2006). Muchas de estas deficiencias pueden ser mitigadas a través de mejoradores de flujo en frío (Moser, 2009; Soriano *et al.*, 2009), antioxidantes (Loh *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008), la mezcla con diésel de petróleo (Benjumea *et al.*, 2008), y/o reducir el tiempo de almacenamiento (Bondioli *et al.*, 2003).

El costo de la materia prima representa alrededor de 70%- 80% de los gastos de producción (Canesin *et al.*, 2014), lo cual es una grave amenaza para la viabilidad económica de la industria del biodiésel, ya que trae consigo un producto final que es aproximadamente 1.5 veces más costoso que el diésel de petróleo (Zhang *et al.*, 2003; Berrios *et al.*, 2010). Una posible solución a este problema es el empleo de materias primas alternativas de diferente tipo, calidad y costo. Estas materias primas pueden incluir aceites ácidos, aceites de cocina usados y grasas residuales de restaurantes, varias grasas animales, aceites vegetales no comestibles, y aceites obtenidos de los árboles y microorganismos como algas. Sin embargo, muchas de estas materias primas alternativas pueden contener altos niveles de ácidos grasos libres (AGL), agua o materia insoluble, que afectan a la producción de biodiésel (Moser, 2009).

El biodiésel es un combustible producido por esterificación de ácidos grasos o por transesterificación de un aceite vegetal, grasa animal y aceites usados de cocina, con un alcohol de bajo peso molecular en presencia de un catalizador (ácido, básico o enzimático). El metanol es el alcohol más utilizado debido a su bajo costo comparado con otros alcoholes, por lo que los Alquil Ésteres de Ácidos Grasos se refieren principalmente a Metil Ésteres de Ácidos Grasos (FAMEs, por sus siglas en inglés) (Gerpen, 2005; Varanda *et al.*, 2011; Poppe *et al.*, 2015).

La síntesis de metil ésteres se clasifica como transesterificación química o enzimática, de acuerdo con el tipo de catalizador que se utilice en el proceso. Altos requerimientos de energía, dificultades en la recuperación del catalizador y glicerol y la contaminación ambiental, son las principales desventajas de los procesos catalizados por ácidos o álcalis (Marchetti *et al.*, 2007).

“De acuerdo con Gerpen (2005), aunque el biodiésel no puede reemplazar completamente al combustible diésel, existen al menos cinco razones que justifican su desarrollo”:

1. Provee un mercado para el exceso de producción de aceites vegetales, grasas animales y aceites residuales.
2. Disminuye, aunque no elimina, la dependencia de los países para con el petróleo importado.
3. El biodiésel es renovable y no contribuye al calentamiento global debido a su ciclo cerrado de carbono.
4. Las emisiones de escape de CO, hidrocarburos no quemados y emisión de partículas del biodiésel, son menores que con el diésel.
5. Cuando el biodiésel es agregado al diésel en una cantidad igual a 1-2%, puede convertir un combustible con pobres propiedades lubricantes, como el moderno combustible diésel ultra bajo en azufre, en un combustible aceptable.

2.2. Materias primas para la producción de biodiésel

Las principales materias primas disponibles para la producción de biodiésel, las cuales representan alrededor del 70-80% de los costos de producción (Canesin *et al.*, 2014), pueden agruparse de la siguiente forma (Atadashi *et al.*, 2012):

- **Aceites vegetales:** Los aceites vegetales pueden ser comestibles, tales como aceite de algodón, cacahuete, maíz, colza, soya, palma, girasol, oliva, coco, etc., o no comestibles, como los aceites de *Jatropha*, *Pongamia*, *Neem*, semillas de caucho, jojoba e higuierilla (aceite de ricino). Tanto los aceites vegetales comestibles como los no comestibles, pueden ser usados en la producción de biodiésel en su forma refinada o cruda; sin embargo, se prefieren los primeros, ya que el grado de refinación de la materia prima repercute en la pureza y rendimiento del biodiésel. En un análisis de la producción de biodiésel a partir de aceite vegetal refinado y crudo, el rendimiento de los metil ésteres disminuyó de 93%-98% para el aceite refinado a 67%-86% para el aceite crudo. Esto se atribuyó principalmente a la presencia de hasta un 6,66% de ácidos grasos libres en el aceite crudo, aunque los fosfolípidos también se sugirieron como una fuente de destrucción del catalizador (Gerpen, 2005).
- **Grasas animales:** sebo de res, puerco, aves de corral y pescado.
- **Grasas y aceites residuales de cocina**

La materia prima utilizada para la producción de biodiésel varía según la ubicación, el clima y la disponibilidad. Generalmente, los aceites o grasas más abundantes en una región son las materias primas más comunes. Por lo tanto, los aceites de colza y girasol se utilizan principalmente en Europa, el aceite de palma predomina en los países tropicales, y las grasas animales y el aceite de soya son más comunes en los Estados Unidos (Demirbas, 2006). En el caso de México, los aceites utilizados para la producción de biodiésel son el aceite de palma y el de *Jatropha* (Montero *et al.*, 2015).

Los aceites comestibles (como los de colza, soya y girasol), representan más del 95% de la materia prima utilizada en la producción de biodiésel, ya que la alta calidad de estos aceites permite la obtención de un biodiésel con características más cercanas a las del diésel de petróleo; sin embargo, el consumo a gran escala de los aceites comestibles para generación de energía puede generar una crisis respecto al suministro de alimentos e inducir un desequilibrio económico (Rodrigues *et al.*, 2016); además, el biodiésel producido a partir de estas materias primas es usualmente entre 10-50% más costoso que el diésel de petróleo, lo cual es un obstáculo para el desarrollo industrial y comercialización de este biocombustible (Zhang *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2008; Canesin *et al.*, 2014).

Evidentemente, existe la necesidad de estudiar materias primas alternas de bajo costo que puedan ser utilizadas en la producción de biodiésel y que superen los inconvenientes que acompañan su producción actual. Los aceites vegetales obtenidos de semillas de plantas no comestibles son una opción, ya que estas crecen de forma silvestre en terrenos que no son aptos para cultivos de interés alimentario, y no requieren condiciones especiales para su desarrollo. Ejemplo de estos cultivos son la higuera (*Ricinus communis*) y el piñón (*Jatropha curcas*). Los aceites producidos con estas semillas tienen como desventaja una alta concentración de ácidos grasos libres que traen consigo problemas durante la reacción de transesterificación y/o en las operaciones de separación y purificación (Cao *et al.*, 2006).

Otra desventaja de los aceites vegetales no comestibles, es que es necesario promover el cultivo de las plantas de las cuales provienen, para contar con materia prima suficiente para la producción de biodiésel a gran escala. Además, la ampliación del uso y la producción de una materia prima en particular deben ser evaluadas en términos de los impactos ambientales y económicos. Según un informe de las Naciones Unidas, la necesidad mundial para cambiar de petróleo a la energía derivada de las plantas impulsará la deforestación, desplazará a los pequeños agricultores de la tierra, y llevará a la grave escasez de alimentos y el aumento de la pobreza si no se gestiona cuidadosamente. Por esta razón su siembra debe llevarse a cabo en terrenos “pobres”, no aptos para cultivos de consumo humano (Vasudevan y Briggs, 2008).

Dentro de las materias primas de bajo costo, actualmente se han considerado a las grasas y aceites residuales de cocina, los cuales son mucho más baratos que los aceites vegetales “frescos”. El aceite, una vez usado, es un residuo indeseable y su reciclaje como biocombustible alternativo no solamente limpia el medio ambiente de este contaminante sino que también genera una fuente alternativa de energía (Kulkarni y Dalai, 2006; Varanda *et al.*, 2011).

2.2.1. Grasas y aceites residuales

El incremento en la producción de aceites y grasas residuales de hogares e industrias es un problema creciente en el mundo (Felizardo *et al.*, 2006). El manejo de tales residuos representa un reto significativo debido a los problemas relacionados con su disposición final y a la posible contaminación del agua y el suelo (Chhetri *et al.*, 2008).

En comparación con el aceite “fresco”, el costo de los aceites vegetales residuales llega a ser hasta un 60% menor, dependiendo de la fuente y su disponibilidad. Debido a que la mayor preocupación en la producción de biodiésel es el precio de la materia prima, la conversión catalítica de estos residuos, resulta en destacados beneficios económicos y medioambientales, mejorando significativamente la viabilidad económica de la producción de biodiésel, en vista de su disponibilidad y bajo costo, y ofreciendo solución al problema creciente del incremento en la producción de grasas y aceites residuales en el mundo (Predojević, 2008).

En general, el uso de grasas y aceites residuales en la producción de biodiésel tiene tres ventajas principales (Dias *et al.*, 2008): a) no compite con la industria alimenticia, b) reciclaje de residuos, c) Reducción en los costos de producción, por lo tanto, incremento en la competitividad económica del biodiésel.

La producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales también tiene importantes desventajas, ya que las características fisicoquímicas de los aceites residuales son diferentes a las del aceite fresco, lo que repercute en los rendimientos y la calidad del biodiésel obtenido. Las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los aceites residuales se deben a la degradación que los aceites vegetales sufren durante la cocción al ser utilizados para freír alimentos (Neto *et al.*, 2000). La cocción es un proceso de deshidratación, esto significa que el

agua y los componentes solubles son transferidos del alimento al aceite, al mismo tiempo que el alimento absorbe parte del aceite que lo rodea.

Durante la cocción, los aceites comestibles son constantemente expuestos a reacciones químicas, principalmente oxidación, polimerización e hidrólisis, llevadas a cabo por la presencia de oxígeno, luz y altas temperaturas (160-180 °C) (Maskan y Bağcı, 2003; Berrios *et al.*, 2010). El tipo de aceite, el tiempo de cocción, la temperatura, la exposición al aire, el periodo de almacenamiento, el tipo de alimento cocinado, y en general, el tipo de tratamiento al cual estuvo sometido, determinan los contaminantes primarios y secundarios que darán al aceite residual sus características (Encinar *et al.*, 2005; Wyse-Mason y Beckles 2012).

La oxidación, la cual se ve acelerada por la temperatura y la luz, produce enranciamiento del aceite debido al contacto con el oxígeno atmosférico. Los triglicéridos que están presentes en el aceite son compuestos orgánicos oxidables. De hecho, cuando el número de dobles enlaces incrementa, la oxidación se lleva a cabo fácilmente. La oxidación, además de productos degradados, genera hidroperóxidos, aldehídos y cetonas (Maskan y Bağcı 2003).

La polimerización es una reacción química donde los ácidos grasos insaturados, debido a la influencia del calor, metales pesados (Cu, Fe) o luz, y principalmente por la ruptura de dobles enlaces, reacciona para formar dímeros (una molécula compuesta de dos subunidades idénticas unidas) y polímeros de triglicéridos. Como consecuencia de la polimerización, el peso molecular del aceite incrementa y el aceite se vuelve más viscoso (Berrios *et al.*, 2010).

La presencia de calor y agua acelera la hidrólisis de los triglicéridos e incrementa el contenido de ácidos grasos libres en el aceite, el aceite se oscurece y desarrolla olores desagradables. Además, cuando el agua se evapora a través del aceite, se forman monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AGL) (Felizardo *et al.*, 2006; Berrios *et al.*, 2010).

Los ácidos grasos libres y el contenido de agua ejercen efectos negativos en la transesterificación de los triglicéridos con alcoholes. Cuando un catalizador alcalino es agregado a materias primas con un alto contenido de AGL, éstos reaccionan con el catalizador para formar

jabón y agua. El jabón generado durante la reacción inhibe la separación de los metil ésteres y el glicerol y contribuye a formar una emulsión durante el lavado con agua (Freedman *et al.*, 1984; Gerpen, 2005). Los porcentajes de ácidos grasos libres de los aceites y grasas animales son superiores a los del aceite vegetal fresco, como puede observarse en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1. Porcentaje de acidez de diferentes grasas y aceites (Gerpen, 2005).

Materia prima	Ácidos grasos libres (%)
Aceites vegetales refinados	<0.05%
Aceite vegetal crudo	0.3-0.7%
Grasa residual de restaurante	2-7%
Grasa animal	5-30%
Grasa de trampa*	40-100%

*Obtenida de residuos de la industria restaurantera.

2.3. Producción de biodiésel

El interés en el uso de combustibles renovables inició con el uso directo de los aceites vegetales como sustitutos del diésel. Sin embargo, su uso directo en motores de ignición por compresión fue restringida debido a su alta viscosidad, la cual resulta en una pobre atomización, combustión incompleta y depósitos de carbón en el inyector y válvulas, causando serios problemas de ensuciamiento del motor (Ramadhas *et al.*, 2005). Posteriormente, se encontró que los productos de la transesterificación de estos aceites con metanol o etanol eran mucho mejores combustibles debido a sus mejores propiedades fisicoquímicas, principalmente su menor viscosidad (Alamu *et al.*, 2008).

La reacción de transesterificación de aceites vegetales y grasas animales, con alcohol (metanol, principalmente) en presencia de un catalizador, consiste en una secuencia de tres

reacciones consecutivas reversibles donde los triglicéridos son convertidos a diglicéridos, los diglicéridos son convertidos a monoglicéridos, y éstos últimos a glicerol. En cada etapa se produce un éster, de este modo, por cada molécula de triglicérido se obtienen tres moléculas de éster. Los metil ésteres de ácidos grasos producidos reciben el nombre de biodiésel (Ma y Hanna 1999; Araujo *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008) (Figura 2.1).

El glicerol obtenido como subproducto de la reacción de transesterificación, una vez purificado puede utilizado en la producción de compuestos químicos (como propanodiol, 1,3-propanodiol, ácido succínico, poliésteres, ácido láctico, etc.), aditivos de combustible, producción de hidrógeno, producción de etanol o metanol, alimentación animal, entre otros (Leoneti, *et al.*, 2012).

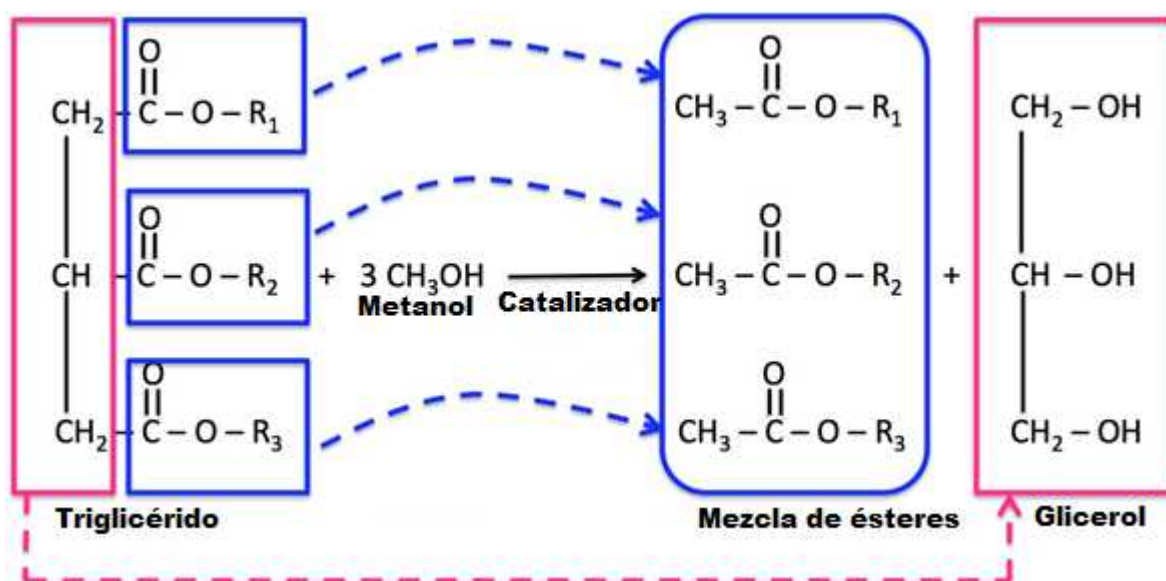


FIGURA 2.1. Reacción de transesterificación.

Estequiométricamente, se necesitan tres moles de alcohol por cada mol de triglicérido, pero en general, se utilizan altas relaciones molares para maximizar la producción de ésteres, dependiendo del tipo de materia prima, cantidad de catalizador, temperatura, etc. Los alcoholes comúnmente utilizados son el metanol, etanol, propanol y butanol. El rendimiento del biodiésel es independiente del tipo de alcohol usado y la selección de uno de estos depende de los costos y el desempeño, es por esto que, debido a su bajo costo y sus ventajas fisicoquímicas

(componente polar y alcohol de cadena corta), el metanol es el más utilizado (Knothe, 2005; Ramadhas *et al.*, 2005; Berrios *et al.*, 2010).

El método más utilizado para la producción industrial de biodiésel es la transesterificación alcalina. Los reactivos empleados en esta reacción son el metanol y catalizadores como el de hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de sodio (NaOH), debido a su bajo costo y a que generan altos rendimientos en cortos tiempos de reacción (Darnoko y Cheryan, 2000; Hameed *et al.*, 2009; Venditti *et al.*, 2009; Ehsan y Chowdhury, 2015).

Una limitante importante de la transesterificación alcalina es que requiere materias primas de alta calidad, ya que la presencia de ácidos grasos libres conduce a la formación de jabón. Para poder hacer uso de materias primas de baja calidad es necesario realizar un proceso en dos etapas, el cual consiste en un pretratamiento ácido para disminuir el contenido de ácidos grasos libres por esterificación, y en seguida, continuar con la transesterificación convencional (Gerpen, 2005).

Actualmente, y derivado de la necesidad de utilizar materias primas de bajo costo, se ha evaluado el uso de diferentes tipos de catalizadores que puedan llevar a cabo la transesterificación sin los inconvenientes de la catálisis alcalina convencional. En general, la producción de biodiésel puede llevarse a cabo por catálisis química con catalizadores homogéneos y heterogéneos ácidos y alcalinos, o por catalizadores enzimáticos (que también son considerados heterogéneos, cuando se encuentran inmovilizados en un soporte) (Leung y Guo, 2006; Rodrigues *et al.*, 2016). Cada una de estas opciones presenta ventajas y desventajas, las cuales se presentan en la Tabla 2.2.

Los parámetros más importantes a tomar en cuenta en la reacción de transesterificación son: humedad y relación molar de los reactivos, concentración de ácidos grasos libres en el aceite (medido como índice de acidez o porcentaje de AGL), temperatura, tiempo de reacción, tipos de alcohol y tipos de catalizador (Alcantara *et al.*, 2000; Çetinkaya y Karaosmanoğlu, 2004).

TABLA 2.2. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de catalizadores usados en la reacción de transesterificación (Leung y Guo, 2006).

	Tipo de catalizador	Ejemplo	Ventajas	Desventajas
Homogéneo	Alcalino	NaOH, KOH	Alta actividad catalítica.	Condiciones anhidras, saponificación, formación de emulsiones.
	Ácido	H ₂ SO ₄	Cataliza la esterificación y transesterificación simultáneamente, evita la saponificación.	Corrosión del equipo, difícil de reciclar, largos tiempos de reacción, débil actividad catalítica.
Heterogéneo	Alcalino	CaO, CaTiO ₃ , CaZrO ₃ , CaO–CeO ₂ , CaMnO ₃ , Ca ₂ Fe ₂ O ₅ , KOH/Al ₂ O ₃ , KOH/NaI, Al ₂ O ₃ /KI.	No corrosivo, reciclable, fácil separación, alta selectividad.	Condiciones anhidras, altas temperaturas y presiones, limitaciones de difusión.
	Ácido	ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ ²⁻ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , Amberlyst-15, Nafion-NR50.	Cataliza la esterificación y transesterificación simultáneamente, reciclable.	Baja microporosidad, limitaciones difusionales.
	Enzimático	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> y lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	Evita la formación de jabón, reduce los pasos de purificación de los productos.	Posible desnaturalización de la enzima por cambios en pH y temperatura, limitaciones difusionales.

El proceso completo de producción de biodiésel incluye la reacción de transesterificación, la separación de la fase rica en éster de la fase rica en glicerol, la purificación de la fase rica en éster (biodiésel), y la recuperación del glicerol de la fase rica en glicerol así como los subproductos. Después de la reacción, la mezcla es dejada sedimentar a temperatura ambiente, el glicerol se deposita en el fondo mientras que la fase éster forma una capa en la parte superior (Haas *et al.*, 2006).

La pureza del biodiésel es una cuestión importante y está claramente especificada en normas tales como la ASTM D6751 en Norte América y EN 14214 en Europa. El objetivo es limitar la presencia de impurezas que pueden afectar el desempeño del motor a corto o largo plazo (Mao *et al.*, 2004).

2.4. Catálisis química

Los catalizadores químicos utilizados en la producción industrial de biodiésel (usualmente NaOH, KOH o metóxido de sodio) proporcionan un rendimiento de reacción de transesterificación cercano a 99%. A pesar de esta excelente productividad, la producción global de biodiésel es relativamente limitada, principalmente debido a inconvenientes como la necesidad de aplicación de aceites refinados de plantas, problemas relacionados con la recuperación de glicerol puro (el principal subproducto), la formación de jabón, mono y diglicerol, dificultad en los procesos de separación y purificación del biodiésel, generación de grandes cantidades de aguas residuales, alto consumo de energía, etc., (Mittelbach, 1996; Ma y Hanna 1999; Fukuda *et al.*, 2001).

Además, el porcentaje de AGL del aceite utilizado para la producción de biodiésel debe ser menor al 0.5%, de lo contrario el rendimiento disminuye (Meher *et al.*, 2006). Otras desventajas son la necesidad de utilizar grandes cantidades de alcohol (el exceso molar debe ser incluso varias docenas de veces más que la del aceite) y la completa remoción de agua de los reactivos (Antczak *et al.*, 2009).

2.4.1. Catálisis homogénea alcalina

Debido a sus características de bajas temperaturas de operación y cortos tiempos de reacción, la catálisis alcalina es la más ampliamente utilizada en la industria. Comparada con la catálisis ácida, ésta es 4000 veces más rápida y requiere una relación molar de reactivos más baja (Kulkarni y Dalai, 2006).

Los catalizadores alcalinos más comúnmente utilizados son el KOH y NaOH, los cuales se caracterizan por tener un alto rendimiento en la producción de biodiésel, son fáciles de obtener y presentan alta conversión en relativamente corto tiempo de reacción (Loterio *et al.*, 2005). El NaOH es más barato y fácil de obtener, por lo que se usa más a menudo, aunque la reacción catalizada por KOH es más rápida (Atadashi *et al.*, 2010).

El metanol es el alcohol más utilizado en la reacción de transesterificación. Varios estudios coinciden en que la relación molar óptima de metanol:aceite es de 6:1; de igual forma, la temperatura de reacción considerada como óptima se encuentra en un rango de 60°C a 70°C (Wang *et al.*, 2007; Ehsan y Chowdhury, 2015).

Algunas de las ventajas generales de la catálisis alcalina son: no requiere de equipos especiales, debido a que las temperaturas de reacción son moderadas y se lleva a cabo a presión atmosférica, y el tiempo de reacción es corto comparado con otros tipos de transesterificación. Por lo tanto, el capital y los costos de operación para las instalaciones de producción de biodiésel por el método de transesterificación alcalina son menores (Demirbas, 2006).

Como desventajas se tiene que éste método utiliza grandes cantidades de energía, el glicerol producido es de baja calidad por lo que el proceso de separación y purificación es difícil y costoso, y es un proceso muy sensible a la pureza de los reactivos, viéndose afectado por el contenido de ácidos grasos libres y agua (Rodrigues *et al.*, 2016). El contenido de ácidos grasos libres no debe exceder ciertos límites, debido a que su presencia puede promover reacciones de saponificación (formación de jabón), lo cual reduce la eficiencia del catalizador, disminuye el rendimiento de ésteres (biodiésel) y dificulta los posteriores procesos de separación (Cao *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010). Se ha reportado que un contenido de AGL superior a 0.5% puede

afectar la eficiencia de la reacción, cuando se utiliza como materia prima un aceite fresco (Freedman *et al.*, 1986); sin embargo, cuando la materia prima es un aceite de cocina usado, el límite de AGL es un poco menos estricto, y un valor ligeramente superior a 1% no tiene efecto en la formación de los metil ésteres (Çetinkaya y Karaosmanoğlu, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Una transesterificación por catálisis alcalina exitosa requiere de: materia prima con bajo contenido de ácidos grasos libres, exceso de alcohol debido a que es el reactivo limitante y tiene baja solubilidad en el aceite, ausencia de humedad debido a que la presencia de agua que favorece la reacción de saponificación, temperatura que favorezca la solubilidad y la energía de activación, aunque debe mantenerse por debajo del punto de ebullición del alcohol (Leung y Guo, 2006).

En el caso de la producción de biodiésel a partir de materias primas con alto contenido de ácidos grasos libres (como las grasas y aceites residuales y los aceites no comestibles), para llevar a cabo la transesterificación alcalina, es necesario realizar un pretratamiento para reducir el contenido de ácidos grasos libres; a menudo este proceso se denomina “proceso integrado” (Gerpen, 2005).

Tiwari *et al.* (2007), evaluaron un proceso integrado para la producción de biodiésel, que consistió en un pretratamiento (esterificación) y posterior transesterificación. Optimizaron los parámetros del proceso de las reacciones de esterificación y de transesterificación, para reducir los ácidos grasos libres (AGL) del aceite de *Jatropha* por debajo de 1% y obtener un máximo rendimiento de biodiésel. En la esterificación de los AGL utilizaron metanol y ácido sulfúrico. Por otro lado, la transesterificación se llevó a cabo con metanol en una relación molar con el aceite de 5:1, y 0.55% KOH, a 60°C y tiempo de reacción de 1.5 h. Las condiciones óptimas para la esterificación fueron: 0.28 v/v metanol-aceite, 1.43% v/v catalizador y tiempo de reacción de 88 min. Observaron que a baja relación metanol-aceite, el valor de la acidez se reduce con el incremento de la cantidad de catalizador y tiempo de reacción. Por otro lado, las condiciones óptimas para la transesterificación fueron: 0.16 v/v metanol-aceite pretratado y tiempo de reacción de 24 min. El rendimiento de biodiésel obtenido fue de 99%.

Por su parte, Alptekin *et al.* (2011) optimizaron la producción de biodiésel a partir de grasa de pollo con alto contenido de ácidos grasos libres, utilizando diferentes catalizadores alcalinos (metóxido de sodio, metóxido de potasio, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio), temperaturas y tiempos de reacción. Debido a la alta concentración de AGL en el aceite, utilizaron un proceso integrado, en el que utilizaron 20% de ácido sulfúrico y relación metanol/aceite de 40:1 (60 °C, tiempo de reacción de 80 min) para la esterificación y en la transesterificación emplearon solución de metóxido de sodio (NaOMe) (30% en metanol) y solución de metóxido de potasio (KOMe) (32% metanol) en una concentración de (%AGL x 0.64)+ 17%, (%AGL x 0.78) + 2%, respectivamente, hidróxido de potasio (KOH) e hidróxido de sodio (NaOH), en una concentración de 1% del peso de aceite + cantidad de neutralización. La relación molar alcohol/aceite de 6:1, temperaturas de 25 y 60°C y tiempos de reacción de 1, 2 y 4 h. La producción de ésteres aumentó con el incremento de la temperatura en todos los casos, pero no cambió significativamente con el tiempo de reacción. Obtuvieron altos rendimientos de ésteres en todos los casos a excepción del catalizado con NaOH a 25 °C. Los rendimientos de biodiésel obtenidos fueron de 71.3% (a 4 h, 25°C y NaOH como catalizador) a 88.5% (a 1h, 60°C y KOMe).

2.4.2. Catálisis homogénea ácida

La materia prima de baja calidad (alto contenido de ácidos grasos y agua), presenta inconvenientes en la catálisis alcalina, por lo que está no es buena opción, debido a la saponificación que sufren los ácidos grasos libres por la presencia del catalizador. En estos casos, la catálisis ácida se presenta como una alternativa para llevar a cabo la transesterificación. Los catalizadores más utilizados en la catálisis ácida son el H₂SO₄ y el HCl (Varanda *et al.*, 2011).

En la catálisis ácida no existe riesgo de producción de jabón, ya que no está influenciada por la presencia de ácidos grasos libres, lo que permite utilizar materias primas de bajo costo, además de que los ácidos pueden catalizar simultáneamente las reacciones de esterificación y transesterificación, por lo que se emplea un proceso de un solo paso. Esta catálisis presenta altos

rendimientos en la producción del biodiésel, la separación biodiésel-subproductos es sencilla, y se genera un glicerol de alta calidad (Wu *et al.*, 1998; Haas *et al.*, 2003; Miao y Wu, 2006).

Como ejemplo, con la transesterificación ácida de un aceite residual de cocina con un contenido de ácidos grasos libres de 59.3%, se ha obtenido un rendimiento de 95%, empleando una relación molar catalizador y metanol/aceite de 1.5:1 y 15:1, respectivamente, a 65°C y 26 h de tiempo de reacción (Haas *et al.*, 2003).

Se ha reportado el estudio de la cantidad de catalizador, temperatura y tiempo de reacción en la producción de biodiésel a partir de sebo de pollo y cordero mediante catálisis ácida. Las condiciones óptimas para este proceso fueron: temperatura de 50 y 60 °C; relación molar metanol/sebo 30:1 y 30:1, cantidad de H₂SO₄ 25% y 50%, con un rendimiento de metil ésteres de 99,01 ± 0,71% y 93,21 ± 5,07%, para sebo de pollo y de cordero, respectivamente, en 24 h de tiempo de reacción (Bhatti *et al.*, 2008).

Los rendimientos de la transesterificación por catálisis ácida se ven fuertemente afectados por la relación molar metanol/aceite, temperatura, cantidad de catalizador y presencia y formación de agua; a temperatura ambiente la reacción es lenta y se obtiene una baja conversión de ésteres; la formación de ésteres aumenta con el aumento en la cantidad de catalizador, y es inhibida por la presencia de agua en el aceite (>0.5%) y por el agua formada durante la reacción (Canakci y Van Gerpen, 1999).

En comparación con la catálisis alcalina, la catálisis ácida requiere una alta concentración de catalizador y de relaciones molares alcohol/aceite, así como altas temperaturas y largos tiempos de reacción, se generan grandes cantidades de aguas residuales durante el lavado, además de que se requieren reactores que sean capaces de soportar los ambientes ácido. Otra desventaja es que el catalizador residual debe ser removido completamente del producto final, ya que de lo contrario existe la posibilidad de que corroa las partes de metal del motor (Gerpen, 2005; Morgenstern *et al.*, 2006).

2.4.3. Catálisis heterogénea ácida y alcalina

El uso de catalizadores homogéneos como KOH, NaOH y H₂SO₄, ha sido exitoso en la producción de biodiésel a escala industrial; sin embargo, el biodiésel y el glicerol producidos tienen que ser purificados para eliminar los residuos de catalizador, siendo necesarios repetidos lavados con agua destilada caliente y/o acidificada o alcalinizada, para remover y/o neutralizar el catalizador. Debido a éstas y otras desventajas previamente mencionadas, ha sido necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de catalizadores que puedan superar dichos obstáculos (Sharma *et al.*, 2008).

La catálisis heterogénea (sólida) ácida o alcalina, se presenta como una alternativa promisoría para la solución integral a los problemas operacionales y ambientales que presenta la producción convencional de biodiésel. Los catalizadores heterogéneos pueden ser separados del producto final por filtración, reduciendo con esto el tiempo invertido en el proceso de purificación y previniendo el consumo de grandes cantidades de agua (Di Serio, 2007).

El catalizador heterogéneo puede ser reutilizado, el producto final es menos corrosivo y en general, todo el proceso es más seguro, más barato y más favorable al medio ambiente. En el caso de los catalizadores sólidos ácidos, éstos tienen ventajas adicionales como ser indiferentes al contenido de ácidos grasos libres y llevar a cabo la esterificación y transesterificación simultáneamente (Dossin *et al.*, 2006).

Dentro de los catalizadores heterogéneos utilizados en la producción de biodiésel se encuentran las zeolitas, hidrocalcitas, y óxidos de metales alcalinotérreos como el MgO, SrO y CaO (Corma *et al.* 1998; Meyer y Hoelderich, 1999; Gryglewicz, 2000; Hattori *et al.*, 2000). En la Tabla 2.3 se presentan la clasificación y otros ejemplos de este tipo de catalizadores.

TABLA 2.3. Clasificación de los catalizadores heterogéneos (Di Serio *et al.*, 2007).

Material	Mezclas
Óxidos de un solo compuesto metálico	Óxidos metálicos alcalinos Óxidos de tierras alcalinas Óxidos de tierras raras ThO ₂ , ZrO ₂ , ZnO, TiO ₂
Zeolitas	Zeolita de intercambio de iones alcalinos Zeolita de soporte de iones alcalinos
Álcali con soporte metálico (o tierras alcalinas metálicas)	Iones metálicos alcalinos en alumina Iones metálicos alcalinos en sílica Metales alcalinos en óxidos de tierras alcalinas Metales alcalinos e hidróxidos de metales alcalinos en alumina
Arcillas metálicas	Hidrotalcitas Crisotilo Sepiolita
No óxidos	Alcóxido alcalino Carbonato alcalino Catalizadores con guanidina

El óxido de calcio ha atraído mucho la atención como catalizador para la producción de biodiésel, debido a que presenta rendimientos comparables a los obtenidos con NaOH, se separa fácilmente del producto debido a su baja solubilidad en metanol y a que puede ser sintetizado de fuentes baratas como piedras calizas e hidróxido de calcio (Di Serio *et al.*, 2007; Kouzu *et al.*, 2008).

La actividad catalítica de CaO ha sido comparada con otras bases sólidas como: óxido de magnesio, hidróxido de calcio y carbonato, en la reacción de transesterificación para la producción de biodiésel a partir de aceite de soya, aceite de cocina usado y metanol, en una relación molar 12:1. En el aceite de soya, la actividad catalítica de los catalizadores tuvo la

siguiente secuencia: $\text{CaO} > \text{Ca(OH)}_2 > \text{MgO} > \text{CaCO}_3$. Se obtuvo un rendimiento del 93% en 1 h y 3.5 h de tiempo de reacción para CaO y Ca(OH)_2 , respectivamente; mientras que con CaCO_3 la reacción no se llevó a cabo. Finalmente, utilizando CaO para la transesterificación del aceite residual de cocina con acidez de 0.5 mg KOH/g y metanol, se obtuvo un rendimiento de 99% en 2 h (Kouzu *et al.*, 2008).

Si bien las ventajas de los catalizadores heterogéneos son remarcables, éstos también tienen algunas desventajas que deben ser mencionadas (Di Serio *et al.*, 2007):

- Resistencia a la transferencia de masa intrapartícula y pérdidas por lixiviación, cuando se encuentran adheridos a un soporte;
- Pérdida de actividad catalítica por saturación y envenenamiento;
- Pérdida del catalizador durante el proceso de separación.

2.5. Catálisis enzimática

El biodiésel puede ser producido por transesterificación enzimática empleando lipasas. Las lipasas, las cuales se utilizan principalmente inmovilizadas (conocidas entonces como biocatalizadores), proporcionan altos rendimientos y selectividad, facilitan la remoción del glicerol y purificación del biodiésel, toleran la presencia de agua en el aceite, tienen bajo consumo de energía (la reacción requiere condiciones moderadas), generan pocas cantidades de residuos, llevan a cabo la esterificación y transesterificación simultáneamente, y realizan reacciones indeseadas, como la saponificación (principal inconveniente de la catálisis alcalina) (Leca *et al.*, 2010).

2.5.1. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasa EC 3.1.1.3) son carboxil estereasas que actúan sobre acil glicéridos de cadena larga. Están clasificadas como serina hidrolasas debido a que son inhibidas por el dietil *p*-nitrofenol fosfato (Chapus y Semeriva, 1976). El sitio activo de las lipasas está formado por una triada catalítica compuesta por serina, histidina y aspartato o

glutamato (Brady *et al.*, 1990; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009), y se encuentra protegido por una tapa o solapa formada por una secuencia de péptido α hélice anfílica (Schmid y Verger, 1998). Catalizan la hidrólisis de grasas y aceites con la subsecuente liberación de ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol, así como varias reacciones de síntesis, como la formación de ésteres de ácidos grasos (Jaeger *et al.*, 1999; Gog *et al.*, 2012).

Estas enzimas son producidas por microorganismos (hongos y bacterias), animales y plantas. Sus preparaciones comerciales se derivan principalmente de fuentes microbianas debido a su bajo costo de producción y fácil modificación de sus propiedades (por métodos genéticos o fisicoquímicos) (Arpigny y Jaeger 1999; Jaeger y Eggert 2002; Gupta *et al.* 2004).

Las lipasas son la única clase de enzimas que llevan a cabo reacciones en medios heterogéneos, asociado a este hecho es que un gran número de lipasas presenta el fenómeno de activación interfacial. Este fenómeno distingue a las lipasas de las esterasas. Para soportar el efecto desnaturalizante de la interfase, las lipasas han desarrollado estructuras inusualmente estables, incluso ante la presencia de solventes orgánicos (Schmid y Verger, 1998).

Las lipasas muestran grados variables de selectividad hacia sus sustratos. Son capaces de catalizar reacciones con un amplio rango de sustratos, pero las velocidades de reacción varían ampliamente con la estructura de las moléculas del mismo, y casi todas las lipasas muestran cierto grado de selectividad por algún ácido carboxílico. La especificidad que presentan las lipasas hacia ácidos grasos y alcoholes específicos, está determinada principalmente por: el impedimento estérico y las interacciones hidrofóbicas (Brockhoff, 1968; Cygler *et al.*, 1994).

Las lipasas exhiben diferentes tipos de especificidad hacia los sustratos, estas son: posicional (regioespecificidad), de sustrato y estérica (estereoespecificidad). De acuerdo a su regioespecificidad con respecto a las cadenas de acilo de los triglicéridos, las lipasas pueden ser divididas en tres grupos principales (Hari y Karanth, 2002; Reis *et al.*, 2009):

- a) Lipasas no específicas: son las que catalizan reacciones en todos los grupos hidroxilo de triglicéridos y de esta forma pueden remover ácidos grasos de cualquier posición. Estas catalizan la ruptura completa del TG a glicerol y ácidos grasos libres (Figura 2.2).
- b) Lipasas con especificidad sn-1,3: solamente catalizan reacciones en grupos hidroxilos primarios del triglicérido, es decir, liberan preferentemente ácidos grasos de las posiciones 1 y 3, para dar ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos (ejemplos, lipasas de *Rhizomucor miehei* y lipasa pancreática) (Figura 2.3).
- c) Lipasas con especificidad de ácido graso: algunas lipasas tienen preferencia por ésteres formados por ácidos grasos de cadena larga con dobles enlaces entre C9 y C10.



FIGURA 2.2. Esquema general de la reacción catalizada por una lipasa no específica (Kapoor y Gupta, 2012).

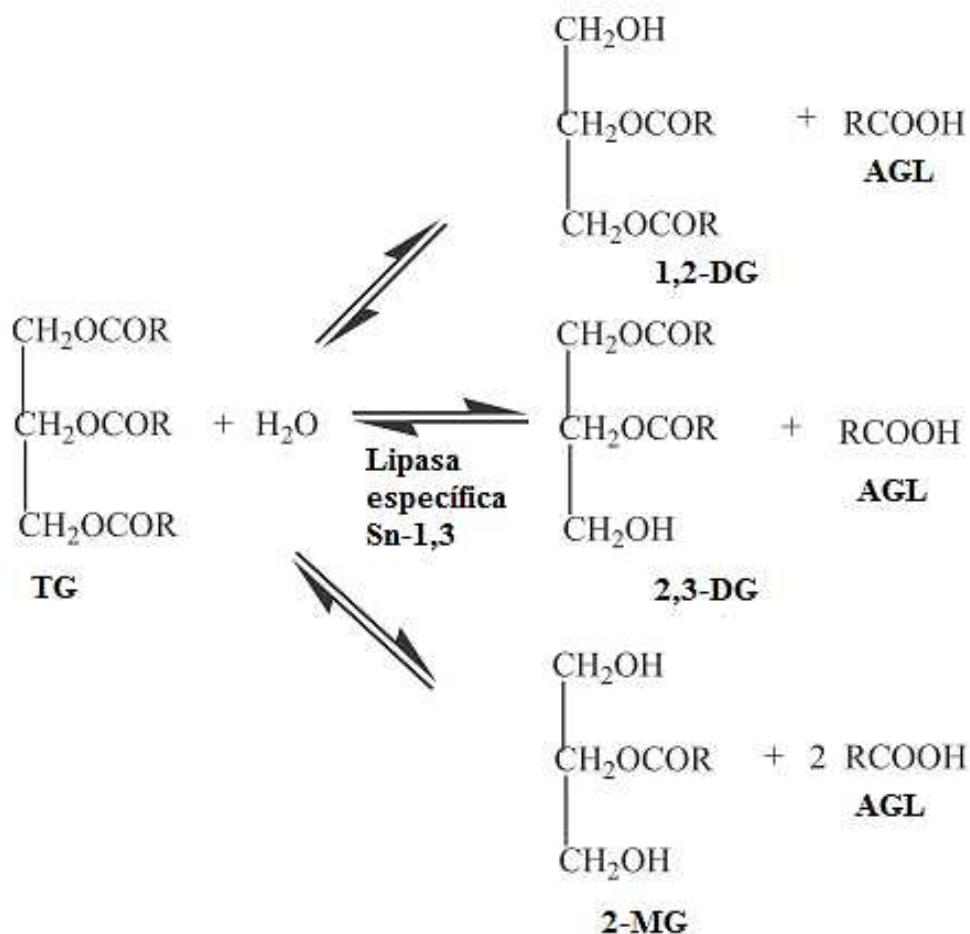


FIGURA 2.3. Esquema general para la reacción catalizada por una lipasa específica sn-1,3. TG, DG, MG y AGL, representan triglicérido, diglicérido, monoglicérido y ácido graso libre, respectivamente (Kapoor y Gupta, 2012).

Especificidad de sustrato: consiste en la capacidad de distinguir características estructurales de las cadena de acilos, tales como longitud, número, posición o configuración de dobles enlaces o la presencia de grupos ramificados, así como también la naturaleza de las fuentes de acilo: ácidos grasos libres, alquil ésteres, éster glicerol, etc. (Antczak *et al.*, 2009).

Algunas lipasas tienen preferencia por ciertos ácidos grasos o grupos de ácidos grasos, por ejemplo, la lipasa de *Aspergillus flavus* muestra una gran preferencia por tricaprina sobre

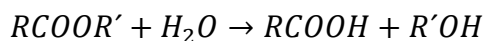
trioleína (Long *et al.*, 1998). Las lipasas de *C. rugosa* y *R. miehei* tienen fuertes preferencias por ácido oleico sobre ácido elaídico, mientras que las lipasas de *C. antarctica* prefieren el ácido elaídico sobre el ácido oleico (Borgdorf y Warwel, 1999).

Las lipasas también exhiben especificidad por la longitud de la cadena del ácido graso, la mayoría de las lipasas prefieren ésteres de ácidos grasos saturados de longitud de cadena media (C4) a cadena larga (C16), pero hay algunas excepciones. Las lipasas de *Penicillium roquefortii* pueden hidrolizar ésteres de cadena corta, pero no ácidos grasos de cadena media o larga (Rangheard *et al.*, 1989), mientras que la lipasa de *R. meihei* puede hidrolizar eficientemente ésteres de ácidos grasos tan grandes como C22 (Hari y Karanth, 2002). Las lipasas también muestran preferencia sobre el tipo de alcohol, en el orden siguiente: alcoholes primarios > alcoholes secundarios > alcoholes terciarios (Kuo y Parkin, 1993).

Estereoespecificidad: se define como la habilidad de las lipasas para distinguir entre las posiciones sn-1 y sn-3 en el triglicérido. Las lipasas pueden presentar una estereoespecificidad insignificante o ser muy estereoespecíficas. La estereoespecificidad de una misma enzima puede variar de acuerdo a la estructura del sustrato (Kapoor y Gupta, 2012).

Las reacciones catalizadas por lipasas pueden ser clasificadas en dos categorías principales (Gandhi, 1997):

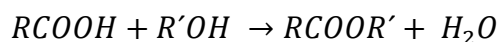
1. Hidrólisis



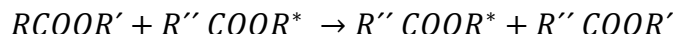
2. Síntesis

Las reacciones de esta categoría pueden ser subclasificadas en:

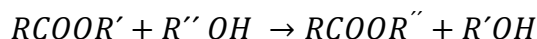
a) Esterificación



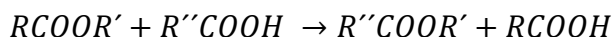
b) Interesterificación



c) Alcohólisis



d) Acidólisis



Las últimas tres reacciones a menudo son agrupadas en el término transesterificación.

Como puede observarse en las ecuaciones anteriores, las lipasas pueden llevar a cabo no solamente reacciones hidrolíticas sino también de síntesis como esterificación, acidólisis y alcoholisis, pueden catalizar reacciones en medios acuosos y orgánicos, tienen una amplia especificidad por sustrato y pueden catalizar una variedad de biotransformaciones químico, regio y enantioselectivas (Hasan *et al.* 2006; Ghanem, 2007).

Esta versatilidad de las lipasas las hace las enzimas de elección para aplicaciones en alimentos, detergentes, farmacéutica, piel, textil, cosméticos e industrial del papel (Houde *et al.*, 2004; Contesini *et al.*, 2010; Guncheva y Zhiryakova, 2011).

En la Tabla 2.4 se presentan algunas aplicaciones industriales de las lipasas.

TABLA 2.4. Algunas aplicaciones industriales de las lipasas (Kapoor y Gupta, 2012).

Reacción	Industria	Producto/ aplicación
Hidrólisis de grasas	Detergente	Remoción de manchas de aceites
Hidrólisis de grasa de leche, maduración de queso	Lácteos	Desarrollo de agentes saborizantes en leche, queso y mantequilla
Hidrólisis	Panadería, cervecería y alimentos	Mejoramiento de sabor y calidad en bebidas, carne, productos de pescado.
Hidrólisis	Piel	Productos de piel
Hidrólisis	Papel	Papel con calidad mejorada
Transesterificación de grasas /aceites	Aceites naturales	Manteca de cacao
Esterificación y transesterificación	Sabor y fragancia	Síntesis de esteres naturales del sabor
Glicerólisis de grasas/aceites	Surfactantes	Monoglicéridos para surfactantes
Resolución de mezclas racémicas	Drogas y farmacéuticas	Bloques de construcción para medicamentos quirales e insecticidas
Transesterificación	Combustibles	Biodiésel
Acilación de alcoholes de azúcar	Surfactantes	Esteres monoacilados de azúcar para surfactantes

2.5.2. Mecanismo de acción de las lipasas

El mecanismo de las lipasas comienza con la activación de la serina por desprotonación, para lo que se requiere la participación de los residuos de aspartato e histidina. Una vez activa, el grupo hidroxil del residuo de serina realiza un ataque nucleofílico en el carbono del enlace éster del sustrato susceptible. Esto resulta en la formación de un intermediario tetraédrico, el cual pierde entonces una molécula de alcohol para dar un intermediario acil-enzima. Una molécula de agua ataca entonces el complejo (ataque nucleofílico) para dar un segundo intermediario tetraédrico, el cual finalmente pierde una molécula de ácido para dar la enzima en su forma nativa (Figura 2.4) (Reis *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011).

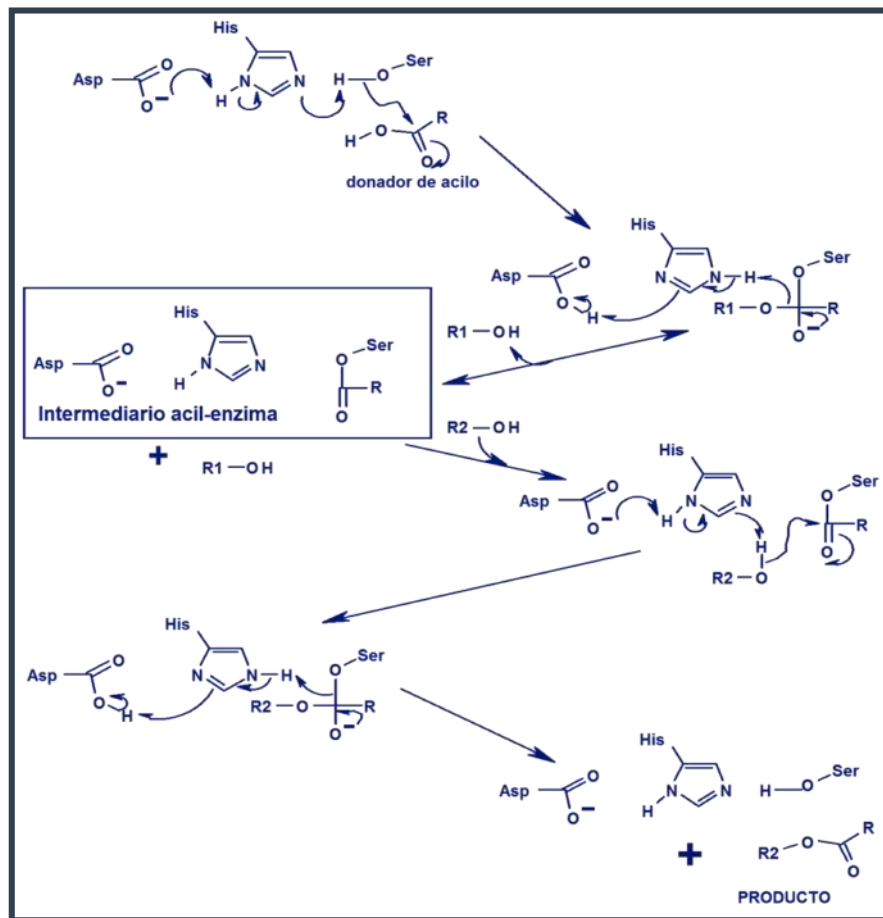


FIGURA 2.4. Mecanismo de acción de las lipasas (adaptado de Reis *et al.*, 2009).

2.5.3. Activación interfacial

A través de técnicas cristalográficas se han obtenido dos conformaciones diferentes de lipasas: abierta y cerrada. En medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada tapa (flat o lid) (Figura 2.5a), haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas (Palomo *et al.*, 2003).

Por otro lado, cuando la enzima se cristaliza en presencia de sustratos de gran tamaño, se obtiene una conformación totalmente distinta, lo que se denomina lipasa abierta, en la cual la tapa se ha desplazado, interaccionando por medio de puentes salinos, puentes de hidrogeno etc. con otra zona de la superficie de la lipasa, dejando libre el centro activo de la enzima (Figura 2.5b) (Palomo *et al.*, 2003).

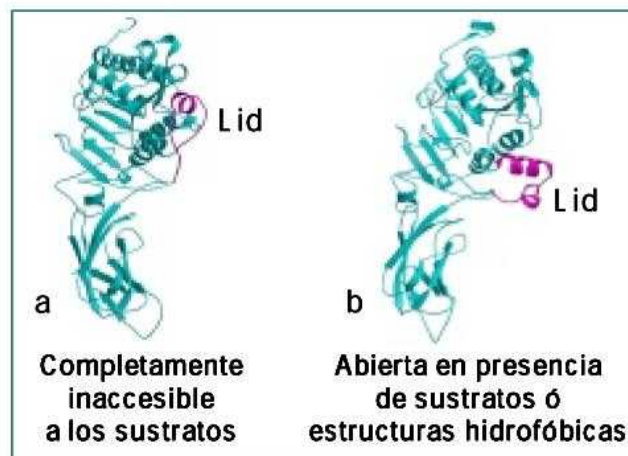


FIGURA 2.5. Distintas conformaciones de lipasas (Palomo *et al.*, 2003)

Estos datos han permitido establecer que en el mecanismo catalítico de las lipasas ocurre lo que se denomina “Activación interfacial” (Palomo *et al.*, 2004).

Durante la activación interfacial, el fragmento α helicoidal (llamado tapa) que cubre el sitio activo de las lipasas, sufre un desplazamiento (se abre), permitiendo el acceso al sitio activo (Brzozowski *et al.*, 1991). En otras palabras, ante la presencia de una superficie hidrofóbica (por ejemplo una gota de aceite), la tapa de las lipasas se aleja y cambia de la forma “cerrada” a su conformación “abierta” y permite la interacción entre su cara interna hidrofóbica y los residuos hidrofóbicos que usualmente rodean el sitio activo de la lipasa, con el sustrato (Figura 2.6) (Uppenberg *et al.*, 1994; Carrasco-Lopez *et al.*, 2009). La tapa puede ser muy pequeña, como en el caso de lipasa B de *C. antarctica* que no aísla completamente el centro activo del medio, o muy complejo, como la doble tapa descrita para la lipasa termoalcalina de *Geobacillus thermocatenulatus* (Carrasco-Lopez *et al.*, 2009).

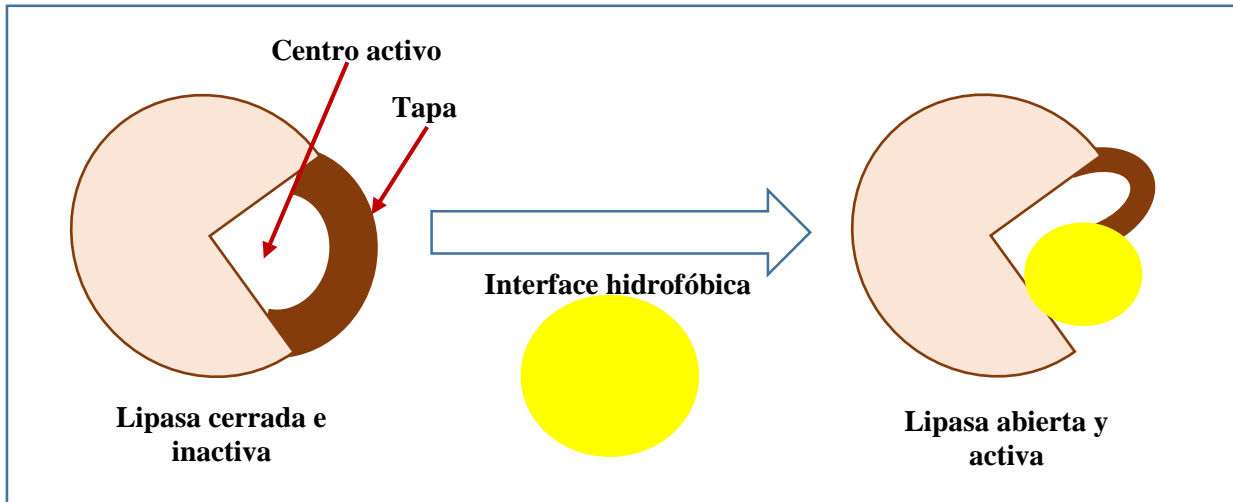


FIGURA 2.6. Activación interfacial de las lipasas en presencia de superficies hidrofóbicas.

La conformación abierta de las lipasas muestra al medio un gran bolsillo hidrofóbico, constituido por la cara interna de la tapa y toda la zona hidrofóbica que rodea al centro activo, que muestra una gran afinidad por la superficie hidrofóbica del sustrato natural, las gotas de aceite y grasa emulsionadas o no. Este gran bolsillo hidrofóbico hace que la conformación abierta de las lipasas tenga una gran afinidad por cualquier tipo de superficie hidrofóbica (Palomo *et al.*, 2004).

De hecho, se ha reportado que las lipasas se adsorben a varias estructuras hidrofóbicas: gotas de grasa, soportes hidrofóbicos, burbujas de aire, otras proteínas, etc. (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006)

2.5.4. Inmovilización de lipasas

En la mayoría de los casos, la inmovilización de las enzimas es un requisito para su uso como biocatalizadores industriales, ya que permite el fácil reuso del mismo y simplifica el diseño total y el control del desempeño de los bioreactores. La inmovilización enzimática en un soporte sólido es una importante tecnología para la estabilización y en algunos casos, el mejoramiento de la actividad del biocatalizador. Este proceso depende de las interacciones físicas y químicas que ocurren entre el soporte y las moléculas de enzima (Garcia-Galan *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013), y proporciona un biocatalizador heterogéneo y reutilizable, preservando la actividad durante varios ciclos de reacción (Du *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2012).

La inmovilización en muchos casos está asociada con una disminución de la actividad enzimática o empeoramiento de otras características catalíticas; sin embargo, algunos reportes en la literatura muestran cómo la inmovilización de una enzima puede también mejorar su actividad (velocidad e reacción por mg de enzima), especificidad (discriminación entre sustratos) y selectividad (producción de uno entre muchos posibles productos). Estas mejoras deben ser consideradas en cualquier caso más una excepción que una regla, ya que en la mayoría de los casos la enzima inmovilizada exhibirá un desempeño catalítico menor (Rodrigues *et al.*, 2013).

La inmovilización de una enzima dentro de un soporte poroso puede tener varios efectos protectores en la estructura de la misma bajo diferentes situaciones. Por ejemplo, muchos detergentes pueden producir una disminución de la actividad enzimática por inhibición o distorsión de la enzima, y si ésta se encuentra dentro de los poros de un soporte, puede ser parcialmente protegida de esta causa de pérdida de actividad (por ejemplo, las micelas pueden tener más problemas al penetrar en los poros). Un efecto similar puede ser producido si la enzima es sujeta a agitación fuerte capaz de inactivarla (ejemplo, para dispersar el sustrato o

introducir oxígeno en el sistema, etc), una enzima dentro de los poros de un soporte también será protegida de este efecto negativo (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia et al. 2011).

La inmovilización puede llegar a ser una herramienta para asegurar la forma abierta de las lipasas. Se ha demostrado que esto puede ser logrado fácilmente por inmovilización de la enzima en soportes hidrofóbicos en presencia de baja fuerza iónica (Figura 2.7) y también por entrecruzamiento y liofilización en presencia de detergentes (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

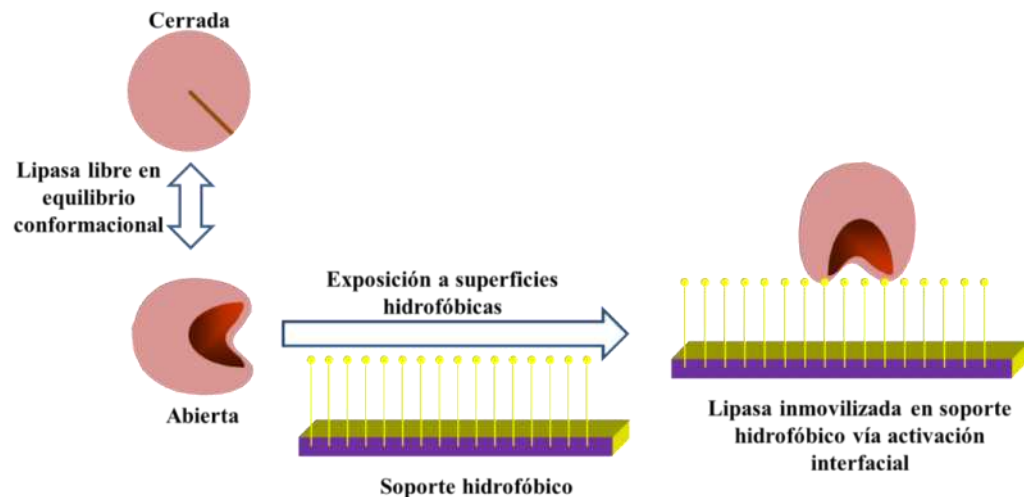


FIGURA 2.7. Inmovilización de lipasas en soportes hidrofóbicos (Tacias-Pascacio *et al.*, 2016).

Las lipasas tienen tendencia a formar agregados bimoleculares, interconectando el sitio activo de dos formas abiertas de lipasas. Esta conformación de enzima tiende a ser menos activa que la forma monomérica, porque el centro activo de la lipasa está parcialmente bloqueado. La adsorción en soportes hidrofóbicos genera una forma abierta dispersada, evitando la formación de estos dímeros. Así, en este caso, la actividad enzimática observada es mejorada por desplazamiento del equilibrio hacia la forma monomérica abierta de las lipasas (Palomo *et al.* 2003).

Se ha reportado que cambiando la hidrofobicidad y morfología del soporte, es posible tener una forma abierta óptima de la lipasa, con una actividad incluso mayor que la de la enzima adsorbida en gotas de sustratos insolubles (Garcia-Galan *et al.*, 2011).

Después del proceso de inmovilización, el sitio activo de las lipasas permanece en estrecho contacto con el soporte, el cual proporciona un ambiente hidrofóbico. Así, las características del soporte tales como hidrofobicidad y morfología interna, pueden cambiar la intensidad de adsorción de la lipasa sobre el soporte, incluyendo cambios alrededor del sitio activo, modificando de este modo las características catalíticas del biocatalizador final (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008).

2.5.5. Lipasas en la producción de biodiésel

Los procesos químicos para la producción de biodiésel se caracterizan por su alto consumo de energía y por la generación de subproductos indeseables, tales como jabones y pigmentos poliméricos que retardan el proceso de separación y purificación de los metil ésteres (Antczak *et al.*, 2009).

En comparación con los catalizadores químicos tradicionales, los catalizadores enzimáticos tienen las ventajas de mayor compatibilidad con las variaciones en la calidad de la materia prima; condiciones suaves de reacción; bajo consumo de energía; fácil remoción y reuso del biocatalizador; simplificación de la recuperación y purificación de productos; tolerancia a la presencia de agua y ácidos grasos libres en los reactivos; debido a su alta selectividad no generan productos indeseables como el jabón producido en la catálisis alcalina; y generan bajas cantidades de efluentes, por lo que es considerado un proceso amigable con el medio ambiente (Harding *et al.*, 2008; Dabdoub *et al.*, 2009; Tongboriboon *et al.*, 2010; Sharma y Kanwar, 2014).

Por otro lado, las principales razones por las que las lipasas no son utilizadas en la producción industrial de biodiésel, son su alto costo y largos tiempos de reacción comparados con los catalizadores alcalinos (Chen *et al.*, 2009; Poppe *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016).

Los pros y contras del uso de lipasas como biocatalizadores en comparación con la catálisis química (ácida y alcalina) para la producción de biodiésel, se resumen en la Tabla 2.5.

TABLA 2.5. Comparación de la catálisis enzimática y la catálisis química (ácida y alcalina) para la producción de biodiésel (Robles-Medina *et al.*, 2009).

Parámetro	Proceso enzimático	Proceso químico	
		Proceso alcalino	Proceso ácido
Contenido de AGL en la materia prima	Los AGL se convierten en biodiésel	Formación de jabón	Los AGL se convierten en biodiésel
Contenido de agua en la materia prima	No es perjudicial para la lipasa	Formación de jabón. Hidrólisis de triglicéridos resultando en más jabón	Desactivación del catalizador
Rendimiento de biodiésel	Alto, usualmente alrededor de 90%	Alto, usualmente >96%	Altos rendimientos (>90%) solamente para altas relaciones molares metanol:aceite, concentración de catalizador y temperatura.
Velocidad de reacción	Baja	Alta	Más baja que para procesos alcalinos
Recuperación de glicerol	Fácil, glicerol de alta pureza	Compleja, glicerol de baja pureza	Compleja, glicerol de baja pureza
Recuperación del catalizador y reuso	Fácil	Difícil, neutralizado por un ácido	Difícil, el catalizador termina en los subproductos

Continúa **TABLA 2.5**

Costos energéticos	Bajo, temperatura de 20-50 °C	Medio, temperatura de 60-80 °C	Alto, temperatura >100°C
Costo del catalizador	Alto	Bajo	Bajo (alto costo de equipamiento debido a la corrosividad del ácido)
Impacto ambiental	Bajo, el tratamiento de aguas residuales no es necesario	Alto, es necesario el tratamiento de aguas residuales	Alto, es necesario el tratamiento de aguas residuales

La mayoría de las enzimas utilizadas en la producción de biodiésel son lipasas no específicas. Ejemplos de este tipo de enzimas son las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* y *Candida cylindracea*; sin embargo, existen algunas excepciones, como es el caso de lipasas específicas sn-1,3, como la de *R. oryzae*, *Mucor miehei* y *Thermomyces lanuginosus* que catalizan eficientemente la reacción de transesterificación y sus rendimientos exceden los máximos teóricos (66%). Esta alta productividad de la reacción resulta de la migración del residuo acilo de la posición sn-2 a posiciones terminales del glicerol (sn-1 y sn-3) (Antczak *et al.*, 2009).

El glicerol, el cual es el principal subproducto de la reacción de transesterificación, es una de las principales limitantes de la transesterificación catalizada por lipasas, ya que se adsorbe en el soporte de inmovilización, causando desactivación de la enzima y disminuyendo la eficiencia del proceso (Hama *et al.*, 2011). Una forma de evitar este problema es mediante el uso de lipasas regioselectivas sn-1,3, para sintetizar biodiésel y monoacilgliceroles (no glicerol), simultáneamente. Los monoacilgliceroles obtenidos pueden ser utilizados como emulsificantes en industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Verdugo *et al.*, 2010; Canet *et al.*, 2014; Calero *et al.*, 2015).

Una lipasa regioespecífica sn-1,3 de *Carica papaya* inmovilizada en Lewatit VP OC 1600 fue utilizada en la producción de biodiésel a partir de aceite de *Jatropha*. Las condiciones de reacción fueron 5% de biocatalizador (con respecto al peso del aceite), una relación molar metanol:aceite de 3:1 (agregado en siete porciones) y 4% de agua, generando un rendimiento de metil ésteres de aproximadamente 60% (muy cercano al rendimiento teórico de 67%) después de 4 h de reacción a 30°C, sin la aparición de glicerol por la no existencia de migración de acilos (Rodrigues *et al.*, 2016).

Por otro lado, la regioselectividad hacía un tipo de ácido graso puede ser vista como un inconveniente, ya que en la mayoría de los casos limita el rendimiento de ésteres a 67% (rendimiento teórico), y es dependiente del tipo de aceite o grasas que se use como sustrato. Es por esta razón que se han realizado numerosas investigaciones en búsqueda de mejores fuentes de lipasas que permitan obtener óptimas velocidades de reacción y conversión para un sustrato específico (Moreira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). Los aceites vegetales son sustratos heterogéneos, que contienen triglicéridos formados por diferentes ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos e incluso ácidos grasos libres. Por lo tanto, es difícil encontrar una lipasa que trabaje de forma óptima para todos los sustratos disponibles (Rodrigues y Ayub, 2011).

Basados en lo anterior, Poppe *et al* (2015) exploraron el concepto de combi-lipasas (mezcla de lipasas), para la producción de biodiésel. Como sustrato utilizaron aceite de oliva y aceite de palma y etanol, y como biocatalizadores las lipasas comerciales Novozyme 435 (CALB), Lipozyme TL-IM (TLL) y Lipozyme RM-IM (RML), las cuales fueron usadas de forma individual (para comparación) y como mezclas. Para el aceite de oliva la mejor combinación de lipasas fue 29% de TLL, 12.5% de RML, y 58.5% de CALB, permitiendo un rendimiento de 95% en 18 h de reacción, comparado con un rendimiento del 50% proporcionado por la mejor lipasa individual CALB. Para el aceite de palma la mejor combinación de enzimas fue 52.5% de TLL y 47.5% de RML, resultando en un 80% de conversión en 18 h, comparado con el 44% que proporcionó TLL, la mejor lipasa individual para este aceite.

La transesterificación catalizada por lipasas es aplicable a aceites refinados y crudos, ácidos grasos libres, grasas residuales de cocina, sebo y otras grasas animales residuales, y varios alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol. A diferencia de la catálisis química, en la catálisis enzimática la presencia de agua en bajas concentraciones, lejos de ser perjudicial para la reacción, puede tener un efecto positivo en la productividad de biodiésel. Además, la presencia de ácidos grasos libres no es un inconveniente para esta catálisis, ya que las lipasas tienen la capacidad de transformar en biodiésel tanto a los triglicéridos (transesterificación) como los ácidos grasos libres (esterificación) (García-Galan *et al.*, 2011).

La lipasa inmovilizada Novozyme 435 (lipasa B de *Candida antarctica*), considerada uno de los mejores biocatalizadores, fue utilizada para convertir el aceite crudo de palma, que contiene tanto triglicéridos como ácidos grasos libres, en biodiésel. Se evaluaron tres métodos para llevar a cabo la transesterificación, el primero fue un sistema en presencia de un cosolvente (t-butanol), en el segundo se utilizó una solución de cloruro de litio (LiCl), y el tercero fue un sistema libre de solvente con tres adiciones sucesivas de metanol. Se encontró que la relación molar óptima de metanol:aceite fue de 6:1, 3:1 y 3:1, para los métodos 1, 2 y 3, respectivamente. Los rendimientos de biodiésel en condiciones óptimas de relación molar metanol:aceite alcanzaron 91-92% después de 10, 20 y 24 h, en los métodos 1, 2 y 3, respectivamente (Talukder *et al.*, 2009).

La lipasa inmovilizada *Candida sp.* 99.125 fue utilizada para la síntesis de metil ésteres a partir de manteca de cerdo (Lu *et al.*, 2007). Estos investigadores estudiaron el efecto de la temperatura, contenido de agua, presencia de solvente y la adición de metanol en tres etapas. Las condiciones óptimas encontradas fueron: 20% de lipasa inmovilizada y 20% de agua, ambas basadas en el peso del aceite, 8 ml de n-hexano, temperatura de 40°C y adición de metanol en tres etapas. Como resultado obtuvieron un rendimiento de metil ésteres de 87.4%, mismo que se conservó durante 180 h de uso repetido de la enzima.

Dentro de los factores cruciales que afectan la producción enzimática de biodiésel se encuentran la elección de la materia prima y la selección de la lipasa (modificada para mejorar

su estabilidad y eficiencia catalítica), seguidos de la selección de solvente orgánico, optimización de las relaciones molares de sustratos, temperatura, actividad de agua, pH del microambiente de la enzima y la máxima cantidad permisible de glicerol en los productos de reacción (Antczak *et al.* 2009, Leca, Tcacenco *et al.* 2010).

Los alcoholes usados en la producción de biodiésel comprenden metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. Entre estos alcoholes, el metanol y el etanol son los más utilizados, debido a que son los más baratos y producidos a gran escala. Una desventaja de estos dos alcoholes es que son fuertes agentes desnaturalizantes e inactivan enzimas (Nelson *et al.*, 1996), además de que su solubilidad en el aceite es baja. Este inconveniente puede ser superado con el uso de cosolventes, los cuales sirven para la creación de una sola fase, permitiendo con esto la aceleración de la reacción (Boocock *et al.*, 1998; Boocock, 2003).

La síntesis enzimática de biodiésel puede ser llevada a cabo en sistemas libres (solamente la mezcla de sustratos) o con solventes orgánicos. Generalmente, en sistemas de solventes orgánicos, la cantidad completa de alcohol se agrega al inicio de la reacción, sin que esto le afecte a las lipasas. Por otro lado, en sistemas libres de solventes, el alcohol debe ser agregado por etapas, en pequeñas porciones, para mantener una concentración baja y evitar de este modo la inhibición o inactivación enzimática (Shimada *et al.*, 2002). En la Tabla 2.6, se presentan algunas fuentes microbianas de lipasas que han sido utilizadas en la producción de biodiésel en sistemas con o sin solvente, la mayoría de ellas son preparaciones comerciales de enzimas extracelulares, las cuales fueron inmovilizadas en diferentes soportes.

La selección de uno u otro sistema (con o sin solvente) está basada en la estabilidad operacional de la enzima, es decir, en el tiempo que es capaz de catalizar la transesterificación, misma que se ve fuertemente afectada por la estructura y la concentración del alcohol. El exceso molar de alcohol sobre el contenido de ácidos grasos en los triglicéridos siempre incrementa los rendimientos de la transesterificación, pero puede también inactivar la enzima, en particular cuando el alcohol es insoluble en la mezcla de reacción (forma emulsión y el tamaño de las gotas depende de la intensidad de agitación). El metanol y aceites vegetales forman una solución

cuando su relación molar es cercana a 1:1 (a 40 °C). La adición de solventes orgánicos a esta mezcla incrementa la solubilidad del alcohol (por lo tanto puede ser usado a mayores concentraciones) y la velocidad de la reacción, protege la enzima de la inactivación y asegura la transesterificación enzimática en una etapa (Soumanou y Bornscheuer, 2003).

TABLA 2.6. Productores microbianos de lipasas usadas en estudios de producción de biodiésel en sistemas libres o con solvente (Antczak *et al.*, 2009)

Reacción con solvente orgánico	Sistema libre de solvente
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Candida antarctica</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Mucor miehei</i>
<i>Mucor miehei</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>

Los solventes orgánicos hidrofóbicos, tales como el isooctano, n-heptano, éter de petróleo, n-hexano y ciclohexano, son los más recomendados para ser usados en la síntesis de biodiésel (Li *et al.*, 2006). Los solventes orgánicos hidrofílicos interactúan fuertemente con la capa esencial de agua que cubre las moléculas de enzima y por lo tanto estos son menos útiles en las reacciones de síntesis catalizadas por enzimas (Royon *et al.*, 2007).

El uso de solventes orgánicos mejora la estabilidad operacional de la lipasa y elimina la necesidad de añadir el alcohol por etapas (particularmente el metanol, el cual inactiva rápidamente a las enzimas). Sin embargo, la remoción de los solventes orgánicos al terminar la

reacción implica una etapa adicional para recuperar y reciclar el solvente, además de que propiedades como la volatilidad, flamabilidad y toxicidad de solventes orgánicos pueden afectar el escalamiento de la producción de biodiésel; por estas razones la transesterificación enzimática en sistemas libres de solventes, se ha investigado intensamente (Ognjanovic *et al.*, 2009).

Si bien el exceso molar de alcohol favorece el rendimiento de la transesterificación, también se obtienen altos rendimientos en concentraciones estequiométricas de sustratos. Por ejemplo, la transesterificación catalizada por una lipasa de *P. fluorescens* utilizando una relación molar metanol:aceite de 3:1 (en hexano), se obtuvo una conversión de 72% en 24 h. Bajo las mismas condiciones, los rendimientos de reacción catalizada por lipasas inmovilizadas de *Rhizopus miehei*, *T. lanuginosa* y *P. cepacia* fueron cercanos a 80% en 48 h de reacción (Soumanou y Bornscheuer 2003).

La temperatura óptima para la actividad de varias lipasas usadas en la transesterificación de aceites con metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol en hexano oscila entre 30°C y 55°C; en el caso de las temperaturas óptimas para transesterificación en sistemas libres de solventes, éstas se encuentran prácticamente en el mismo rango (30-50°C) (Antczak *et al.*, 2009). Se ha reportado, que en la síntesis de biodiésel catalizada por *T. lanuginosa* IM (a una relación molar de sustratos de 1:1) se produjo un incremento en la velocidad de la reacción cuando la temperatura se incrementó gradualmente de 30 a 40 °C. Sin embargo, un incremento de temperatura hasta 50 °C no aumentó la velocidad de la reacción, además de que cuando la relación molar de alcohol fue mayor, el incremento de la temperatura tuvo un efecto adverso, causando una desactivación más rápida de la lipasa (Xu, 2004). Puede decirse entonces, que la temperatura óptima para la transesterificación enzimática resulta de la interacción entre la estabilidad operacional del biocatalizador y la velocidad de transesterificación, siendo también dependiente de la relación molar alcohol:aceite, tipo de solvente orgánico y termoestabilidad de la preparación enzimática (Antczak *et al.*, 2009).

El contenido de agua en una mezcla de reacción puede ser expresado como actividad de agua (aw) o concentración (%), siendo esta última más recomendado ya que el agua es usualmente agregada al sistema para incrementar la eficiencia catalítica de la enzima y su

concentración también debe ser optimizada, para mantener la hidrólisis de enlaces éster al mínimo nivel, asegurando de este modo el mayor grado de transesterificación y por lo consiguiente de rendimiento de la reacción (Shimada *et al.*, 2002; Noureddini *et al.*, 2005; Shah y Gupta 2007).

En la transesterificación de aceite de soya catalizada por lipasa de *P. cepacia* (en sistema libre de solvente) con metanol y etanol, se encontró que un incremento en el contenido de agua inicial de 0.01 a 2 g incrementa la concentración de ácidos grasos libres. Además, una reacción de etanólisis observaron una disminución en la síntesis de ésteres cuando el contenido de agua estuvo por arriba del óptimo (0.2-0.5g), mientras que para la metanólisis la adición de 0.01-0.2 g de agua resultó en un incremento del contenido de ácidos grasos libres, pero no disminuyó el rendimiento de transesterificación (Noureddini *et al.*, 2005) .

Por otro lado, se reportó en la transesterificación de aceite de *Jatropha* con etanol catalizada por *P. cepacia*, que una mayor cantidad de agua añadida en un rango de 1-10% (p/p de enzima) incrementó el rendimiento de la transesterificación. Después de 5 h alcanzó un 98% de conversión para 5% de agua, mientras que sin agua añadida la conversión fue solo de 70% (Shah y Gupta 2007).

Los numerosos estudios que se han realizado acerca de la producción de biodiésel mediante el uso de biocatalizadores indican que, sin bien los resultados reportados son útiles para tener un punto de partida, es necesario encontrar la relación molar óptima de sustratos para cada sistema dado: alcohol-aceite-enzima.

Independientemente del tipo de catálisis utilizada, al concluir la reacción es necesario llevar a cabo procesos de separación y purificación de biodiésel obtenido; sin embargo, el tipo y número de operaciones unitarias utilizadas para este fin, si dependen del tipo de catalizador y de la materia prima utilizada. Es sabido que, a diferencia de los catalizadores enzimáticos, los catalizadores químicos conducen a la formación de subproductos, sobre todo cuando se utilizan aceites residuales, por lo que es de esperarse que su proceso de purificación sea más complejo.

2.6. Separación y purificación del biodiésel

Los principales inconvenientes que limitan la producción comercial del biodiésel incluyen el costo de las materias primas, la presencia de ácidos grasos libres y agua en los aceites y el uso de altas relaciones molares de alcohol. En la transesterificación alcalina, la presencia de moléculas de agua reduce la efectividad catalítica mientras que los ácidos grasos libres favorecen la formación de jabón. Este proceso disminuye el rendimiento de ésteres y vuelve la purificación del biodiésel difícil y costosa (Atadashi *et al.*, 2010).

El uso de aceites refinados tiende a facilitar las dificultades encontradas durante la separación y purificación del biodiésel crudo, y provee un biodiésel con mejores propiedades fisicoquímicas como viscosidad, punto de inflamación, densidad, etc. Sin embargo, el uso de aceites vegetales no refinados como materia prima en la producción de biodiésel genera grandes dificultades en el proceso de purificación, dando como resultado un producto de baja calidad (Atadashi *et al.*, 2010).

Los productos crudos de la transesterificación consisten principalmente de alquil ésteres de ácidos grasos (biodiésel), y otros productos secundarios como jabón, diglicéridos, monoglicéridos, glicerol (mayor producto secundario), alcohol, catalizador, en diferentes concentraciones. El principal objetivo en la purificación del biodiésel crudo es remover los alquil ésteres de ácidos grasos de la mezcla de reacción, y mantener bajos costos de producción así como también, asegurar alta pureza del biodiésel producido (Atadashi *et al.*, 2012).

La pureza y calidad del biodiésel está determinada por la cantidad de glicerol libre y ligado. La combustión de estas sustancias en motores de encendido por compresión puede favorecer la formación de sustancias indeseables tales como acroleína, un ingrediente fotoquímico del smog (Cheng *et al.*, 2009). Las normas ASTM D6751 y EN14214 limitan el glicerol libre al $\leq 0.02\%$ en masa (Meher *et al.*, 2006). Para deshacerse de estos contaminantes se han empleado muchas técnicas para purificación y separación del biodiésel tales como sedimentación gravitacional, destilación, evaporación, lavado con agua o con agua ácida, adsorbentes, y más recientemente también se ha estudiado la implementación de la tecnología de membranas.

La sedimentación gravitacional se basa en la diferencia de densidad entre la fase no polar rica en éster y la fase polar rica en glicerol/metanol. La sedimentación por centrifugación también se usa en el lavado con agua para acelerar la separación de impurezas. En este proceso la fase menos densa (éster) es separada en la superficie, y debido a que el glicerol es insoluble en la fase éster y soluble en agua, casi todo el glicerol es fácilmente removido. Se requiere un suficiente tiempo de residencia para que la fase éster flote en la superficie del agua. Sin embargo, este método es menos eficaz para hacer frente a las emulsiones de agua que contienen gotitas muy pequeñas de éster, y el tiempo para separar completamente de las emulsiones de éster puede tardar varias horas, días o incluso nunca puedan separarse. La desventaja de la centrífuga es su costo inicial, y la necesidad de un mantenimiento considerable. La destilación al vacío se puede utilizar para eliminar el metanol y el agua de la fase éster para cumplir con las normas, ya que el nivel de metanol residual en los ésteres debe ser muy bajo. El nivel de alcohol permitido es especificado en los estándares europeos de biodiésel (0.2% en masa máximo) (Saleh *et al.*, 2010).

La adición de agua a la fase éster permite que el jabón, residuos del catalizador y pequeñas cantidades de glicerol, diglicéridos y monoglicéridos puedan ser removidos. La separación de la fase de éster de la fase acuosa es usualmente difícil, y este paso produce una gran cantidad de agua residual que contiene metanol; por cada litro de biodiésel, se producen aproximadamente 10 L de aguas residuales (Karaosmanoğlu *et al.*, 1996). Después de la etapa de lavado, el agua que contiene el metanol extraído y el catalizador residual debe evaporarse para recuperar el metanol y el agua. En algunos casos este proceso de recuperación no es llevado a cabo, resultando en pérdidas de producto y reactivos. En la Tabla 2.7 se presenta una comparación entre las tecnologías utilizadas en la separación y purificación del biodiésel.

La pureza del biodiésel debe ser alta y tienen que ajustarse a las especificaciones internacionales. De acuerdo con los estándares de la Unión Europea, los contenidos de agua, ácidos grasos libres, y glicerina libre y ligada, deben estar en un nivel mínimo y la pureza del combustible debe exceder el 96.5% (Karaosmanoğlu *et al.*, 1996).

TABLA 2.7. Comparación de diferentes tecnologías de separación y purificación de biodiésel
(adaptado de Atadashi *et al.*, 2010).

Catalizador	Método de separación	Método de purificación	Aplicación	Ventajas/ Desventajas
Óxido sólido	Sedimentación por gravedad	Evaporación	Remoción de metanol	Menor consumo de energía
Hidróxido de sodio	Irradiación con microondas	Lavado con agua	Remoción de exceso de metanol y catalizador	Gran cantidad de desperdicio de agua y el consumo de energía
Metóxido de sodio	Centrifugación	Destilación/ neutralización /lavado con agua	Recuperación de metanol, remoción de exceso de metanol y catalizador	Energía y agua residual
Hidróxido de sodio	Sedimentación por gravedad	Neutralización con ácido / lavado con agua caliente	Remoción de metanol, catalizador residual y jabón	Alto consumo de energía y agua
Ácido/ hidróxido de potasio	Centrifugación	Lavado con agua destilada caliente	Remoción de metanol residual y otros contaminantes	Alto consumo de agua y energía
Hidróxido de sodio	Filtración con membrana	Neutralización/membrana/ lavado con agua	Remoción de exceso de metanol, catalizador residual y jabón	Menos agua, tiempo y derroche de energía
Enzima/ Ácido	Sedimentación por gravedad	Evaporación	Remoción de exceso de metanol	Menos agua residual

Continúa **Tabla 2.7**

Hidróxido de sodio	Reactor de membrana/ embudo de separación	Lavado con agua por osmosis inversa	Remoción de aceite sin reaccionar y trazas de jabón	Menor requerimiento de agua
Hidróxido de potasio	Membrana de separación	Membrana de separación	Remoción de exceso de metanol y jabón	Sin aguas residuales
Hidróxido de sodio	Membrana de separación	Membrana de separación	Remoción de tri- y mono-glicéridos sin reaccionar y glicerol	Sin requerimiento de agua
Metóxido de sodio	Embudo de separación	Neutralización/destilación/ lavado con agua/ destilación	Remoción de contaminantes	Alto consumo de agua y energía

2.7. Normatividad para establecer la calidad del biodiésel

La producción y comercialización de biodiésel está regida por especificaciones de estándares internacionales. El punto central de la búsqueda de los medios para obtener un biodiésel de alta calidad, es que éste cumpla con las normas existentes ASTM 6751-3 (para Estados Unidos) y EN 14214 (para Europa). Estas normas le dan a la industria una herramienta valiosa, reconocida y aceptada que garantiza que solamente llega al mercado biodiésel de alta calidad (Atadashi *et al.*, 2010).

La pureza y calidad del biodiésel pueden ser significativamente influenciados por numerosos factores entre ellos: la calidad de la materia prima, la composición de ácidos grasos de los aceites vegetales (aceites vírgenes), grasas animales y aceites residuales, tipo de producción y proceso de refinamiento empleado y parámetros post-producción. De hecho, las tecnologías aplicadas al refinamiento de materias primas y de los ésteres de ácidos grasos

(biodiésel) determinan si el combustible producido cumplirá con las especificaciones estándar ya establecidas (Atadashi *et al.*, 2010).

La pureza del biodiésel (contenido de ésteres), de acuerdo con el estándar Europeo debe ser mayor al 96.5% (Varanda *et al.*, 2011). Otra de las especificaciones más importantes para la calidad del biodiésel, es la del glicerol total remanente en el combustible, dado que su presencia genera inconvenientes durante el uso. El glicerol total está definido como la suma del glicerol libre y ligado, y éste último a su vez se define como la porción de glicerol de mono, di- y triglicéridos residuales. Mono y diglicéridos de ácidos grasos saturados que pudiera tener el biodiésel, cristalizan rápidamente y pueden causar bloqueo del filtro y otros problemas de desempeño (Gerpen, 2005).

Por otro lado, las cantidades de metanol residual, catalizador, jabón y glicerol, están controladas por los límites en puntos de inflamación, nivel de cenizas y glicerol libre. Cuando estos límites se cumplen, el biodiésel puede ser usado en motores modernos sin modificaciones mientras se mantienen la durabilidad y reutilización del motor (Gerpen 2005).

La calidad del biodiésel producido es un factor clave que establece el modo de operación y tiempo de vida del motor, de hecho, este solo puede ser utilizado con éxito en los motores diésel de encendido por compresión, si sus propiedades físicas y químicas se ajustan a las especificaciones estándar internacionales. Estas normas (ASTM 6571-3, EN 14214) describen los requisitos mínimos que se debe cumplir el biodiésel antes de ser utilizado como combustible puro o mezclado con diésel de petróleo.

En la Tabla 2.8 se presenta una comparación de las normas mencionadas.

TABLA 2.8. Comparación de especificaciones de las normas europea (EN 14214) y americana (ASTM D 6751).

Parámetro	Unidad	Especificaciones	
		EN 14214-03	A.S.T.M D 6751-02
Contenido de ésteres	% masa	Mín. 96.5	-----
Densidad a 15 °C	g/cm ³	0.86 – 0.90	-----
Viscosidad cinemática a 40 °C	mm ² /s	3.50 – 5.00	1.90 – 6.00
Punto de Inflamación	°C	Mín. 120	Mín. 130
Azufre total	% masa	Máx. 0.001	Máx. 0.05
Número de cetano	----	Mín. 51	Mín. 47
Contenido en cenizas	% masa	Máx. 0.03	Máx. 0.02
Contenido en agua	mg/Kg.	Máx. 500	-----
Agua y sedimentos	% volumen	-----	Máx. 0.05
Índice de acidez	mg KOH/g	Máx. 0.50	Máx. 0.80
Contenido en metanol	% masa	Máx. 0.20	-----
Contenido en monoglicéridos	% masa	Máx. 0.80	-----
Contenido en diglicéridos	% masa	Máx. 0.20	-----
Contenido en triglicéridos	% masa	Máx. 0.20	-----
Glicerol libre	% masa	Máx. 0.02	Máx. 0.02
Glicerol ocluido	% masa	Máx. 0.23	-----
Glicerol total	% masa	Máx. 0.25	Máx. 0.24
Índice de yodo	----	Máx. 120	-----

III. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de combustibles renovables que puedan reducir el consumo o reemplazar completamente a los combustibles derivados del petróleo, ha ido incrementándose con el paso del tiempo. Esto debido principalmente a la constante reducción global en las reservas del petróleo, al posible agotamiento de éste, a los altos costos de extracción y a los problemas medioambientales relacionados con su uso. El biodiésel representa una buena alternativa para reemplazar parte del petróleo utilizado, ya que tiene propiedades similares al diésel, no es tóxico, es biodegradable, renovable y tiene menos emisiones de gases de efecto invernadero.

El biodiésel es producido a nivel industrial por transesterificación alcalina de aceites vegetales comestibles (como aceite de colza y soya) y metanol; sin embargo, este proceso genera un producto que es entre 10-50% más costoso que el diésel de petróleo. Para mejorar la viabilidad económica de la producción de biodiésel, se ha explorado el uso de las grasas y aceites comestibles residuales generados en la industria alimentaria. Esta materia prima tiene como desventaja la presencia, entre otros contaminantes, de ácidos grasos libres y agua, los cuales afectan fuertemente a la catálisis alcalina, debido a la producción de jabón.

Es por ello que es necesario el estudio y evaluación de catalizadores disponibles para llevar a cabo la transesterificación, como los catalizadores ácidos homogéneos o heterogéneos, alcalinos heterogéneos y los enzimáticos (comerciales o nuevos biocatalizadores), de tal forma que su desempeño pueda ser comparado de forma sistemática, y esto permita identificar qué tipo de catalizador genera los mejores resultados en la producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales.

IV.OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Comparar el desempeño de diferentes tipos de catalizadores químicos y enzimáticos, para identificar cuál de ellos genera los mejores resultados en la producción de biodiésel a partir de una mezcla de aceites y grasas residuales.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir la composición de una mezcla de GAR, proporcionada en función de los tipos y las cantidades reales generadas en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
2. Desarrollar y caracterizar biocatalizadores para su uso en la producción de biodiésel.
3. Evaluar los nuevos biocatalizadores en la producción de biodiésel.
4. Optimizar las condiciones de operación de la catálisis química (KOH, H₂SO₄, CaO) y enzimática en la producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales.

Los resultados correspondientes a los diferentes objetivos específicos de esta tesis, se encuentran reportados en cuatro publicaciones y un manuscrito enviado, en el siguiente orden:

Objetivo 1.

Publicación 1: Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. Revista: Revista Internacional de Contaminación ambiental.

Objetivo 2.

Publicación 2: Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. Revista: RSC Advances.

Publicación 3: Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. Revista: Enzyme and Microbial Technology.

Objetivo 3.

Publicación 4: Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. Revista: Fuel.

Objetivo 4.

Manuscrito 5: Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization. Enviado a la revista: Fuel.

Es importante destacar que todos los artículos han sido publicados en revistas indexadas en el Journal Citation Report.

V. RESULTADOS

5.1. Definición y caracterización de la materia prima

Las grasas y aceites residuales, ya sea domésticas o de la industria alimentaria, son una materia prima que está siendo investigada para su uso en la producción de biodiésel. Se han escrito un sin número de artículos en los cuales la materia prima utilizada es algún tipo de aceite residual particular. Sin embargo, en la realidad, esta materia prima difícilmente es producida como un aceite residual individual, sino como una mezcla de grasas y aceites residuales.

Tomando en cuenta que en una ciudad hay cientos de establecimientos alimentarios de diferentes tipos, y que cada uno tiene sus propias prácticas de cocina, es fácil concluir que la mezcla de todos estos residuos será totalmente heterogénea, y que sus características estarán dictadas por las características de los diferentes aceites que la componen, y por las cantidades de cada uno de ellos. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar una estimación de la cantidad de grasas y aceites residuales que se generan en una ciudad, particularmente en Tuxtla Gutiérrez Chiapas, y realizar la caracterización fisicoquímica de estos residuos, para posteriormente evaluar su uso potencial en la producción de biodiésel.

Para cumplir con los objetivos, la metodología general consistió en realizar encuestas, conteo y monitoreo a los diferentes establecimientos alimenticios localizados en la ciudad, para conocer la cantidades de residuos que cada tipo de establecimiento alimentario genera, y poder estimar la cantidad total anual. Posteriormente, se realizó la caracterización fisicoquímica tanto de aceites individuales como de la mezcla. La metodología, resultados, discusión y conclusión de este trabajo, se encuentran reportados en el artículo: Tacias-Pascacio, V.G., Rosales Quintero, A., y Torrestiana-Sánchez, B. 2016. Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 32 (3), 303-313.

Publicación 1: Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio

Revista Internacional de Contaminación Ambiental (2016). 32:303–13.

Revista: Revista Internacional de Contaminación Ambiental

ISSN: 0188-4999

Editorial: Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma de México, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Universidad de Veracruzana.

País: México

Factor de impacto en 2017: 0.19

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES RESIDUALES DE COCINA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL: UN CASO DE ESTUDIO

Veymar Guadalupe TACIAS PASCACIO¹, Arnulfo ROSALES QUINTERO^{2*} y
Beatriz TORRESTIANA SÁNCHEZ¹

¹ Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. Avenida Miguel Ángel de Quevedo 2779. Colonia Formando Hogar, Veracruz, Veracruz, México, C.P. 91897

² Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, Apartado Postal 599, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas C.P. 29000

*Autor para correspondencia: btorrest@itver.edu.mx

(Recibido mayo 2015; aceptado noviembre 2015)

Palabras clave: contaminación, residuos, aprovechamiento, biocombustibles, diésel

RESUMEN

Se evaluó de forma sistemática la cantidad de grasas y aceites (GAR) generada por la industria restaurantera en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Los resultados indicaron que en la ciudad se producen en promedio 174 t de GAR por año provenientes de ocho tipos de restaurantes en la siguiente proporción: 41 % restaurantes formales, 24 % comida rápida, 8 % taquerías, 7 % antojitos, 6 % cocinas económicas, 6 % bares, 4 % gorditas y 4 % roscicerías. Además, muestras representativas de GAR provenientes de cada tipo de restaurante fueron caracterizadas para la producción de biodiésel en términos de viscosidad, estabilidad oxidativa, contenido de ácidos grasos libres (AGL), índice de acidez (IA), índice de saponificación, contenido de humedad y composición de ácidos grasos. El análisis físico y químico indicó que todas, excepto las GAR generadas por restaurantes de comida rápida, cumplen con los niveles de AGL e IA, recomendados para la transesterificación alcalina. Considerando la población de la ciudad, se estimó un promedio de producción de GAR de 0.31 t/año por cada 1000 habitantes. Un análisis basado en estas cifras sugiere que en México se podrían obtener 34.9 kt de biodiésel/año y evitar la emisión de 92 kt de CO₂/año, reduciendo así la contaminación en el país.

Key words: pollution, waste, exploitation, biofuel, diesel

ABSTRACT

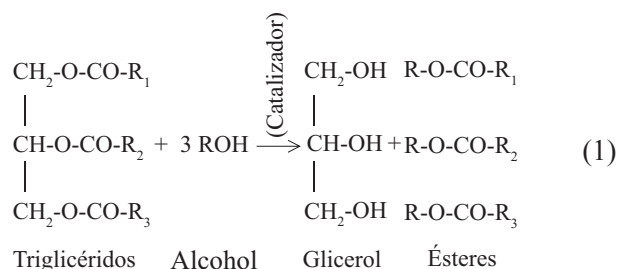
The waste cooking oils and fats (WCOF) from the catering industry were systematically evaluated in Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Results pointed out that the eight restaurant types found in the city produced 174 t of WCOF/year in the following proportion: 41 % formal restaurant, 24 % fast food, 8 % *taquerias*, 7 % *antojitos*, 6 % soup kitchens, 6 % bars, 4 % gorditas and 4 % roast chicken shops. In addition, representative samples of WCOF coming from every restaurant type were characterized for biodiesel production, in terms of viscosity, oxidative stability, free fatty acid content, acid value, saponification number, moisture content and fatty acid composition.

The physicochemical analysis suggests that all the WCOF produced in the city, except that coming from the fast food cooking, met the recommended free fatty acid levels and the acidity values for alkaline transesterification. Based on the population of the city an average production of 0.31 t/year of WCOF per 1000 inhabitants was estimated. Projecting this figure to the whole country of Mexico, 34.9 kt of this fuel would be obtained per year, which would avoid the emission of 92 kt/year of CO₂ and contribute to reduce pollution in the country.

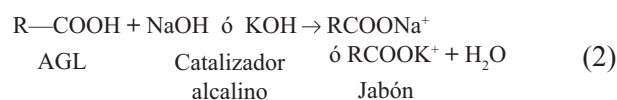
INTRODUCCIÓN

El aumento en la población mundial, la búsqueda de la comodidad y las actividades diarias, son factores que contribuyen al incremento en el consumo de energía y a la generación de residuos. Los problemas ambientales (emisión de gases de efecto invernadero y la lluvia ácida) derivados de las actividades humanas, además de los problemas económicos asociados con el incremento en el precio y la escases del petróleo, han estimulado la búsqueda de combustibles renovables con el objetivo de reducir el consumo o incluso sustituir completamente a los combustibles derivados del petróleo (Mohibbe *et al.* 2005, Canesin *et al.* 2014).

El biodiésel es un combustible alternativo al diésel de petróleo, es un producto biodegradable, no tóxico y menos perjudicial para el ambiente en comparación con el diésel de petróleo. Este combustible es una mezcla de metil ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés), obtenidos de recursos renovables, como los aceites vegetales y las grasas animales, con bajo valor comercial (Dias *et al.* 2009, Ibeto *et al.* 2011). El biodiésel es obtenido por transesterificación de triglicéridos, constituyentes principales de los aceites vegetales y grasas animales, con un alcohol de cadena corta (metanol, principalmente), en presencia de un catalizador adecuado. Los catalizadores alcalinos como el hidróxido de potasio o de sodio y los metóxidos de potasio y sodio, son los catalizadores más comúnmente utilizados en la producción de biodiésel (Predojević 2008). La transesterificación consiste en tres reacciones consecutivas reversibles donde los triglicéridos son convertidos a diglicéridos, los diglicéridos a monoglicéridos y estos a glicerol (subproducto principal de la reacción). En cada etapa se usan tres moléculas de alcohol por molécula de triglicérido. Estequiométricamente se producen tres moles de éster por cada mol de triglicérido (Sharma y Singh 2008) como se indica de forma resumida en la reacción 1:



La principal desventaja de la catálisis alcalina es su alta sensibilidad a la pureza de los reactivos, así como al contenido de ácidos grasos libres y agua. El contenido de ácidos grasos libres no debe exceder ciertos límites, debido a que pueden promoverse reacciones indeseadas de saponificación (reacción 2). Esto reduce la eficiencia del catalizador y el rendimiento de ésteres (biodiésel). Además dificulta los procesos de separación de ésteres y glicerol (Cao *et al.* 2006, Huang *et al.* 2010).

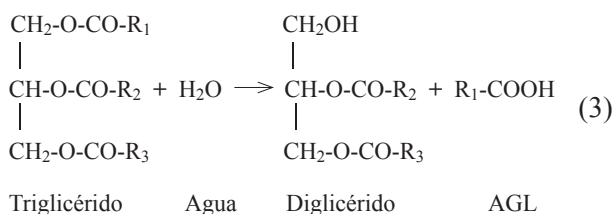


El biodiésel obtenido a partir de aceites vegetales es una alternativa para reemplazar parte del petróleo demandado. Sin embargo, las grandes cantidades de aceite comestible requeridas para la generación de energía pueden conducir a una crisis en el suministro de alimentos y a un desequilibrio económico (Canesin *et al.* 2014). Por otro lado, la generación de aceites residuales se está convirtiendo en un problema creciente en todo el mundo (Felizardo *et al.* 2006, Kulkarni y Dalai 2006, Chhetri *et al.* 2008, Predojević 2008). El manejo de las grasas y aceites residuales (GAR) es un reto importante, debido a los problemas relacionados con su eliminación y a su posible contribución a la contaminación del agua y el suelo (Chhetri *et al.* 2008). Con base en estimaciones reportadas en siete países, en la Unión Europea se producen alrededor de 0.4 Megatoneladas (Mt) de GAR, principalmente provenientes de la industria restaurantera, mientras que en Irlanda, la cantidad

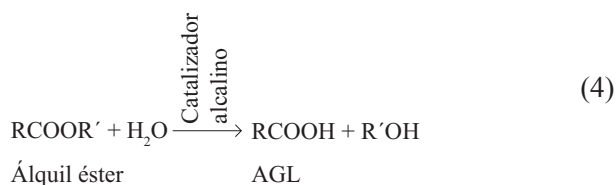
de aceite de cocina residual reciclado fue de 9381 t en el año 2006 (Singh *et al.* 2010). Hasta donde se tiene conocimiento, no hay información disponible sobre la cantidad de GAR producidas en ninguna ciudad de México.

La alternativa de utilizar los aceites de cocina residuales de hogares y de la industria restaurantera es de gran importancia. Sin embargo, un inconveniente del uso de aceites residuales como materia prima para la producción de biodiésel es que tienen propiedades diferentes a las de los aceites refinados o crudos, ya que son degradados por reacciones hidrolíticas y oxidativas que ocurren durante su uso (Costa Neto *et al.* 2000). Las propiedades de los aceites vegetales residuales dependen del tipo de tratamiento al que son sometidos. El tipo de aceite, duración de la cocción, temperatura del aceite, exposición al aire, periodo de almacenamiento y el tipo de alimento cocinado, determinan la presencia de contaminantes primarios y secundarios, que le darán al aceite residual sus características finales (Encinar *et al.* 2005, Kulkarni y Dalai 2006, Wyse-Mason y Beckles 2012). Las altas temperaturas de los procesos típicos de cocción y el agua de los alimentos, aceleran la hidrólisis de los triglicéridos e incrementan el contenido de ácidos grasos libres (AGL), impartiendo al aceite un color más oscuro y un olor desagradable (Felizardo *et al.* 2006).

Por otro lado, los contenidos de agua y de AGL de la materia prima afectan el proceso de transesterificación de glicéridos con alcoholes e interfieren en la separación de los ésteres de ácidos grasos y glicerol (Freedman *et al.* 1984). El agua, proveniente de las grasas y aceites o la formada durante la reacción de saponificación, retarda la reacción de transesterificación a través de reacciones de hidrólisis (reacción 3). Los triglicéridos pueden ser hidrolizados a diglicéridos y formar más AGL (Leung *et al.* 2010).



Una segunda reacción de hidrólisis (reacción 4) puede ocurrir cuando se usa un catalizador alcalino, en la cual los alquil ésteres ya formados (biodiésel) son convertidos en ácidos grasos libres (Abbaszaadeh *et al.* 2012).



Por lo tanto, las reacciones secundarias como saponificación e hidrólisis deben ser mantenidas al mínimo durante la transesterificación alcalina.

Lo anterior indica que el éxito del proceso de conversión de grasas y aceites residuales en biodiésel depende de varios factores entre ellos el tipo de catalizador y las características finales de los aceites residuales utilizados como materia prima. Sin embargo, las propiedades físicas y químicas de las GAR provenientes de restaurantes dependen del tipo de comida y de las prácticas de cocina utilizadas. México tiene una tradición culinaria muy diversa, que se ve reflejada en su amplia variedad de restaurantes. Por lo tanto, la identificación de la calidad de las GAR producidas por los restaurantes en una ciudad del país, es un requisito para establecer condiciones óptimas de operación si se desea establecer un proceso de producción de biodiésel a partir de esta materia prima.

Sobre esta base, el objetivo de este trabajo fue estimar el volumen de grasas y aceites de cocina residuales producidos en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, como un caso de estudio y caracterizarlos para evaluar su potencial como materia prima para la producción de biodiésel. Los resultados obtenidos fueron utilizados para estimar el impacto asociado a la transformación de las GAR provenientes de la industria restaurantera en biodiésel, en relación con el consumo de diésel fósil y en consecuencia, en la reducción de las emisiones de CO₂ en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los reactivos y disolventes utilizados en esta investigación fueron grado analítico. El etanol y el hidróxido de potasio fueron marca Fermont (Productos Químicos Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México), el tolueno y el hexano, Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc., San Luis, EUA) y el ácido clorhídrico, sulfúrico y metanol fueron J.T. Baker (Mallinckrodt Maker, Inc. Phillipsburg, EUA).

Estimación de la producción de grasas y aceites de cocina residuales (GAR)

La estimación de la cantidad de grasas y aceites de cocina residuales (GAR) producida en la ciudad

de Tuxtla Gutiérrez fue realizada en dos etapas. En primer lugar, se contabilizaron los restaurantes registrados en la ciudad y se clasificaron de acuerdo con su tamaño y tipo de cocina. Esto se llevó a cabo entre septiembre y octubre de 2013 y se realizó dividiendo la ciudad en 25 sectores. Cada sector se asignó a un grupo de 6 a 8 personas. Posteriormente, se realizó un monitoreo aleatorio de una vez por semana durante un mes (febrero 2014) a tres restaurantes de cada tipo (previamente clasificados) para estimar la cantidad total de GAR producida en la ciudad por semana. Esto permitió determinar la contribución porcentual de cada tipo de restaurante al volumen total de GAR producido en la ciudad.

Definición y preparación de las muestras de GAR

Las muestras de GAR recolectadas en los tres restaurantes de cada tipo se mezclaron para conformar una muestra representativa del tipo de cocina. Posteriormente, se preparó una mezcla de GAR (MGAR) de muestras representativas de los diferentes tipos de restaurantes tomando como base la contribución proporcional (%v/v) de cada tipo de restaurante al volumen total de GAR producido en la ciudad. Se analizó también una muestra de aceite comercial fresco.

La preparación de las muestras consistió inicialmente en la remoción física de sedimentos y partículas de alimento residuales. Estas fueron calentadas a aproximadamente 40 °C y se dejaron reposar por dos horas para favorecer la sedimentación. Se cernieron a través de un filtro comercial de 100 % polipropileno, se colocaron en frascos de vidrio color ámbar protegidos de la luz y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Caracterización física y química de las GAR

Las propiedades físicas y químicas de las muestras de GAR se evaluaron usando los métodos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés). El contenido de ácidos grasos libres se expresó como porcentaje de ácido oleico y se determinó el índice de acidez (método 940.28), índice de saponificación (método 920.160) y contenido de humedad (método 926.12) para evaluar la degradación y la viabilidad de las GAR para la producción de biodiésel. Además, se determinó la densidad y viscosidad (viscosímetro Stabinger modelo SVM 3000), la estabilidad oxidativa (873 Biodiésel Rancimat) y la composición de ácidos grasos.

Para determinar el perfil de ácidos grasos, las muestras fueron primero convertidas a sus respectivos metil ésteres. Para preparar los ésteres de ácidos grasos se utilizaron aproximadamente 5 mg de cada

muestra, a las que se les agregó 0.2 mL de tolueno y 0.4 mL de H₂SO₄ al 1 % en metanol. Las muestras se calentaron a 80 °C durante 30 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los ésteres de ácidos grasos producidos se extrajeron agregando 1 mL de hexano y 1 mL de agua. La fase de hexano se dejó evaporar y los ésteres de ácidos grasos fueron reconstituidos nuevamente en hexano para su análisis (Fozo y Quivey 2004).

La composición de los ésteres metílicos se determinó por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS) (Agilent Technologies modelo 5975 inert XL Net Work GC system) a una temperatura de entrada de 250 °C, flujo en la columna: 1 mL/min, flujo dividido: 100 mL/min, volumen de inyección: 1 mL, división: 100:1, temperatura inicial en el horno: 60 °C, tiempo de mantenimiento (1): 5 min, rampa (1): 20 °C/min hasta 210 °C, tiempo de mantenimiento (2): 0 min, rampa (2): 1 °C/min hasta 213 °C, tiempo de mantenimiento (3): 0 min, rampa (3): 20 °C/min hasta 225 °C, tiempo de mantenimiento (4): 25 min, temperatura final del horno: 225 °C, columna: capilar DB-WAX, 60 m × 250 mm × 0.25 mm, gas acarreador: helio.

La composición de los ésteres metílicos en las muestras analizadas se determinó por espectrometría de masas, utilizando el programa de búsqueda NIST Mass spectral NIST/EPA/NIH Mass Spectral (versión de biblioteca 2.0d, 2005).

El índice de saponificación (IS) se estimó de acuerdo con la Ec. 5, la cual relaciona el IS con el índice de acidez (IA) (Canesin *et al.* 2014):

$$\text{Éster (\%)} = \frac{IS - IA}{IS} \times 100 \quad (5)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación y cuantificación de restaurantes

Se registraron 793 restaurantes en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez y fueron clasificados en ocho categorías con base en el tipo de cocina: 1) restaurantes formales, fueron los establecimientos más grandes donde los platillos se ordenan a partir de un menú, 2) taquerías, donde se sirve todo tipo de tacos, 3) rosticerías, donde el pollo rostizado es el platillo principal, 4) cocinas económicas, donde se ofrecen menús con pocos platillos (regionales), bajo el esquema de comida corrida de tres tiempos, 5) gorditas, donde el platillo principal son las gorditas hechas a base de maíz y rellenas principalmente de carne,

6) bares, donde se sirven botanas, 7) establecimientos de comida rápida, que preparan principalmente: pizza, hamburguesas, papas y pollo frito y 8) antojitos, donde se preparan comidas típicas mexicanas, comúnmente a base de maíz y con un alto contenido de grasas. De éstos, los más numerosos fueron los restaurantes formales, taquerías y cocinas económicas, con 180 (23 %), 167 (21 %) y 165 (21 %) establecimientos, respectivamente (**Fig. 1**). Las prácticas de cocina, el tipo de alimento, los aditivos empleados, el aceite utilizado y las veces que el aceite es reutilizado varía en cada restaurante, por lo que la cantidad y características de las GAR producidas por cada tipo de restaurante, también fueron diferentes.

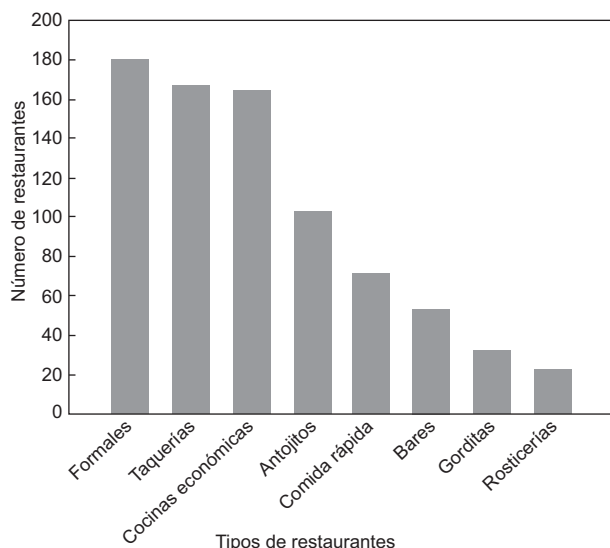


Fig 1. Número y clasificación de restaurantes que fueron registrados en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Estimación de la producción de GAR

El monitoreo realizado permitió estimar la cantidad total de GAR producida en la ciudad e identificar a los restaurantes que generaron el mayor volumen de éstos. Puede observarse, en la **figura 2**, que los restaurantes formales, además de ser los más numerosos, fueron los principales generadores de GAR con 1654 L/semana, así como los restaurantes de comida rápida, los cuales produjeron 963 L/semana de GAR. Los demás restaurantes tuvieron una producción de GAR similar, la cual varió entre 150 y 298 L/semana. La producción total semanal de GAR en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez fue de 3990 L (**Cuadro I**). La contribución a la producción total de GAR de los restaurantes formales, comida rápida, taquerías, antojitos, cocinas económicas, bares,

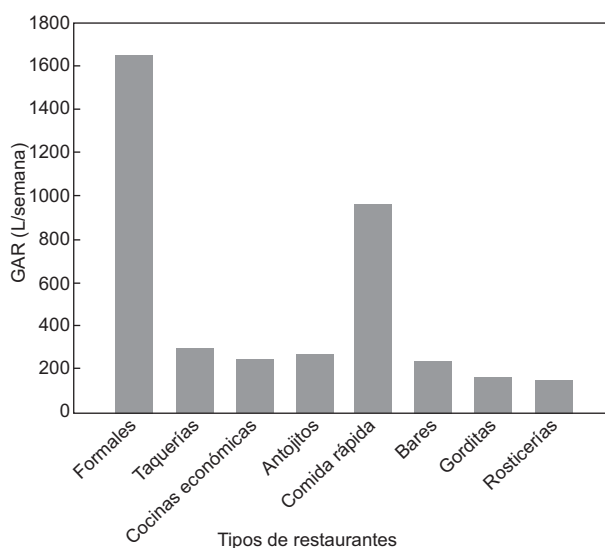


Fig. 2. Volumen de grasas y aceites residuales (GAR) generados por la industria restaurantera en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

gorditas y rosticerías fueron de 41 %, 24 %, 8 %, 7 %, 6 %, 6 %, 4 % y 4 %, respectivamente. Tomando como base estas cifras, el volumen total estimado de GAR producido en la ciudad fue de 191 524 L/año, los cuales asumiendo una densidad de 0.9079 kg/L equivalen a 174 t de GAR por año.

La población total en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez en el año 2010 fue de 553 374 habitantes (INEGI 2014), lo que sugiere que los restaurantes producen un promedio de 0.31 t/año de GAR por cada 1000 habitantes. Al considerar esta cifra como una tasa representativa de producción de GAR en México, la cantidad estimada de GAR generada por año sería de 35 kt (38 879 989 L) en todo el país (112 336 538 habitantes, INEGI 2014). Cabe señalar que esta es una proyección moderada para el país, ya que la cantidad total de GAR/año generada en ciudades más grandes, como Monterrey o la ciudad de México, podría ser mayor puesto que las personas que viven en ciudades más grandes e industrializadas, comen con mayor frecuencia en restaurantes que las que viven en ciudades pequeñas. La cantidad total de GAR estimada para México es muy baja en comparación con las 113 000 kt de GAR de restaurantes y establecimientos de comida rápida que son recolectadas anualmente en los Estados Unidos (Canakci 2007). Sin embargo, es mayor comparada con los 2.5 millones de L/año de GAR generada por los restaurantes en Croacia (Ćosić *et al.* 2010). Se sabe que la producción de GAR depende de la población y que está relacionada con los niveles de actividad de los sectores restaurantera y hospitalario, los cuales,

CUADRO I. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ACEITES Y GRASAS RESIDUALES Y LA MEZCLA DE ESTOS (MWCOF) OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE RESTAURANTES REGISTRADOS EN LA CIUDAD DE TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, MÉXICO

Restaurantes	Acidez (mg KOH/g)	Ácidos grasos libres (%)	Saponificación (mg KOH/g)	Ester (%)	Humedad (%)	Estabilidad oxidativa (h)	Viscosidad (mPa/s)
Antojitos	0.45 (0.01)	0.22 (0.01)	185.62 (1.76)	99.76	0.02 (0.01)	2.78 (0.06)	37.869
Bares	1.00 (0.01)	0.50 (0.01)	193.06 (2.33)	99.48	0.03 (0.02)	5.69 (0.07)	39.611
Cocinas	0.81 (0.01)	0.40 (0.01)	183.75 (1.66)	99.56	0.02 (0.00)	4.74 (0.09)	31.763
Comida rápida	4.98 (0.15)	2.51(0.08)	195.07 (4.33)	97.44	0.01(0.00)	2.78 (0.07)	39.727
Gorditas	0.94 (0.01)	0.47 (0.01)	196.31 (0.27)	99.52	0.01(0.00)	0.86 (0.03)	50.027
Formal	1.62 (0.01)	0.81 (0.01)	194.66 (2.04)	99.17	0.02 (0.00)	3.89 (0.02)	52.205
Rosticerías	0.99 (0.14)	0.50 (0.07)	185.55 (4.95)	99.46	0.03 (0.01)	0.44 (0.04)	34.104
Taquerías	1.89 (0.14)	0.95 (0.07)	192.53 (1.29)	99.02	0.05 (0.00)	2.94 (0.04)	36.949
MWCOF	2.09 (0.09)	1.05 (0.04)	198.54 (0.71)	98.95	0.04 (0.00)	3.29 (0.04)	40.098
Aceite puro	0.10 (0.00)	0.05 (0.00)	196.23 (1.65)	99.95	0.04 (0.02)	7.56 (0.30)	29.932

a su vez, están vinculados con la actividad general de la economía y en particular con el sector turismo, que se relaciona con el grado de industrialización de cada país (Singh *et al.* 2010).

Caracterización física y química de las GAR para producción de biodiésel

Se realizó la caracterización física y química de muestras representativas de GAR provenientes de los diferentes tipos de restaurantes para evaluar su potencial como materia prima para producir biodiésel. Se encontró que el índice de acidez (IA), los niveles de ácidos grasos libres (AGL), la estabilidad oxidativa, la viscosidad y la composición de ácidos grasos, fueron diferentes en todas las muestras de GAR analizadas (**Cuadros I y II**). Esto era de esperarse ya que todos los restaurantes utilizan diferentes tipos de aceites y la duración de cocción, el tipo de alimento cocinado, los aditivos empleados y las prácticas de cocina son también distintas. Esto mismo ha sido

registrado por otros investigadores como Wyse-Mason y Beckles (2012).

Además, se observó que el IA y los niveles AGL de todas las muestras incluyendo la MGAR fueron superiores a los obtenidos con el aceite fresco y que estos índices en las GAR de los restaurantes de comida rápida fueron el doble que los valores determinados en el resto de las GAR analizadas. Esto puede deberse a que la comida rápida es principalmente frita y durante la fritura los niveles de AGL se incrementan como consecuencia de la hidrólisis de los triglicéridos en presencia de humedad y oxidación del alimento (Canakci 2007).

Por el contrario, el porcentaje de humedad y el índice de saponificación presentaron pequeñas variaciones entre las muestras de GAR provenientes de los ocho diferentes tipos de restaurantes y fueron similares a los reportados por Wyse-Mason y Beckles (2012). Estos autores compararon las propiedades de GAR en 11 restaurantes y concluyeron que los valores

CUADRO II. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS GRASAS Y ACEITES RESIDUALES PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES RESTAURANTES ASÍ COMO LA MEZCLA DE ELLOS (MWCOF) Y ACEITE COMERCIAL

Restaurantes	Contenido de ácidos grasos (%)									Saturación (%)	Insaturación (%)
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1		
Antojitos	0.54	12.13	1.10	4.45	37.62	36.51	6.58	0.47	0.60	17.58 (0.25)	82.42 (0.25)
Bares	0.34	10.89	0.80	4.40	48.59	27.46	6.46	0.30	0.76	15.93 (0.17)	84.07 (0.17)
Cocinas	0.45	10.72	0.59	3.90	40.18	35.89	7.78	-	0.48	15.07 (0.14)	84.93 (0.14)
Comida rápida	0.53	20.21	0.32	4.55	40.26	28.99	4.64	0.50	-	25.79 (0.51)	74.21 (0.51)
Gorditas	0.26	10.29	0.21	4.38	46.42	30.85	6.20	0.56	0.82	15.49 (0.29)	84.51 (0.29)
Formales	0.46	17.92	0.20	4.45	38.87	32.41	5.00	0.44	0.25	23.26 (0.21)	76.74 (0.21)
Rosticerías	1.07	24.49	5.68	6.75	38.87	21.23	1.92	-	-	32.30 (0.31)	67.70 (0.31)
Taquerías	2.52	27.16	3.10	15.33	40.39	10.25	0.86	-	0.40	45.01 (0.24)	54.99 (0.24)
MWCOF	0.62	17.82	0.51	5.75	40.98	28.77	4.51	0.50	0.55	24.69 (0.39)	75.31 (0.39)
Aceite puro	-	8.75	0.10	3.43	43.63	34.99	7.74	0.54	0.83	12.72 (0.13)	87.28 (0.13)

superiores de IA y niveles de AGL obtenidos en las GAR provenientes de los restaurantes de comida rápida fueron resultado de una cocción intensa por periodos de tiempo más largos. Por lo tanto, puede suponerse que las GAR de los restaurantes de comida rápida de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez tuvieron una intensidad y duración de cocción superior a la de las GAR de los restaurantes de antojitos, bares, cocinas económicas, gorditas, restaurantes formales, taquerías y rosticerías. Es interesante señalar que el IA y los niveles de AGL reportados por Wyse-Mason y Beckles (2012) para las GAR de los restaurantes de comida rápida y pizzerías fueron más elevados que los determinados en las GAR de esta misma clase de restaurantes en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.

Se observó también una menor estabilidad oxidativa en las muestras de GAR (0.44-5.69 h) de todos los restaurantes respecto a la del aceite fresco (7.56 h). Este efecto ha sido también relacionado con las reacciones de degradación, tales como autooxidación, polimerización y oxidación térmica, e hidrólisis ocurridas durante la fritura, donde el aceite es sometido repetidamente a altas temperaturas en presencia de aire y humedad (Çaylı y Küsefoğlu 2008).

El IA y el contenido de AGL en el aceite son parámetros clave que determinan la factibilidad de una materia prima para la producción de biodiésel, ya que el rendimiento de la transesterificación alcalina (proceso más utilizado para la producción de biodiésel) es altamente dependiente de la pureza de los reactivos. Los AGL pueden reaccionar con el catalizador alcalino para producir jabón y agua, induciendo la formación de emulsiones. La presencia de agua puede también ocasionar la saponificación del éster a pH alcalino. Estas reacciones incrementan la cantidad de catalizador requerida para llevar a cabo la transesterificación alcalina y dificultan los procesos de recuperación y purificación del biodiésel (Encinar *et al.* 2005). Se ha señalado que la materia prima para la producción alcalina de biodiésel debe ser anhidra (contenido de agua < 0.3 %) y tener un IA inferior a 2 mg KOH/g (Freedman *et al.* 1984, Liu 1994, Canakci 2007). Otros autores han observado que un contenido de AGL cercano a 1 % (2 mg KOH/g) en el aceite de cocina residual no tiene efecto en la conversión de ésteres metílicos por transesterificación alcalina (Sharma 2008, Singh 2008, Upadhyay 2008). Con base en lo anterior, las GAR obtenidas de todos los restaurantes monitoreados en la ciudad, excepto las GAR provenientes de restaurantes de comida rápida, podrían ser materia prima adecuada para la transesterificación alcalina, ya que su contenido de AGL fue inferior al 1 % (**Cuadro I**). Sin embargo,

la mezcla de las grasas y aceites de cocina residuales (MGAR) provenientes de todos de restaurantes, incluyendo los de comida rápida, presentó un IA y un nivel de AGL muy cercano a los valores recomendados para la catálisis alcalina. Esto indica que la MGAR es adecuada para la producción de biodiésel y sería una opción para el aprovechamiento de todas las GAR producidas en la ciudad.

Puede verse también en el **cuadro I** que el contenido de humedad fue similar en todas las muestras e inferior, no sólo al del aceite fresco, sino también a los valores sugeridos en la literatura para la transesterificación alcalina (Encinar *et al.* 2005, Wyse-Mason y Beckles 2012). Esto puede ser atribuido a que las temperaturas usadas durante la cocción fueron superiores al punto de ebullición del agua, lo que promovió la evaporación de la misma. Por otro lado, los valores de IS indican que la formación potencial de ésteres de todos los tipos de GAR, así como los de su mezcla, sería inferior que la estimada para el aceite fresco (**Cuadro I**). Sin embargo, resultaría suficiente para obtener altos rendimientos en la producción de biodiésel (98.95 % de ésteres), ya que la Norma EN 14214 recomienda un valor mínimo de 96.5 % de ésteres.

Los valores de viscosidad determinados para todas las GAR recolectadas en la ciudad, especialmente las obtenidas de los restaurantes formales y de gorditas, fueron superiores que los del aceite fresco. Esto puede tener un impacto negativo en el rendimiento del proceso de producción de biodiésel ya que a mayor viscosidad se dificulta el contacto entre las moléculas de aceite y de metanol, lo que disminuye la solubilidad del aceite en el solvente, provocando baja conversión de los triglicéridos (Leung y Guo 2006). Los incrementos en la viscosidad de las GAR podrían atribuirse al complejo patrón de reacciones termolíticas y oxidativas que ocurren en las grasas y aceites durante el proceso de freído. Una alta viscosidad indica la formación de polímeros así como una mayor cantidad y tipos de ácidos grasos presentes en cada muestra (Maskan y Bağcı 2003, Canakci 2007).

Composición de ácidos grasos

Se determinó la composición de ácidos grasos de las GAR recolectadas en la ciudad, ya que durante la cocción los aceites están expuestos a altas temperaturas en presencia de oxígeno y esto facilita un importante número de reacciones que alteran la composición de ácidos grasos (Kulkarni y Dalai 2006, Wyse-Mason y Beckles 2012). Los resultados presentados en el **cuadro II** indican que el ácido oleico (C18:1) se incrementó solamente en las muestras

provenientes de bares y gorditas. Lo anterior puede deberse a la hidratación de los ácidos grasos más insaturados por la presencia de agua y altas temperaturas durante la cocción (Knothe y Steidley 2009, Wyse-Mason y Beckles 2012). Por el contrario, las muestras de los diferentes tipos de restaurantes presentaron un incremento en ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0). Este efecto puede atribuirse a la ruptura de los ácidos grasos insaturados durante la cocción moderada, ya que si bien los ácidos grasos saturados pueden también reaccionar para producir alcanos, alquenos, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena más corta, esto sólo ocurre cuando los aceites son sujetos a condiciones extremas y uso prolongado (Kulkarni *et al.* 2012). Por lo tanto, la presencia de ácido mirístico (un ácido graso de cadena más corta) en todas las muestras, excepto en la de aceite fresco, y la disminución de los niveles de ácido oleico observados en las GAR de antojitos, cocina económica, comida rápida, restaurantes formales, taquerías y rosciterías, son indicativos de uso prolongado de los aceites en la mayoría de los restaurantes (**Cuadro II**).

Por el contrario, la menor concentración de ácidos grasos más insaturados (ácido linoleico y linolénico) en todas las muestras de GAR respecto al aceite fresco, señala que los ácidos grasos insaturados son menos estables que los ácidos grasos saturados (Wyse-Mason y Beckles 2012). La concentración menor de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) encontrada en las GAR puede ser positiva ya que el biodiésel obtenido a partir de esta materia prima podría tener una mejor estabilidad oxidativa durante el almacenamiento (Canesin *et al.* 2014).

Asimismo, en el **cuadro I** puede observarse que la concentración de ácidos grasos saturados (AGS) en todas las muestras de GAR fue mayor (entre 15.07 y 45.01 %) que la del aceite fresco (12.72 %). El contenido superior de AGS encontrado en las GAR provenientes de rosciterías (32.30 %) y taquerías (45.01 %), puede ser debido al hecho de que ambas muestras son principalmente grasas de origen animal y es sabido que las grasas animales tienen una mayor concentración de ácidos grasos saturados que los aceites vegetales. Esta característica de las GAR provenientes de taquerías y rosciterías es indeseable, ya que las cadenas saturadas pueden causar un incremento en parámetros como la viscosidad, el punto de obstrucción y el punto de nube del biodiésel producido. Sin embargo, los componentes saturados como el ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico

(C18:0) tienen altos números de cetano y son menos propensos a la oxidación que los componentes insaturados (Canakci 2007). Además, los ácidos grasos saturados, juegan un papel importante en la determinación de las propiedades de flujo en frío del biodiésel, como el punto de obstrucción del filtro en frío (POFF), el cual se produce a altas temperaturas, cuando el contenido de ácidos grasos saturados aumenta. Por ejemplo, si el biodiésel se produce a partir de grasas animales (22-45 % AGS), el POFF puede producirse entre 12 °C y -1 °C aproximadamente, pero si se deriva de aceite de colza (5-10 % AGS), el POFF puede ocurrir entre -7 °C y -12 °C, aproximadamente (Chhetri *et al.* 2008). Para esta propiedad dependiente del clima, los estándares de la EN14214 (2008) reportan para climas templados 6 ° de POFF: 5, 0, -5, -10, -15, -20 °C.

Basados en el criterio del POFF, las GAR de antojitos, bares, cocinas económicas y gorditas, que tuvieron menor cantidad de AGS (17.58 %, 15.93 %, 15.07 % y 15.49 %, respectivamente), serán una mejor materia prima para la producción de biodiésel que las grasas animales u otros aceites con mayor contenido de ácidos grasos saturados. Por otro lado, las muestras de GAR provenientes de antojitos, bares, cocinas económicas y gorditas presentaron un nivel de ácidos grasos insaturados muy cercano al del aceite fresco. Sin embargo, se determinaron bajos contenidos de ácidos grasos insaturados en las muestras de comida rápida y restaurantes formales. Estos contenidos fueron aún menores en las muestras de GAR provenientes de taquerías y rosciterías (**Cuadro II**). La presencia de ácidos grasos insaturados en los FAME es necesaria para limitar su solidificación. Sin embargo, los FAME con mayor grado de insaturación no son deseables en el biodiésel, ya que las moléculas insaturadas reaccionan con el oxígeno atmosférico y son convertidas en peróxidos. Además, puede ocurrir entrecruzamiento en el sitio de insaturación y obtenerse un material polimerizado tipo plástico. A altas temperaturas, como las comúnmente encontradas en los motores de combustión interna, el proceso puede acelerarse y el motor rápidamente quedará engomado con los FAME polimerizados (Mohibbe *et al.* 2005). En este contexto, el biodiésel producido con GAR de taquerías y rosciterías, sería menos susceptible a la degradación que el biodiésel obtenido de GAR de antojitos, bares, cocinas económicas, gorditas, comida rápida y restaurantes formales.

El contenido de ácidos grasos saturados e insaturados de la MGAR fueron superiores a los del

aceite fresco y similares a las muestras de comida rápida y restaurantes formales, debido a la alta proporción de éstos en la definición de la MGAR. Lo que sugiere que el biodiésel producido al utilizar la MGAR como materia prima, presentará problemas de flujo en frío. Sin embargo, el riesgo disminuye en climas cálidos como el de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.

Uso potencial de las grasas y aceites residuales para producción de biodiésel en México

La cantidad de biodiésel que podría ser obtenida a partir del volumen de GAR producido (174 t/año) en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez es de alrededor de 172 t/año, si esta materia prima fuera convertida con una eficiencia del 98.95 % en metil ésteres por transesterificación alcalina (**Cuadro I**). Sin embargo, considerando un 5 % de incremento en el consumo de combustible cuando se utiliza biodiésel en lugar de diésel (Andersen y Weinbach 2010), las 172 t/año de biodiésel obtenidas a partir de GAR podrían reemplazar 163 t/año de diésel fósil.

Por otro lado, la combustión del diésel fósil resulta en emisiones de 3.52 kg CO₂/kg diésel (Andersen y Weinbach 2010). Por lo tanto, la sustitución de 163 t/año de diésel fósil producidas a partir de GAR, teóricamente resultaría en una disminución de 575 t/año de las emisiones de CO₂. Sin embargo, la recolección, el procesamiento, el consumo de metanol y la distribución asociadas a la producción y uso del biodiésel, implican la combustión de diésel fósil y reducen en un 20 % el impacto en las emisiones de CO₂, derivadas del reemplazo de diésel fósil por biodiésel (Andersen y Weinbach 2010). Con base en lo anterior, el proceso de obtención de 172 t/año de biodiésel a partir de GAR generaría por sí mismo 121 t/año de CO₂, por lo que la reducción real en las emisiones de CO₂ al aire debido al reemplazo de diésel fósil por biodiésel, serían 454 t de CO₂/año. Esta tendría sin duda un impacto positivo en la reducción de la contaminación en la ciudad.

La cantidad proyectada de GAR producidas por la industria restaurantera en todo México, fue de 35 kt/año. Esta materia prima permitiría producir 34.9 kt/año de biodiésel (aproximadamente 687 barriles/día), los cuales podrían reemplazar 33 kt/año de diésel fósil y evitar la emisión de 92 kt CO₂/año. El consumo total de diésel en México en el año 2013 fue de aproximadamente 20 304 kt (SIE 2015). Por lo tanto, el biodiésel obtenido a partir de GAR podría reemplazar el 0.16 % del diésel utilizado en México y reducir el 0.13 % de las emisiones de CO₂ de todo el país. Esto podría parecer una pequeña contribución

a las emisiones totales de CO₂ en México. Sin embargo, es evidente que esta cifra puede ser superior si las GAR provenientes de otros sectores, así como las grasas animales residuales de los mataderos, aves de corral e industria pesquera fueran utilizadas para producir biodiésel, como se hace en países como Noruega (Andersen y Weinbach 2010). Por otro lado, un impacto ambiental positivo asociado a la reutilización de las GAR sería la disminución de la contaminación del agua y sus repercusiones, ocasionada por las descargas de este residuo cuando no es aprovechado.

CONCLUSIONES

Se determinaron la producción y las propiedades físicas y químicas de las grasas y aceites residuales provenientes de una variedad de restaurantes en una ciudad de tamaño medio de México. Se identificaron ocho tipos de restaurantes, pero los principales generadores de GAR fueron los restaurantes formales y los de comida rápida. Los resultados indicaron que las GAR provenientes de casi todos los restaurantes, así como la mezcla de éstos, son una materia prima adecuada para la producción de biodiésel. La proyección de estos resultados a todo el país indicó que el procesamiento de las GAR provenientes de la industria restaurantera podría incrementar la producción de biodiésel en México y reducir las emisiones de CO₂ generadas por el uso de diésel fósil. Debe señalarse que este estudio es el primero realizado en México en este tema, además, puede contribuir a establecer una política de reúso o conversión de las GAR en biodiésel o en otros productos de valor agregado. También puede ser útil para evaluar el impacto de la descarga de estos residuos al ambiente, así como para promover la producción y uso del biodiésel en México, donde su producción en 2012 fue únicamente de 0.1 miles de barriles/día, mientras que en Estados Unidos se produjeron 64 mil barriles/día en ese mismo año (EIA 2015).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Miguel Ángel García Alvarado por su apoyo en la selección del método usado para llevar a cabo el monitoreo de la producción de grasas y aceites en la ciudad y a Celina Luján Hidalgo por su asistencia técnica en el laboratorio. Veymar G. Tacias agradece también al CONACyT por la beca de doctorado otorgada.

REFERENCIAS

- Abbaszaadeh A., Ghobadian B., Omidkhah M. R y Najafi G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energ. Convers. Manage.* 63, 138-148. DOI: 10.1016/j.enconman.2012.02.027.
- Andersen O. y Weinbach J.E. (2010). Residual animal fat and fish for biodiesel production. Potentials in Norway. *Biomass Bioenerg.* 34, 1183-1188. DOI: 10.1016/j.biombioe.2010.03.010.
- AOAC (1990). 926.12 Moisture and volatile matter. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists Inc. Washington, DC, EUA, 957 pp.
- AOAC (1990). 926.160 Saponification number (Kottstorfer Number) of oils and fats. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, INC. Washington, DC, EUA, 957 pp.
- AOAC (1990). 940.28 Fatty acids (free) in crude and refined oils. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Washington, DC, EUA, 957pp.
- Canakci M. (2007). The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Biores. Technol.* 98, 183-190. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.11.022.
- Canesin E. A., de Oliveira C. C., Matsushita M., Dias L. F., Pedrão M. R. y de Souza N. E. (2014). Characterization of residual oils for biodiesel production. *Electro. J. Biotechn.* 17, 39-45. DOI: 10.1016/j.ejbt.2013.12.007.
- Cao P., Tremblay A. Y., Dubé M. A. y Morse K. (2006). Effect of membrane pore size on the performance of a membrane reactor for biodiesel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 52-58. DOI: 10.1021/ie0605550.
- Çaylı G. y Küsefoğlu S. (2008). Increased yields in biodiesel production from used cooking oils by a two step process: Comparison with one step process by using TGA. *Fuel Proc. Technol.* 89, 118-122. DOI: 10.1016/j.fuproc.2007.06.0210.
- Chhetri A. B., Watts K. C. e Islam M. R. (2008). Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies* 1, 3-18. DOI: 10.3390/en1010003.
- CEN (2008). EN14214. Automotive fuels- Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines- Requirements and test methods. European Committee For Standarization. Organización Internacional para la Estandarización (ISO), 25 de octubre, 2008, 15 pp.
- Ćosić B., Krajačić G. y Duić N. (2010). Estimation of used cooking oil potential for biofuels production in Republic of Croatia. *Memorias. Energy and the Environment* 2010. Rijeka, Croacia, 18 al 22 de octubre, 2010. PDF
- Costa Neto P. R., Rossi L. F. S., Zagonel G. F. y Ramos L. P. (2000). Produção de biocombustível alternativo ao óleo diésel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Quím. Nova* 23, 531-537. DOI: 10/1590/S0100-40422000000400017.
- Dias J. M., Alvim-Ferraz M. C. M. y Almeida M. F. (2009). Production of biodiesel from acid waste lard. *Biores. Technol.* 100, 6355-6361. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.07.025.
- EIA (2015). International energy statistics: Biodiesel production. U.S. Department of Energy U.S. Energy Information Administration (EIA) [en línea]. <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=81&aid=1&cid=regions&syid=2008&eyid=2012&unit=TBPD> 09/02/2015.
- Encinar J. M., González J. F. y Rodríguez-Reinares A. (2005). Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 5491-5499. DOI: 10.1021/ie040214f.
- Felizardo P., Neiva Correia M. J., Raposo I., Mendes J. F., Berkemeier R. y Bordado J. M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage.* 26, 487-494. DOI: 10.1016/j.wasman.2005.02.025.
- Fozo E. M. y Quivey R. G. (2004). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *App. Env. Microbiol.* 70, 929-936. DOI: 10.1128/AEM.70.2.929-936.2004.
- Freedman B., Pryde E. H. y Mounts T. L. (1984). Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *JAOCS* 61, 1638-1643. DOI: 10.1007/BF02541649.
- Huang G., Chen F., Wei D., Zhang X. y Chen G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energ.* 87, 38-46. DOI: 10.1016/j.apenergy.2009.06.016.
- Ibeto C., Ofoefule A. y Ezeugwu H. (2011). Fuel quality assessment of biodiesel produced from groundnut oil (*Arachis hypogea*) and its blend with petroleum diesel. *Am. J. Food Technol.* 6, 798-803. DOI: 10.3923/ajft.2011.798.803.
- INEGI (2014). Población, hogares y vivienda. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [en línea] <http://www3.inegi.org.mx/Sistemas/temas/Default.aspx?s=est&c=17484> 30/11/2014.
- Knothe G. y Steidley K. R. (2009). A comparison of used cooking oils: A very heterogeneous feedstock for biodiesel. *Bioresource Technol.* 100, 5796-5801. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.064.
- Kulkarni M. G. y Dalai A. K. (2006). Waste cooking oil an economical source for biodiesel: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 2901-2913. DOI: 10.1021/ie0510526.
- Leung D. Y. C. y Guo Y. (2006). Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel

- production. *Fuel Proc. Technol.* 87, 883-890.
DOI: 10.1016/j.fuproc.2006.06.003.
- Leung D. Y. C., Wu X. y Leung M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energ.* 87, 1083-1095.
DOI: 10.1016/j.apenergy.2009.10.006.
- Liu K.S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *JAOCS* 71, 1179-1187.
DOI: 10.1007/BF02540534.
- Maskan M. y Bağcı H. (2003). Effect of different adsorbents on purification of used sunflower seed oil utilized for frying. *Eur. Food Res. Technol.* 217, 215-218. DOI: 10.1007/s00217-003-0731-2.
- Mohibbe Azam M., Waris A. y Nahar N. M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenerg.* 29, 293-302.
DOI: 10.1016/j.biombioe.2005.05.001.
- Predojević Z. J. (2008). The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel* 87, 3522-3528.
DOI: 10.1016/j.fuel.2008.07.003.
- Sharma Y. C., Singh B. y Upadhyay S. N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* 87, 2355-2373.
DOI: 10.1016/j.fuel.2008.01.014.
- SIE (2015). IMP: Balance nacional de diésel. Sistema de Información Energética. Secretaría de Energía [en línea]. <http://sie.energia.gob.mx/bdiController.do?action=cuadro&subAction=applyOptions> 09/02/2015.
- Singh A., Smyth B. M. y Murphy J. D. (2010). A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take. *Ren. Sust. Energy Rev.* 14, 277-288.
DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.004.
- Tomasevic A. V. y Siler-Marinkovic S. S. (2003). Methanolysis of used frying oil. *Fuel Proc. Technol.* 81, 1-6.
DOI: 10.1016/S0378-3820(02)00096-6.
- Wyse-Mason R. R. y Beckles D. M. (2012). An investigation of restaurant waste oil characteristics for biodiesel production in Trinidad and Tobago. *Energy Sust. Dev.* 16, 515-519. DOI: 10.1016/j.esd.2012.05.005.

FE DE ERRATAS

Previo a la publicación del artículo “Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio”, se identificaron ciertos errores en el mismo, los cuales fueron corregidos y enviados a la editorial correspondiente para su incorporación en la versión final; sin embargo, estas observaciones no fueron atendidas y el artículo se publicó con dichos errores, los cuales se señalan a continuación:

1. En la lista de autores ubicada en la primera página del artículo, el asterisco (*) que identifica al autor de correspondencia está colocado sobre el nombre de “Arnulfo Rosales Quintero”, y debe de estar en el nombre de “Beatriz Torrestiana-Sánchez”.
2. En el octavo párrafo de la página 306 donde dice “El índice de saponificación (IS) se estimó de acuerdo con la Ec.5”, debe decir “El contenido de ésteres (%) se estimó de acuerdo con la Ec.5”.
3. En la página 308, en el título del Cuadro I donde dice “Propiedades físicas y químicas de los aceites y grasas residuales y la mezcla de éstos (MWCOF) obtenidos de los diferentes tipos de restaurantes registrados en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México” debe decir “Propiedades físicas y químicas de los aceites y grasas residuales y la mezcla de éstos (MGAR) obtenidos de los diferentes tipos de restaurantes registrados en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Lo mismo sucede en la columna uno fila 10 del mismo cuadro, donde dice “MWCOF” debe decir “MGAR”.
4. En la página 308, en el título del Cuadro II donde dice “Composición de ácidos grasos de las grasas y aceites residuales provenientes de los diferentes restaurantes así como la mezcla de ellos (MWCOF) y aceite comercial” debe decir “Composición de ácidos grasos de las grasas y aceites residuales provenientes de los diferentes restaurantes así como la mezcla de ellos (MGAR) y aceite comercial”. Lo mismo sucede en la columna uno fila 11 del mismo cuadro donde dice “MWCOF” debe decir “MGAR”.

5.2. Desarrollo y caracterización de biocatalizadores para su uso en la producción de biodiésel

Los catalizadores enzimáticos tienen varias ventajas en comparación con los catalizadores químicos, como una mayor compatibilidad con las variaciones en la calidad de la materia prima, condiciones moderadas de reacción, bajo consumo de energía, fácil remoción y reuso del biocatalizador, simplificación de la recuperación y purificación de productos, tolerancia a la presencia de agua y ácidos grasos libres en los reactivos y generación de bajas cantidades de efluentes; sin embargo, su alto costo, bajas velocidades de reacción y por lo tanto, largos tiempos de reacción, además de la pérdida de actividad durante los ciclos de reuso, son las principales desventajas de esta catálisis y crean importantes limitaciones tecnológicas (Dabdoud *et al.*, 2009; Fjerbaek *et al.*, 2009).

Es por esto que el objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar nuevos biocatalizadores para su uso en la producción de biodiésel, los cuales pudieran competir y superar, en cuanto a actividad y rendimientos, a los catalizadores comerciales, con la posibilidad de tener un bajo costo.

De forma general, la metodología consistió en inmovilizar, por activación interfacial, cinco lipasas en cinco diferentes soportes comerciales. Los soportes fueron: Lifetech™ ECR1061M (estireno metacrilato), Lifetech™ ECR8804M (octadecil metacrilato), Lifetech™ ECR8806M (octadecil metacilato), Lifetech™ ECR1090M (estireno) y Lifetech™ ECR1030M (DVB/metacrilato). Las enzimas utilizadas fueron: lipasa de *Rhizomucor miehie* (RML), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasas A and B de *Candida antarctica*, (CALA and CALB), así como una fosfolipasa llamada Lecitasa.

A los derivados enzimáticos obtenidos se les determinó: propiedades de textura, capacidad de carga, estabilidad bajo diferentes condiciones y la actividad sobre diferentes sustratos. El objetivo de estos estudios era identificar qué soporte proporcionada un derivado con mejores propiedades catalíticas, para poder seleccionarlo y evaluarlo posteriormente en la producción de biodiésel; sin embargo, los resultados indicaron que no existe un soporte que sea el “mejor”, ya que esto depende de la enzima utilizada y del sustrato estudiado. La metodología,

resultados, discusión y conclusión de este trabajo se presentan en la publicación: Tacias-Pascacio, V. G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortiz, J. J. y Fernandez-Lafuente, R. 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* **6** (102): 100281-100294.

La inmovilización de lipasas en soportes hidrofóbicos por activación interfacial, es una excelente técnica, ya que es reversible y permite el reuso del soporte cuando la enzima se ha inactivado; sin embargo, su principal desventaja es la desorción de la enzima cuando el biocatalizador se expone a altas temperaturas, o a la presencia de solventes o sustancias con propiedades detergentes. Generalmente, la desorción se atribuye a las condiciones del medio de reacción, además de que es posible que los sustratos utilizados en la reacción tengan o generen compuestos con propiedades detergentes, que en algunos casos estos se encuentran en altas concentraciones, pueden favorecer la desorción de la enzima. Por ejemplo, en la reacción de transesterificación de triglicéridos para la producción de biodiésel, se generan productos intermediarios como diglicéridos y monoglicéridos, los cuales tienen propiedades detergentes (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998).

Por esta razón, y como actividad adicional, en esta parte del trabajo también se realizó un estudio que consistió en la incubación de un biocatalizador (CALB en octil agarosa) en presencia de diferentes sustratos y productos, precisamente para comprobar, si éstos ejercen alguna influencia en la desorción enzimática. La metodología, resultados, discusión y conclusión de este trabajo se reportan en el artículo: Virgen-Ortiz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., Hirata, D. B., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., y Fernandez-Lafuente, R. 2017. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.*, **96**, 30-35.

Publicación 2: Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity.

RSC Advances (2016). 6:100281–94

Revista: RSC Advances

ISSN: 2046-2069

Editorial: Royal Society of Chemistry

País: Reino Unido

Factor de impacto en 2017: 3.1



CrossMark
 click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 100281

Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity

Veymar G. Tacias-Pascacio,^{ab} Sara Peirce,^{ac} Beatriz Torrestiana-Sanchez,^b Malcon Yates,^a Arnulfo Rosales-Quintero,^d Jose J. Virgen-Ortiz^{†*a} and Roberto Fernandez-Lafuente^{*a}

Five different commercial supports (Lifetech™ ECR1061M (styrene/methacrylic polymer), Lifetech™ ECR8804M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR8806M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR1090M (styrene) and Lifetech™ ECR1030M (DVB/methacrylic polymer)) were compared to octyl agarose in their performance in the immobilization of four different lipases (from *Rhizomucor miehii* (RML), from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and the forms A and B from *Candida antarctica*, (CALA and CALB)) and of the phospholipase Lecitase Ultra™ (LU). The new enzymatic derivatives were evaluated and compared with the commercial biocatalyst (Novozym 435 (CALB), Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM). Textural properties, loading capacity, enzyme stability under different conditions, and activity *versus* different substrates were analyzed. Although all of the supports reversibly immobilized lipases *via* interfacial activation of lipases *versus* the hydrophobic surface of the support, some of them permitted a significant improvement in the final biocatalyst compared to the reference support or the commercial preparations. Enzyme specificity depended strongly on the used support (e.g., the new ones gave almost null activity *versus* *p*-nitrophenyl butyrate). However, there is not a universal optimal support; the “best” support depends on the enzyme, the parameter studied and the substrate utilized. Nevertheless, under the conditions utilized, the preparations showed a very good performance in a diversity of reactions and permitted their reuse (both the biocatalyst and the supports after eliminating the enzyme by washing the enzyme with triton X-100). These supports will permit enlarging the library of immobilized lipase biocatalyst, being supports useful for aqueous or organic medium.

Received 30th August 2016
 Accepted 17th October 2016

DOI: 10.1039/c6ra21730c

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Lipases are among the most utilized enzymes in biocatalysis because nature offers a wide variety of these enzymes with different properties^{1–7} and they are able to recognize a wide range of substrates,^{8–10} catalyzing many different reactions^{1–10} some of them very far from the physiological function, as the so-called promiscuous reactions.^{11–13} Moreover, they are very stable in different reaction media, from organic solvents^{14–16} to neoteric media.^{17–22}

Lipases are esterases able to work at the interface of their natural substrates, the drops of oils.^{23–29} This is possible thanks to the mechanism of interfacial activation: lipases have the capability to become adsorbed on the hydrophobic surface of these oil drops *via* their active center.^{23–29} The lipase active center and its surroundings are hydrophobic. In aqueous homogenous media, this area is usually isolated from the medium by a polypeptide chain called lid or flap, (closed form). The lid is mobile and has a hydrophobic internal face and a hydrophilic external face, the pocket formed by the internal side of the lid plus the active center surroundings make available a very large hydrophobic area, unfavorable in aqueous medium, that becomes stabilized after adsorption on the hydrophobic substrate drop (open form).^{23–29} The lipase active form shows the lid shifted (e.g., it is adsorbed to the hydrophobic surface of the substrate drop), exposing the active center to the medium and originating the active form of the lipase.^{23–29} The lid may be very small, unable to fully isolate the lipase active center from the medium, like in the case of the lipase B from *Candida antarctica*,³⁰ or very large and complex, like the double lid presented in a lipase from *Geobacillus thermocatenulatus*.³¹ The movement of the lid causes structural changes

^aInstituto de Catálisis-ICP-CSIC, C/Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail: juanvirgen@hotmail.com; rfl@icp.csic.es

^bUnidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel A. de Quevedo 2779, 91897 Veracruz, Mexico

^cDipartimento di Ingegneria Chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80125 Napoli, Italy

^dInstituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana Km. 1080, 29050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

[†]Permanent address: Catedrático CONACYT – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán, A.C., Antigua Carretera a Pátzcuaro s/n, 58341 Morelia, Michoacán, Mexico.

along the whole enzyme structure. This generates a great flexibility of the lipase active center and makes that the lipase properties may be easily altered without destroying its activity.^{32–39}

This tendency of lipases to become adsorbed on hydrophobic surfaces makes their handling complex, *e.g.*, lipases tend to form aggregates involving two open lipase molecules,^{40,41} or may become adsorbed on hydrophobic areas of other proteins,⁴² altering their properties. However, it has permitted to develop a strategy for the one step immobilization, purification, stabilization and hyperactivation of lipases involving the open form of the lipase.⁴³ The protocol is rather simple: lipases are the only water soluble proteins that become almost fully immobilized on hydrophobic supports at very low ionic strength.⁴⁴ There are many new supports that have enabled several new approaches for immobilization of lipases (nanorods and nanoparticles, core-shell, mesoporous silicates),⁴⁵ but the hydrophobic supports are mostly used to immobilize lipases *via* a reversible interfacial activation *versus* their hydrophobic surface.

Using this immobilization strategy, the high flexibility of the lipase active center^{23–31,34} permits that the final properties of the lipase depend on the support features even although the same immobilization mechanism is occurring and the same enzyme orientation is achieved: the support hydrophobicity, its surface topography and the presence of different groups on its surface alter the final catalytic properties of the immobilized lipase.^{46–49} In some instances, some lipases only are immobilized on a certain hydrophobic support, and this selective adsorption is not always a function of just higher or lower support hydrophobicity, in some instances this has permitted to separate different lipase isoforms.^{50–53}

Therefore, the availability of a large diversity of commercially hydrophobic supports having very different properties is very interesting. Many different hydrophobic supports have been used, in some cases supports coated with acyl groups (*e.g.*, silica^{54–59} or agarose^{44,45,50–53} coated with acyl groups), in other instances supports with a hydrophobic core (*e.g.*, styrene divinylbenzene) have been employed.^{48,49}

In this paper, we have compared 6 different commercial supports to immobilize several lipases, and compared them to the commercial immobilized preparations when available. Octyl-agarose beads support has been utilized as a reference support, as this support has been described as very useful to produce very active and stabilized lipase immobilized preparations (even more stable than those immobilized *via* multipoint covalent attachment).^{60,61} This support has been compared with 5 new ones, Lifetech™ ECR1061M (styrene/methacrylic polymer), Lifetech™ ECR8804M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR8806M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR1090M (styrene) and Lifetech™ ECR1030M (DVB/methacrylic polymer), new supports scarcely used in literature and never in a comparison like the one presented in this paper.⁶¹ As enzymes, we have used some of the most utilized in literature: lipases A and B from *Candida antarctica* (CALB^{62,63} and CALA⁶⁴), lipases from *Thermomyces lanuginosus* (TLL)⁶⁵ and from *Rhizomucor miehei* (RML).^{66,67} Lecitase Ultra (LU),

a commercial artificial chimeric phospholipase A1,^{68,69} has been also utilized, as this enzyme is able to suffer artificial activation as a standard lipase.⁷⁰ This enzyme is the result of the fusion of the gen of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* and that of the phospholipase from *Fusarium oxysporum*.^{66,67} All supports immobilize the lipases *via* interfacial activation *versus* their hydrophobic surfaces.

2. Experimental section

2.1. Materials

Supports were kindly supplied by Purolite® ECR Enzyme Immobilization Resins (Wales, UK). Soluble lipases from *Candida antarctica* (isoform A and B, CALA and CALB, respectively), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML) and phospholipase Lecitase Ultra as well as Novozym® 435, Lipozyme® RM IM and Lipozyme® TL immobilized enzymes were a kind gift from Novozymes (Spain). Commercial and home-made immobilized enzymes were washed with distilled water before its use, to ensure that we employ fully wet enzyme derivatives. Methyl phenylacetate, methyl mandelate, phenylacetic acid, mandelic acid, diacetin, triacetin and *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Octyl-agarose CL-4B beads were from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, USA). Other reagents were of analytical degree.

2.2. Standard determination of enzyme activity

This assay was performed by measuring the increase in absorbance at 348 nm produced by the released *p*-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM *p*-NPB in 25 mM sodium phosphate at pH 7.0 and 25 °C (ϵ under these conditions is 5150 M⁻¹ cm⁻¹). Reaction was started by adding 50–100 μ L of lipase solution or suspension to 2.55 mL of substrate solution. Spontaneous hydrolysis of *p*-NPB was monitored under identical conditions without enzyme. One unit of activity (*U*) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of *p*-NPB per minute under the conditions described previously. Protein concentration was estimated by the Bradford dye binding method,⁷¹ recording the absorbance at 595 nm and using bovine serum albumin as the reference.

2.3. Immobilization of enzymes

2.3.1. Wetting of the Purolite supports. Purolite supports are so hydrophobic that water can hardly penetrate into their pores. Therefore, these supports were submitted to a treatment to remove air and fill the pores with water. A sample of 10 g of each support was suspended in 50 mL of methanol for 1 h under mild stirring; after that, 50 mL of distilled water were added to have a 50% water solution. After 15 additional minutes of mild stirring, the supports were filtered under vacuum and washed 5 times in a glass funnel with 5 volumes of water. Finally, supports were stored at 4 °C, in flask with enough distilled water to avoid the dehydration.

2.3.2. Immobilization of lipases on octyl agarose (OC) and Purolite supports. Conditions previously described were used.⁴⁵ 10 g of each support was suspended in an enzyme solution (0.1–0.5 mg protein per mL) in 5 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C and left in continuous agitation at 200 rpm. The enzyme concentration and volume were adjusted to obtain the desired enzyme loading on the final biocatalyst. Activity of both supernatant and suspension was followed using the *p*NPB assay. After immobilization the suspension was filtered and the supported enzymes were washed several times with distilled water, and stored at 4 °C.

2.3.3. Determination of loading capacity of the different supports. The necessary volume of lipase solution (0.2 mg protein per mL in 5 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C) were added to 1 g of the each supports, to reach an amount of protein of 1–80 mg protein per g support. Supernatant samples were taken periodically to measure its activity by the *p*NPB (see above) assay and immobilization was considered to be complete when no significant changes in the activity on the supernatant were detected after 8 h under continuous agitation.

2.4. Study of the stability of the different lipase biocatalysts

2.4.1. Thermal inactivation of different enzyme immobilized preparations. 0.25 g of immobilized enzyme was suspended in 5 mL of 50 mM sodium acetate at pH 5, sodium phosphate at pH 7 or sodium bicarbonate at pH 9 at different temperatures. Periodically, samples were withdrawn and the activity was measured using methyl mandelate as described below.

2.4.2. Inactivation of different preparations in the presence of organic co-solvents. Enzyme preparations were incubated in mixtures of acetonitrile or 1,4-dioxane/100 mM Tris-HCl (pH 7) at different temperatures. After some time, samples were withdrawn and the activity was measured using methyl mandelate as described below. The organic co-solvents presented in the samples did not have a significant effect on the enzyme activity (results not shown).

2.5. Determination of the hydrolytic activity of the biocatalyst versus different substrates

2.5.1. Hydrolysis of triacetin. Solutions of 100 mM triacetin in 500 mM sodium acetate containing 20% acetonitrile at pH 5 were prepared (substrate was fully soluble). Then, we added 100 mg of the different biocatalysts to 10 mL of this substrate solution and the reaction suspensions were gently stirred at 25 °C. Samples were periodically withdrawn from these reaction suspensions and the biocatalyst was discarded by centrifugation. In order to determine the concentration of reaction products, supernatants were analyzed by RP-HPLC (JASCO PU-2085) coupled with a UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector. Detection was performed at 230 nm using 10% acetonitrile/water (v/v) as mobile phase and a Kromasil C18 column (15 cm × 0.46 cm). Retention times were 34.5 min for triacetin and 6.5 min for 1,2 diacetin. Concentrations of triacetin and diacetin were calculated from calibration curves using analytical

standards. Activity was determined by triplicate with a conversion of 20–30%, and data are given as average values.

2.5.2. Hydrolysis of methyl phenylacetate. For these experiments, 20–200 mg of the immobilized preparations were added to 0.5–3 mL of 20 mM substrate in 50 mM sodium phosphate at pH 7 containing 50% acetonitrile and 25 °C under continuous stirring. The conversion degree was analyzed by RP-HPLC (JASCO PU-2085 coupled with a UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector) using a Kromacil C18 (15 cm × 0.46 cm) column. Samples (20 µL) were injected and eluted at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ using acetonitrile/10 mM ammonium acetate (35 : 65, v/v) at pH 2.8 as mobile phase and UV detection was performed at 230 nm. The ester presented a retention time of 3.5 minutes while the acid had a retention time of 9.6 minutes. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 µmol of phenylacetic acid per minute under the condition described above. Activity was determined by triplicate with a maximum conversion of 20–30%, and data are given as average values.

2.5.3. Hydrolysis of the *R*- and *S*-methyl mandelate. Enzyme activity was also determined using *R* or *S*-methyl mandelate as substrate. For these experiments 50–300 mg of the immobilized preparations were added to 1–2 mL of 50 mM substrate in 50 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C under continuous stirring. The conversion degree was analyzed by RP-HPLC (JASCO PU-2085 coupled with a UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector) using a Kromacil C18 (15 cm × 0.46 cm) column. Samples (20 µL) were injected and eluted at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ using acetonitrile/10 mM ammonium acetate (35 : 65, v/v) at pH 2.8 as mobile phase and UV detection was performed at 230 nm. The ester presented a retention time of 4.2 minutes while the acid had a retention time of 2.4 minutes. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 µmol of mandelic acid per minute under the condition described above. Activity was determined by triplicate with a maximum conversion of 20–30%, and data are given as average values.

2.6. SDS-PAGE analysis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Laemmli⁷² using a Miniprotean tetra-cell (Bio-Rad), 14% running gel in a separation zone of 9 cm × 6 cm, and a concentration zone of 5% polyacrylamide. To analyze the amount of proteins adsorbed on supports, a sample of 100 mg of the support was re-suspended in 1 mL of rupture buffer (2% SDS and 10% mercaptoethanol), boiled for 8 min and a 10 µL aliquot of the supernatant was used in the experiments. The samples were run at 80 volts until the lowest marker reached the lower edge of the gel. Gels were stained with Coomassie brilliant blue. A low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare) was used as a molecular weight marker (14.4–97 kDa).

2.7. Textural features of the different supports

The textural characterization of the supports was determined by Mercury Intrusion Porosimetry (MIP). In this technique

approximately 0.1 g of sample, previously dried overnight at 60 °C, was accurately weighed into a sample holder and placed in a low-pressure porosimeter (Pascal 140, Thermo Scientific). The sample was then outgassed to a vacuum of 0.1 kPa and flooded with mercury. The pressure over the mercury was then slowly increased from vacuum to 400 kPa, and the intrusion data were collected as a function of the applied pressure. Subsequently, the pressure was reduced to ambient pressure, and the sample holder was removed and weighed before being placed in the high pressure porosimeter (Pascal 240, Thermo Scientific) in which the pressure was raised from atmospheric pressure up to 200 MPa. The combined pressure/volume data was converted into a cumulative pore volume *versus* pore diameter curve by use of the Washburn equation⁷³ with the recommended values of surface tension (484 dyne per cm) and contact angle (141) for mercury.⁷⁴ Thus, starting under vacuum conditions and increasing the pressure to 200 MPa, the textural characteristics of the materials over a range of approximately 120 μm down to 7.5 nm was determined. Analysis of the data gives rise to the cumulative pore volume, pore size distribution, bulk and skeletal densities. Assuming a cylindrical non-intersecting pore model, the intrusion data also provide an indication of the surface area of the materials by summation of the surface areas of the pore walls at each incremental pressure. However, as the low pressure data was due to the interparticulate porosity of the materials only the data below 1000 nm was considered for the calculation of the pore volume due the intraparticulate porosity within the support material. From the data below 1000 nm the first upward deviation in the cumulative curve is denominated as the “threshold diameter” and may be considered as the limiting diameter below which the porous structure of the support materials becomes accessible. From the derivative of the cumulative intrusion curve the peak maxima indicate the sizes of the most frequent pores in the material.

3. Results and discussion

3.1. Support characterization

Table 1 shows the main textural features of the 5 new supports used in this paper. Results point that all of them has porosity much larger than the lipases size (the largest one if RML with dimensions of: 71.6 Å × 75 Å × 55 Å).⁷⁵ Specific area is quite large for most supports (over 100 m² g⁻¹ for supports styrene and styrene methacrylate), the lower specific area is for support octadecyl methacrylate (25 m² g⁻¹). At first glance, all of them may be suitable for protein immobilization.

3.2. Loading capacity of the different supports

Enzyme loading capacity is determined by the specific area of the support and the pore diameter (must be enough to enable the entry of the enzyme). At first glance, optimal support should be independent on the enzyme utilized provided that the pore is large enough to permit the entry of the enzyme and mainly related to that features (Table 1). However, Table 2 shows that this is not the case. Styrene methacrylate is the support enabling the lowest loading using CALA and CALB. However, immobilizing LU and TLL, octyl agarose offered the lowest loading and using RML the worst results were using 3 of the supports, octyl agarose, DVB methacrylate and octadecyl methacrylate. This suggests that some other factors may be affecting the loading capacity of the supports.

The support with the highest loading also changed when changing the enzyme. Using CALA, differences are not clear using octyl agarose, octadecyl methacrylate or DVB methacrylate. Using CALB, octadecyl methacrylate allowed the highest loading, shortly followed by styrene and DVB methacrylate. For LU, styrene was the best matrix, followed by octadecyl methacrylate and by DVB methacrylate. In the case of RML, octadecyl methacrylate enabled the maximum loading, followed by styrene. TLL reached maximum loading when using octadecyl methacrylate followed by DVB methacrylate.

Interestingly, except for CALA, always there are some supports that permit a significant higher loading than the reference support (octyl agarose): with CALB the best new support permitted a 50% higher loading, 6 folds using LU, almost 7 times using RML and more than 3 folds using TLL, although the best support regarding loading capacity is not the same for all enzymes as discussed above. Among this diversity, it is remarkable that octadecyl methacrylate is in all cases first or second in loading capacity, styrene or DVB methacrylate are in one of these positions in 3 cases.

The differences may be explained considering several facts. It has been previously shown that hydrophobicity is not the only feature that produces lipase adsorption (*e.g.*, pancreatic lipase immobilization in phenyl but not octyl supports).⁵² Moreover, there are a competition between lipase–lipase interaction and interaction of the lipase with the support.^{40–42} Finally, the immobilization rate of the enzyme in the support may produce different packing of the lipases: if it is very rapid, distance between lipases may be very small, while if immobilization is slow enough, the distance between lipase molecules may be similar to the protein size.^{76–80}

Table 1 Textural properties of commercial Purolite® supports. Experimental details are given in Section 2

Support	Pore volumen (cm ³ g ⁻¹)	Bulk density (g cm ³)	Skeletal density (g cm ³)	Porosity (%)	Surface area (m ² g ⁻¹)	Threshold diameter (mm)	Maximum pore size (nm)
Styrene	1.36 ± 0.06	0.36 ± 0.03	0.91 ± 0.04	60 ± 2	129 ± 7	600 ± 22	108 ± 3
Styrene methacrylate	0.78 ± 0.02	0.55 ± 0.04	1.03 ± 0.03	47 ± 1	105 ± 6	225 ± 8	48 ± 3
Octadecyl methacrylate	0.46 ± 0.02	0.66 ± 0.03	1.29 ± 0.05	49 ± 2	56 ± 3	150 ± 5	52 ± 2
DVB methacrylate	0.46 ± 0.03	0.69 ± 0.04	1.10 ± 0.04	38 ± 1	81 ± 5	80 ± 2	29 ± 1
Octadecyl methacrylate	0.19 ± 0.01	0.85 ± 0.05	1.14 ± 0.06	26 ± 1	25 ± 2	140 ± 5	40 ± 2

Table 2 Loading capacity of the different studied supports. Experiments were performed as described in Section 2., using the adequate volumes of 0.2 mg protein mL⁻¹ solution of the different commercial lipases in 5 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C. Loading capacity is given in mg of protein per g of support

Supports	Lipases				
	CALA	CALB	Lecitase Ultra	RML	TLL
Octyl agarose	9 ± 0.53	8 ± 0.16	4 ± 0.19	7 ± 0.07	5 ± 0.22
Macroporous styrene	5 ± 0.24	11 ± 0.61	25 ± 0.37	31 ± 0.56	12 ± 0.02
Styrene methacrylate	0.5 ± 0.01	4 ± 0.18	8 ± 0.45	24 ± 0.39	6 ± 0.22
Octadecyl methacrylate	10 ± 0.41	13 ± 0.21	21 ± 0.62	47 ± 0.43	17 ± 0.83
DVB methacrylate	10 ± 0.14	10 ± 0.20	17 ± 0.37	16 ± 0.83	13 ± 0.30
Octadecyl methacrylate	5 ± 0.25	9 ± 0.19	14 ± 0.21	20 ± 0.39	10 ± 0.44

3.3. Thermal stability of the different lipase preparations

Table 3 shows the stability studies of all enzyme preparations at different pH values, showing the residual activity after specific incubation times (those where the octyl-agarose gave 40–60% using *p*NPB as substrate). This strategy was used due to the extremely low activity found using *p*NPB of the enzymes immobilized on the new supports, low activity that as not related to adsorption of the substrate to the matrix. This result was also obtained using styrene/divinylbenzene.⁴⁹

After 24 h of incubation of the enzyme preparations at 4 °C, their residual activities were determined using *S* methyl mandelate as described in methods section.

At pH 7, the most stable CALA preparation was styrene methacrylate (57% residual activity). Styrene CALA, octyl agarose CALA and octadecyl methacrylate CALA presented similar stabilities (just over 40% residual activities) and were the second most stable ones, while DVB methacrylate CALA was the least stable (12% residual activity). Moving to CALB,

Table 3 Residual activity (%) of the different studied lipase biocatalysts after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2., determining the residual activity using *S*-methyl mandelate as substrate

Lipase	Enzymatic derivative	pH 5	pH 7	pH 9	Acetonitrile	Dioxane
CALA	Octyl agarose	24 ± 1.1	42 ± 1.4	78 ± 2.1	65 ± 2.0	55 ± 2.2
	Styrene	36 ± 1.6	44 ± 1.1	73 ± 2.6	52 ± 1.1	42 ± 1.3
	Styrene methacrylate	56 ± 1.8	57 ± 1.5	75 ± 2.0	57 ± 1.9	55 ± 1.7
	Octadecyl methacrylate	14 ± 0.5	29 ± 0.6	54 ± 1.9	19 ± 0.3	28 ± 0.9
	DVB methacrylate	9 ± 0.4	12 ± 0.6	51 ± 2.1	15 ± 0.4	19 ± 0.7
CALB	Octadecyl methacrylate	28 ± 0.9	42 ± 1.0	53 ± 1.5	31 ± 1.3	43 ± 1.6
	Octyl agarose	18 ± 0.8	12 ± 0.3	11 ± 0.2	15 ± 0.6	15 ± 0.8
	Styrene	19 ± 1.0	31 ± 0.8	49 ± 1.8	6 ± 0.3	5 ± 0.6
	Styrene methacrylate	24 ± 0.6	25 ± 0.6	19 ± 0.5	12 ± 0.7	22 ± 1.8
	Octadecyl methacrylate	25 ± 0.9	49 ± 1.3	60 ± 2.2	24 ± 0.9	15 ± 0.9
LU	DVB methacrylate	15 ± 0.4	16 ± 0.2	29 ± 0.7	9 ± 0.6	9 ± 0.5
	Octadecyl methacrylate	52 ± 1.9	79 ± 2.6	77 ± 2.4	13 ± 0.5	15 ± 0.9
	Novozym® 435	27 ± 1.1	51 ± 1.8	75 ± 2.9	16 ± 1.8	21 ± 1.0
	Octyl agarose	74 ± 2.8	79 ± 2.1	46 ± 1.7	73 ± 3.1	67 ± 1.9
	Styrene	41 ± 1.9	80 ± 3.8	43 ± 2.2	66 ± 1.5	64 ± 1.8
RML	Styrene methacrylate	76 ± 3.0	63 ± 1.9	42 ± 1.5	62 ± 1.9	59 ± 1.1
	Octadecyl methacrylate	59 ± 2.2	79 ± 3.1	40 ± 1.8	75 ± 2.8	70 ± 1.9
	DVB methacrylate	41 ± 1.5	69 ± 2.4	44 ± 0.7	60 ± 2.0	51 ± 0.9
	Octadecyl methacrylate	71 ± 3.1	71 ± 2.7	58 ± 1.6	48 ± 1.1	43 ± 0.3
	Octyl agarose	35 ± 1.2	76 ± 3.5	54 ± 1.4	72 ± 2.2	67 ± 2.9
TLL	Styrene	49 ± 1.0	66 ± 2.1	42 ± 0.8	49 ± 1.5	25 ± 0.6
	Styrene methacrylate	54 ± 1.7	76 ± 2.9	34 ± 1.0	47 ± 0.3	30 ± 0.9
	Octadecyl methacrylate	24 ± 0.5	49 ± 2.0	43 ± 1.7	44 ± 1.3	27 ± 0.2
	DVB methacrylate	31 ± 0.7	65 ± 2.2	60 ± 2.5	41 ± 0.2	51 ± 1.7
	Octadecyl methacrylate	33 ± 0.2	58 ± 1.7	56 ± 1.6	55 ± 1.5	26 ± 0.3
TLL	Lipozyme® RM IM	38 ± 0.9	63 ± 3.0	56 ± 2.2	52 ± 0.9	51 ± 2.1
	Octyl agarose	41 ± 1.7	79 ± 3.3	48 ± 2.0	53 ± 1.8	22 ± 1.3
	Styrene	55 ± 1.2	77 ± 1.9	52 ± 1.5	41 ± 1.1	52 ± 3.4
	Styrene methacrylate	40 ± 2.0	75 ± 3.7	48 ± 1.9	28 ± 0.8	4 ± 0.3
	Octadecyl methacrylate	24 ± 0.9	87 ± 3.1	69 ± 2.9	23 ± 0.9	50 ± 2.2
TLL	DVB methacrylate	49 ± 1.2	59 ± 1.4	76 ± 3.3	49 ± 2.3	57 ± 1.6
	Octadecyl methacrylate	51 ± 1.7	88 ± 3.0	53 ± 2.1	41 ± 1.4	37 ± 1.1
	Lipozyme® TL	20 ± 0.8	82 ± 3.3	27 ± 1.0	9 ± 0.6	4 ± 0.2

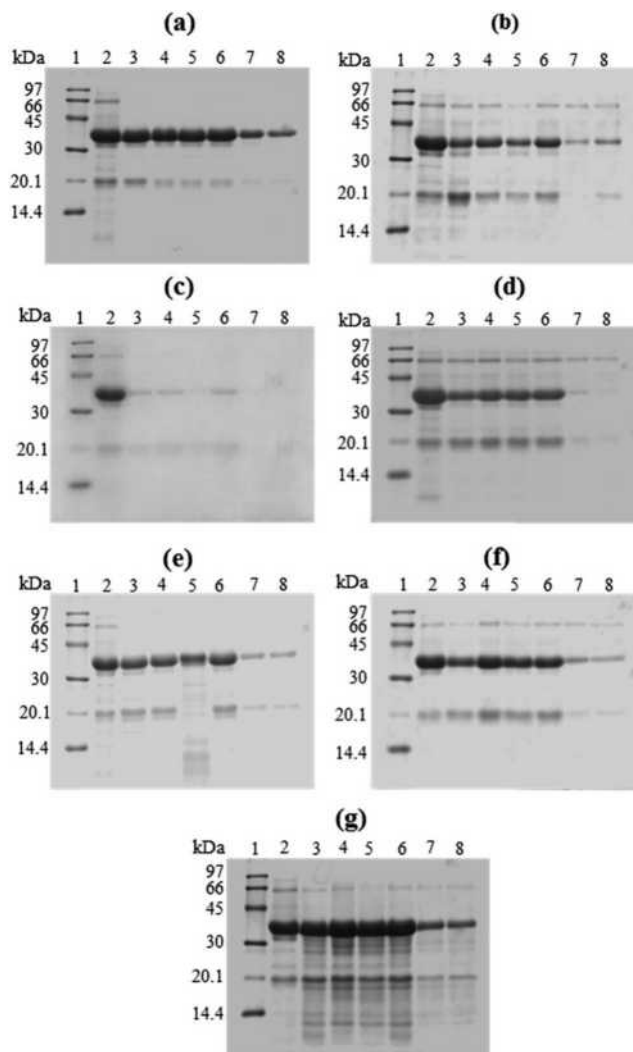


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of different CALB-biocatalysts preparations after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2. The gel shows the enzyme that remains bound to the support after inactivation. Panels (a) octyl agarose, (b) styrene, (c) styrene methacrylate, (d) octadecyl methacrylate, (e) DVB methacrylate, (f) octadecyl methacrylate, and (g) Novozym 435. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: commercial free CALB, lane 3: CALB-biocatalyst, lane 4: incubation at pH 7, lane 5: incubation at pH 5, lane 6: incubation at pH 9, lane 7: incubation in 50% acetonitrile, and lane 8: incubation in 80% dioxane.

octadecyl methacrylate CALB (79% residual activity) was the only with higher residual activity compared to Novozym 435 (51%). The lowest stability using CALB biocatalysts were octyl agarose (12%) and DVB methacrylate. In the case of LU, octyl agarose LU and styrene LU were the most stable (80% residual activity) while styrene methacrylate was the less stable (63%). RML was most stable when immobilized on styrene methacrylate or octyl agarose (76% residual activity), and the lowest stability was observed using octadecyl methacrylate (49%), while the commercial RML IM retained 63% of the activity. Octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate TLL were the most stable TLL preparations (87–88% remnant activity) while TLL IM presented 82% residual activity

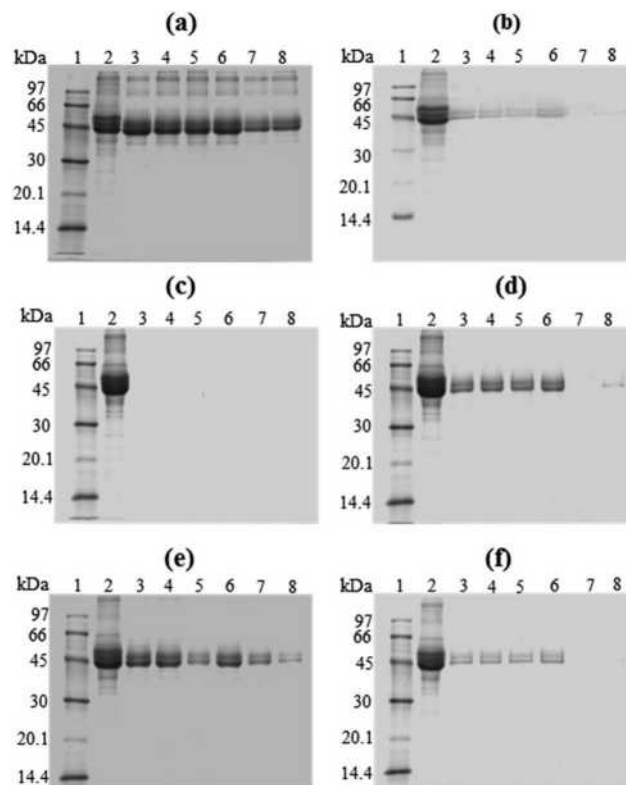


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of different CALA-biocatalysts preparations after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2. Panels (a) octyl agarose, (b) styrene, (c) styrene methacrylate, (d) octadecyl methacrylate, (e) DVB methacrylate, and (f) octadecyl methacrylate. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: commercial free CALA, lane 3: CALA-biocatalyst, lane 4: incubation at pH 7, lane 5: incubation at pH 5, lane 6: incubation at pH 9, lane 7: incubation in 50% acetonitrile, and lane 8: incubation in 80% dioxane.

and octyl agarose TLL kept 79%. The least stable TLL preparation at this pH was DVB methacrylate.

The situation changes when the inactivation pH was altered, although not for all enzyme with the same intensity. Using CALA, the most stable preparation at pH 5 and 9 remained styrene methacrylate CALA, although at pH 9 octyl agarose CALA was very similar. The second most stable was styrene at both pH values, at pH 9 was near the value of styrene methacrylate CALA. The preparation with the lower stabilities also was similar, DVB methacrylate CALA, although at pH 9 octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate CALA presented very similar residual activity.

Employing CALB, the results at pH 5 and 9 were not qualitatively very different to the results at pH 7. The most and the least stable preparations were the same, although slight differences could be appreciated. In the case of LU, differences were clear when the inactivation pH was altered. At pH 5, styrene LU moved from the most stable to be among the least stable preparations. At pH 9, octadecyl methacrylate LU was the most stable preparation.

Styrene RML remained the most stable one at pH 5, while at pH 8 the most stable RML preparation was DVB methacrylate RML. Octadecyl methacrylate RML remained the least stable at pH 5, but styrene was less stable at pH 9.

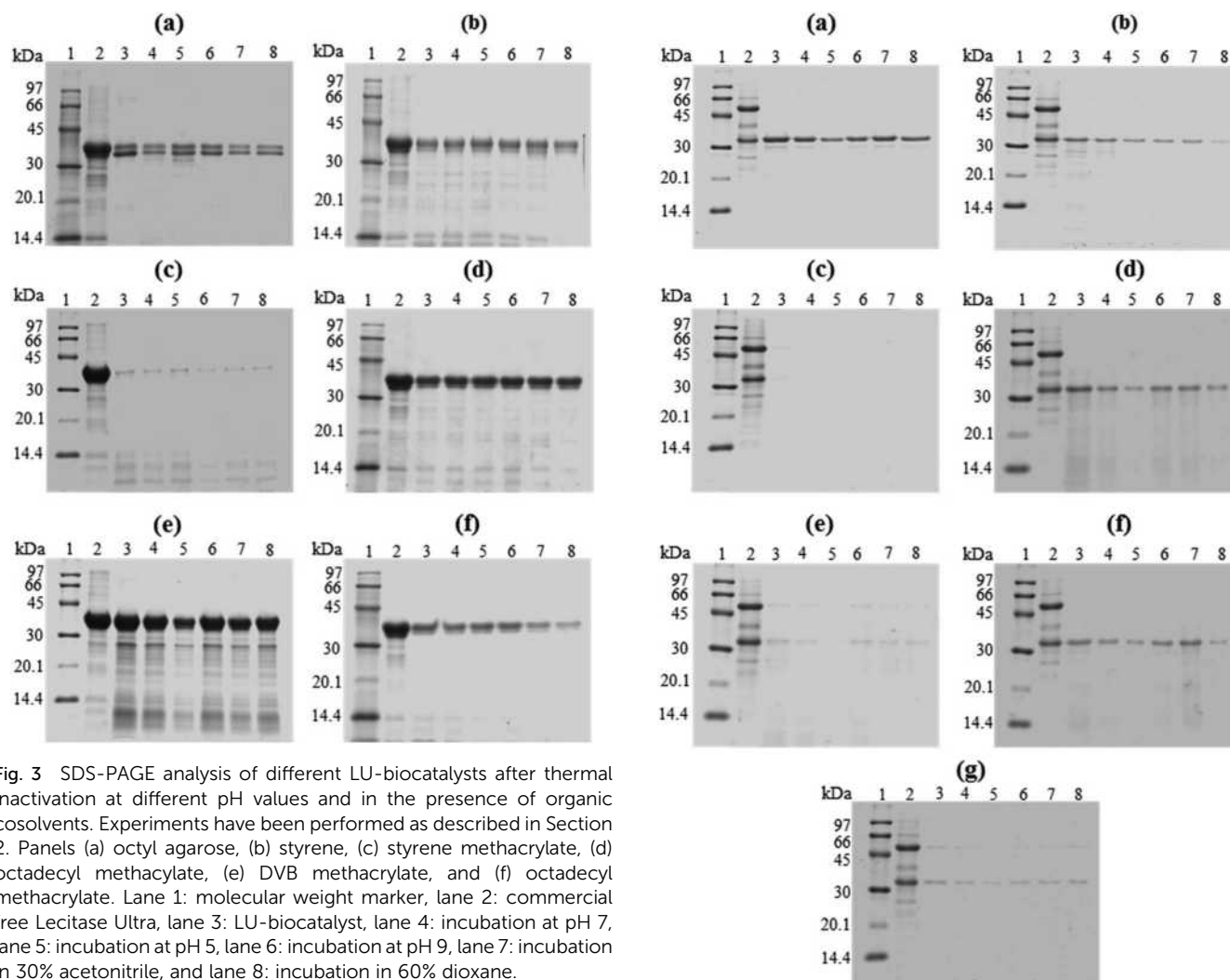


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of different LU-biocatalysts after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2. Panels (a) octyl agarose, (b) styrene, (c) styrene methacrylate, (d) octadecyl methacrylate, (e) DVB methacrylate, and (f) octadecyl methacrylate. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: commercial free Lecitase Ultra, lane 3: LU-biocatalyst, lane 4: incubation at pH 7, lane 5: incubation at pH 5, lane 6: incubation at pH 9, lane 7: incubation in 30% acetonitrile, and lane 8: incubation in 60% dioxane.

TLL–styrene was the most stable TLL-preparation at pH 5 and DVB methacrylate TLL was the most stable one at pH 9. The least stable preparations also depended on the pH, at pH 5 was octadecyl methacrylate TLL and at pH 9 was the commercial IM-TLL.

Qualitative differences in stability when changing the pH value were clear, but usually not very large. Considering that the immobilization is *via* interfacial activation and the orientation should be similar, the changes may be derived from some ionic groups that could be introduced on the resins during preparation (*e.g.*, some negative charges due to oxidations) or that different movements on the enzyme structure are produced under different conditions⁸¹ and can favored/difficulty some positive/negative enzyme-support interactions.⁸²

3.4. Solvent stability of the different lipase biocatalyst

Next, we have analyzed the stability of the different enzyme preparations in two organic cosolvents, acetonitrile and dioxane (Table 3). In most cases, the qualitative values were coincident using both solvents. Using CALA, the most stable preparations were those prepared using octyl agarose and styrene, similar to the results found in thermal inactivations. The least stable

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of different RML-biocatalysts preparations after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2. Panels (a) octyl agarose, (b) styrene, (c) styrene methacrylate, (d) octadecyl methacrylate, (e) DVB methacrylate, (f) octadecyl methacrylate, and (g) Lipozyme RM IM. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: commercial free RML, lane 3: RML-biocatalyst, lane 4: incubation at pH 7, lane 5: incubation at pH 5, lane 6: incubation at pH 9, lane 7: incubation in 30% acetonitrile, and lane 8: incubation in 35% dioxane.

CALA preparation was that prepared using DVB methacrylate. Using LU, the most stable preparations were octadecyl methacrylate and octyl agarose LU, and the least stable one was octadecyl methacrylate LU. Using TLL, DVB methacrylate was the most stable catalyst and IM-TLL the least stable one. Using acetonitrile, TLL–octyl agarose presented a similar high stability (but not in dioxane, where it was among the least stable ones).

With RML and CALB the situation is not so similar when changing the organic solvent. In the case of CALB, the most stable preparation was octadecyl methacrylate in acetonitrile and styrene in dioxane. The least stable preparations were styrene and DVB methacrylate CALB. Octyl agarose RML was the most stable preparation in both solvents, but DVB methacrylate and octadecyl methacrylate RML were the least stable ones in

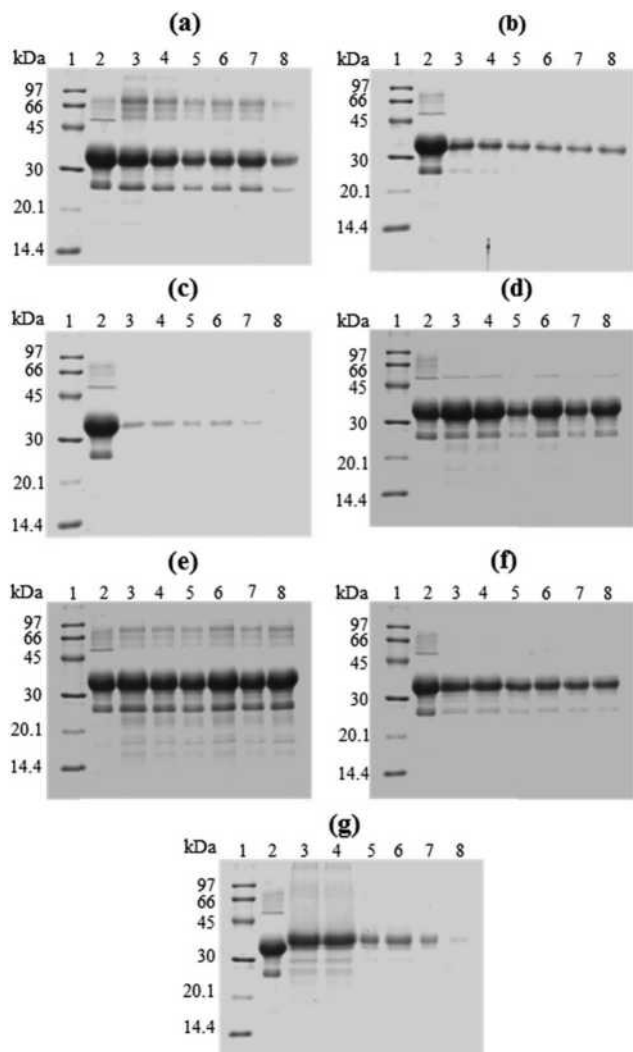


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of different TLL-biocatalysts preparations after thermal inactivation at different pH values and in the presence of organic cosolvents. Experiments have been performed as described in Section 2. Panels (a) octyl agarose, (b) styrene, (c) styrene methacrylate, (d) octadecyl methacrylate, (e) DVB methacrylate, (f) octadecyl methacrylate, and (g) Lipozyme TL. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: commercial free TLL, lane 3: TLL-biocatalyst, lane 4: incubation at pH 7, lane 5: incubation at pH 5, lane 6: incubation at pH 9, lane 7: incubation in 50% acetonitrile, and lane 8: incubation in 60% dioxane.

acetonitrile; the same behavior was observed with styrene, octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate RML in dioxane. These differences may be related to changes in the inactivation route when changing the solvent,⁸¹ but also with a different release of the enzyme to the reaction media caused by the different conditions,⁸³ and even a different change in the swelling properties of the different solvents that could really alter the support internal geometry.

3.5. Analysis of enzyme desorption during thermal and solvent inactivation

One of the problems related to the immobilization of lipases on hydrophobic supports is the desorption of the enzymes to the

medium after enzyme during incubation under drastic conditions.⁸³ Fig. 1–5 show the analysis of the enzyme-support *via* SDS-PAGE after inactivation under different conditions. The lower the intensity of the protein band compared to the protein band before inactivation, the lower the amount of enzyme that remain attached to the support.

Styrene methacrylate is the support that has the lowest amount of enzyme in all cases fitting the previous results (Table 2). Moreover, it was the support that retained least enzyme in all cases, suggesting that is the one with lower affinity for the assayed lipases. CALA and RML cannot be detected on the support after the incubation in all the inactivation conditions assayed.

Results were different when changing the enzyme, although some enzyme release could be observed from all supports and enzymes at least in some conditions. CALB in thermal inactivations seem to release a low amount of enzyme except for styrene methacrylate. In organic solvent inactivations, all preparations lost most of the enzyme, without significant improvements comparing to the results obtained using Novozym 435 even although stabilities were significantly improved in certain cases. Using TLL, several of the new supports offered higher enzyme retention compared to the octyl support or the IM-TLL preparation (although the immobilization in this case follows a different method), mainly in organic solvent inactivations. Lecitase is the enzyme that more strongly immobilized on all supports, although some enzyme release under certain conditions may be appreciated using divinylbenzene or octadecyl methacrylate. Thus, in some instances the new supports permit a better retention of the enzyme that the commercial octyl agarose or the commercial preparations, while in other case not. And that it is not fully correlated to the stability results.

3.6. Activity and specificity of the different enzyme immobilized on the different supports

The activity of the entire immobilized enzyme *versus* pNPB was almost fully suppressed except for octyl-agarose (results not shown). This result coincides with that obtained using styrene/divinylbenzene beads.⁴⁹ However, when using other substrates, the immobilized enzymes exhibited very high activity, in many instances overpassing those of the commercial preparations or the octyl-immobilized lipases.

3.6.1. Hydrolysis of triacetin. Table 4 shows the activity of all biocatalysts *versus* triacetin at pH 5 conditions adequate to produce 1,2 diacetin without suffering acyl migration⁸⁴ using the enzyme preparations at maximum loading.

Using CALA, the highest activity per gram of biocatalyst was obtained using DVB methacrylate, 3.3 folds higher than using octyl-CALA. Styrene methacrylate permitted also a significant higher activity than octyl agarose using this enzyme and substrate. On the other side, octadecyl methacrylate was the least active (hundreds of folds). Considering the activity per mg of protein, that show how the immobilization affects the properties of the enzyme, styrene methacrylate permitted to achieve the highest specific activity (it was the one with lowest

Table 4 Activity of different lipase biocatalyst versus triacetin (100 mM) at pH 5 and 25 °C. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (V) is given in μ moles of substrate hydrolyzed per min and per mg of immobilized enzyme and also and also per g of biocatalyst

Lipase	Enzymatic derivative	V ($U\ mg^{-1}\ protein$)	V ($U\ g^{-1}\ enzymatic\ derivative$)
CALA	Octyl agarose	0.0147 ± 0.0005	0.132 ± 0.0051
	Styrene	0.0146 ± 0.0005	0.071 ± 0.0032
	Styrene methacrylate	0.7104 ± 0.0322	0.341 ± 0.0156
	Octadecyl methacrylate	0.0106 ± 0.0012	0.109 ± 0.0052
	DVB methacrylate	0.0422 ± 0.0019	0.438 ± 0.0214
CALB	Octadecyl methacrylate	0.0003 ± 0.00001	0.002 ± 0.0001
	Octyl agarose	0.69 ± 0.005	5.34 ± 0.04
	Styrene	0.27 ± 0.012	3.00 ± 0.12
	Styrene methacrylate	1.13 ± 0.055	4.96 ± 0.22
	Octadecyl methacrylate	0.44 ± 0.019	5.69 ± 0.19
	DVB methacrylate	0.37 ± 0.016	3.71 ± 0.16
LU	Octadecyl methacrylate	0.44 ± 0.012	4.04 ± 0.12
	Novozym® 435	0.06 ± 0.002	5.21 ± 0.19
	Octyl agarose	0.020 ± 0.0009	0.079 ± 0.004
	Styrene	0.010 ± 0.0003	0.254 ± 0.012
	Styrene methacrylate	0.008 ± 0.0002	0.058 ± 0.002
	Octadecyl methacrylate	0.079 ± 0.0031	1.665 ± 0.072
RML	DVB methacrylate	0.008 ± 0.0002	0.134 ± 0.006
	Octadecyl methacrylate	0.122 ± 0.0058	1.651 ± 0.062
	Octyl agarose	0.65 ± 0.008	4.76 ± 0.06
	Styrene	0.13 ± 0.005	3.87 ± 0.15
	Styrene methacrylate	0.14 ± 0.007	3.49 ± 0.16
	Octadecyl methacrylate	0.29 ± 0.014	13.6 ± 0.65
TLL	DVB methacrylate	0.10 ± 0.004	1.52 ± 0.07
	Octadecyl methacrylate	0.63 ± 0.032	12.5 ± 0.53
	Lipozyme® RM IM	0.03 ± 0.002	1.40 ± 0.17
	Octyl agarose	0.50 ± 0.0247	2.25 ± 0.10
	Styrene	0.33 ± 0.0165	4.16 ± 0.11
	Styrene methacrylate	1.02 ± 0.0408	5.55 ± 0.27
TLL	Octadecyl methacrylate	1.16 ± 0.0483	19.15 ± 0.86
	DVB methacrylate	0.30 ± 0.0146	3.71 ± 0.15
	Octadecyl methacrylate	1.01 ± 0.0503	9.99 ± 0.46
	Lipozyme® TL	0.02 ± 0.003	1.43 ± 0.16

loading capacity for this enzyme) followed by DVB methacrylate (but this was 15 fold lower). The enzyme immobilized on octyl agarose had a specific activity around 3 fold lower than using DVB methacrylate.

Using CALB differences are not so large. Octadecyl methacrylate CALB gave an activity per g of biocatalyst slightly higher than octyl-agarose CALB and Novozym 435, the enzyme immobilized in macroporous styrene showed the lowest activity (slightly over 50% of the activity of octadecyl methacrylate CALB). Again styrene methacrylate gave the highest CALB specific activity, being the styrene CALB the one exhibiting the lowest specific activity.

In the case of LU, the immobilization on octadecyl methacrylate and methacrylate gave the higher activity per g of catalyst, styrene methacrylate LU was the least activity shortly followed by octyl agarose LU. Considering the mg of enzyme, LU immobilized on octadecyl methacrylate presented clearly more specific activity than when immobilized on octadecyl methacrylate and both were well over the other ones (6–15 folds).

Octadecyl methacrylate RML was almost 9 folds more active than the commercial preparation, and almost 3 folds more active than octyl agarose RML. The second least active was the DVD methacrylate. Considering the activity per mg of enzyme,

RML immobilized on octyl agarose and on octadecyl methacrylate exhibited similar activities.

TL IM was the least active one, and was more than 13 folds less active than the most active biocatalyst, octadecyl methacrylate TLL. The second most active had 50% of the activity and was octadecyl methacrylate, while octyl agarose TLL was the second least active. Regarding the specific activity of TLL, styrene methacrylate, octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate presented a similar activity, doubling that obtained using octyl agarose.

Thus, considering the hydrolysis of triacetin, there are no a single “optimal” support to immobilize the enzymes of this study; results are different for each enzyme and sometimes it is not related to the maximum loading, as specific activity of the immobilized enzyme changes when changing the support. Thereby, the support producing the maximum activity using the lowest amount of enzyme should be selected, *e.g.*, octadecyl methacrylate LU should be more adequate than octadecyl methacrylate because the activity per g of support is similar, but the first has lower enzyme loading than the second biocatalyst.

3.6.2. Hydrolysis of methyl phenylacetate. Results of the hydrolysis of methyl phenylacetate are shown in Table 5. DVD methacrylate CALA and styrene methacrylate CALA were around

Table 5 Activity of different lipase biocatalyst *versus* methyl phenylacetate (20 mM) at pH 7 and 25 °C. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) is given in μmoles of substrate hydrolyzed per mg of immobilized enzyme and also per g of biocatalyst

Lipase	Enzymatic derivative	V (U mg^{-1} enzyme)	V (U g^{-1} enzymatic derivative)
CALA	Octyl agarose	0.008 ± 0.0002	0.08 ± 0.004
	Styrene	0.007 ± 0.0003	0.04 ± 0.001
	Styrene methacrylate	0.276 ± 0.0134	0.13 ± 0.006
	Octadecyl methacrylate	0.008 ± 0.0003	0.08 ± 0.004
	DVB methacrylate	0.016 ± 0.0002	0.17 ± 0.002
	Octadecyl methacrylate	0.011 ± 0.0003	0.05 ± 0.002
CALB	Octyl agarose	13.3 ± 0.6	103 ± 5
	Styrene	7.78 ± 0.4	87 ± 4
	Styrene methacrylate	7.26 ± 0.3	32 ± 2
	Octadecyl methacrylate	12.8 ± 0.6	166 ± 8
	DVB methacrylate	14.9 ± 0.7	149 ± 7
	Octadecyl methacrylate	15.2 ± 0.8	141 ± 7
LU	Novozym® 435	2.48 ± 0.1	204 ± 9
	Octyl agarose	0.009 ± 0.0004	0.04 ± 0.002
	Styrene	0.106 ± 0.0053	2.60 ± 2.131
	Styrene methacrylate	0.299 ± 0.0148	2.26 ± 0.112
	Octadecyl methacrylate	0.004 ± 0.0001	0.09 ± 0.004
	DVB methacrylate	0.044 ± 0.0022	0.76 ± 0.033
RML	Octadecyl methacrylate	0.001 ± 0.0001	0.02 ± 0.0008
	Octyl agarose	0.24 ± 0.009	1.77 ± 0.06
	Styrene	0.32 ± 0.014	9.80 ± 0.33
	Styrene methacrylate	0.63 ± 0.004	15.4 ± 0.10
	Octadecyl methacrylate	0.23 ± 0.011	10.8 ± 0.52
	DVB methacrylate	0.43 ± 0.021	6.61 ± 0.30
TLL	Octadecyl methacrylate	0.30 ± 0.013	5.99 ± 0.27
	Lipozyme® RM IM	0.63 ± 0.031	29.7 ± 1.43
	Octyl agarose	0.011 ± 0.0003	0.05 ± 0.001
	Styrene	<0.011	<0.05
	Styrene methacrylate	<0.011	<0.05
	Octadecyl methacrylate	<0.011	<0.05
	DVB methacrylate	<0.011	<0.05
	Octadecyl methacrylate	<0.011	<0.05
	Lipozyme® TL	<0.011	<0.05

twice more active than octyl agarose CALA. Styrene and octadecyl methacrylate were the least active ones, about four folds, this was the main difference comparing the results obtained triacetin, where octadecyl methacrylate was clearly the least active one. In specific activity, CALA was clearly the most active when immobilized on styrene methacrylate and the least active when immobilized on styrene and octadecyl methacrylate.

Novozym 435 was the most active CALB biocatalyst with this substrate, a 20% more than octadecyl methacrylate or a 25% than DVD methacrylate CALB or octadecyl methacrylate. The least active CALB biocatalyst was styrene CALB. Agarose octyl CALB activity was 50% of that of Novozyme 435, and it was more active than styrene CALB and the least active one, styrene methacrylate CALB. In specific activity of CALB, octadecyl methacrylate, DVD methacrylate and octyl agarose gave similar values, shortly followed by octadecyl methacrylate and doubling the values of styrene and styrene methacrylate.

Using LU, the most active biocatalyst was styrene LU, that was 65 folds more active than octyl agarose. Styrene methacrylate LU was the second most active (15% less active) while the least active was octadecyl methacrylate LU (half the activity of octyl agarose LU). The picture was very different to that obtained

with triacetin (Table 2). Regarding the specific activity of LU, styrene methacrylate permitted the highest one, more than 30 folds that obtained using octyl agarose. The lowest one was observed using octadecyl methacrylate.

RML biocatalysts gave also very different results using this substrate compared to triacetin. IM RML was the most active with this substrate, doubling the activity of the second one, styrene methacrylate RML. The least active biocatalyst was octyl agarose LU, almost 17 folds less active than the commercial one. Regarding RML specific activity, styrene methacrylate gave the highest values, 2.5 folds that obtained using octyl agarose. Only octadecyl methacrylate gave values similar to octyl agarose.

TLL only gave significant activity *versus* this substrate using octyl agarose TLL.

3.6.3. Hydrolysis of methyl mandelate. Table 6 shows the results with the last substrate, methyl mandelate. This is the complex one, a chiral molecule, and we have also included the activities ratios with both isomers. We supply the results used the *S* isomer, and the activity with *S*/activity with *R* ratio.

DVB methacrylate (7 U g^{-1}) and styrene (5.3 U g^{-1}) CALA biocatalysts were the most active ones, octyl agarose CALA was the least active biocatalysts, 6 folds less active. Octadecyl

Table 6 Activity of different lipase biocatalyst versus *R*- or *S*-methyl mandelate (50 mM) at pH 7 and 25 °C. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) is given in μmoles of substrate hydrolyzed per mg of immobilized enzyme and also per g of biocatalyst

Lipase	Enzymatic derivative	<i>V</i> (U mg ⁻¹ enzyme)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	<i>V_S</i> / <i>V_R</i>
CALA	Octyl agarose	0.13 ± 0.004	1.15 ± 0.05	1.51
	Styrene	1.09 ± 0.053	5.28 ± 0.16	2.08
	Styrene methacrylate	5.33 ± 0.232	2.56 ± 0.12	1.20
	Octadecyl methacrylate	0.35 ± 0.015	3.61 ± 0.16	1.30
	DVB methacrylate	0.67 ± 0.032	6.98 ± 0.34	1.00
	Octadecyl methacrylate	0.39 ± 0.016	1.98 ± 0.06	1.61
CALB	Octyl agarose	10.3 ± 0.26	80.33 ± 2.00	0.17
	Styrene	5.93 ± 0.28	66.68 ± 2.26	0.43
	Styrene methacrylate	7.24 ± 0.34	31.77 ± 1.38	0.33
	Octadecyl methacrylate	7.10 ± 0.32	91.76 ± 3.27	0.35
	DVB methacrylate	9.90 ± 0.39	99.38 ± 4.95	0.50
	Octadecyl methacrylate	6.96 ± 0.33	64.56 ± 2.23	0.30
LU	Novozym® 435	1.44 ± 0.05	118.3 ± 5.81	0.63
	Octyl agarose	0.28 ± 0.013	1.14 ± 0.05	5.18
	Styrene	0.25 ± 0.012	6.16 ± 0.28	5.76
	Styrene methacrylate	0.40 ± 0.016	2.99 ± 0.11	2.99
	Octadecyl methacrylate	0.14 ± 0.005	2.88 ± 0.13	1.87
	DVB methacrylate	0.20 ± 0.008	3.46 ± 0.16	2.07
RML	Octadecyl methacrylate	0.20 ± 0.006	2.67 ± 0.12	5.24
	Octyl agarose	0.16 ± 0.004	1.20 ± 0.04	3.87
	Styrene	0.26 ± 0.011	7.90 ± 0.32	10.82
	Styrene methacrylate	0.19 ± 0.006	4.61 ± 0.22	13.97
	Octadecyl methacrylate	0.12 ± 0.003	5.51 ± 0.23	1.94
	DVB methacrylate	0.39 ± 0.015	6.07 ± 0.23	3.25
TLL	Octadecyl methacrylate	0.19 ± 0.003	3.71 ± 0.17	2.23
	Lipozyme® RM IM	0.04 ± 0.002	2.07 ± 0.09	3.00
	Octyl agarose	0.28 ± 0.012	1.26 ± 0.06	5.25
	Styrene	0.15 ± 0.003	1.90 ± 0.08	1.09
	Styrene methacrylate	0.83 ± 0.022	4.51 ± 0.13	1.80
	Octadecyl methacrylate	0.16 ± 0.008	2.55 ± 0.11	4.11
	DVB methacrylate	0.13 ± 0.002	1.61 ± 0.07	2.06
	Octadecyl methacrylate	0.24 ± 0.009	2.35 ± 0.08	1.48
	Lipozyme® TL	0.01 ± 0.001	1.24 ± 0.05	4.59

methacrylate CALA has 1.8 fold more activity than this one (in opposition with the results obtained using triacetin). CALA specific activity was the highest using styrene methacrylate, 5 folds more than using styrene; octyl agarose have the lowest specific activity. Most enzyme preparations preferred the hydrolysis of the *S* isomer, but the activity ratio with the *R* isomer was very small (a maximum of 2 using styrene) and for DVB methacrylate was identical.

Novozyme 435 was the most active CALB biocatalyst (120 U g⁻¹), followed by DVD methacrylate CALB (100 U g⁻¹) and for octadecyl methacrylate CALB (92 U g⁻¹). The least active preparation was styrene methacrylate (32 U g⁻¹). CALB highest specific activity was obtained using octyl agarose and DVD methacrylate, the lowest one was obtained using styrene (around 70% of the maximum). This enzyme preferred the *R* isomer, and octyl agarose CALB gave the best ratio (around 6) while Novozyme 435 gave the lowest one (less than 1.6).

Styrene LU was the most active preparation of LU with this substrate, almost doubling the second (DVB methacrylate), being octyl agarose LU the least active one (more than 5 times less active than the most active one). Styrene methacrylate produced the highest specific activity for this enzyme and substrate pair, while octadecyl methacrylate produced the

lowest (almost 3 folds lower). All preparations prefer the isomer *S*, with activities ratios ranging from more than 5 (using octyl agarose LU, styrene LU or octadecyl methacrylate LU) to around 2 (octadecyl methacrylate LU and DVB methacrylate LU).

IM RML was 40% more active than octyl agarose RML (the least active one), but almost 4 times less active than styrene RML, the most active one. DVB methacrylate RML was the second most active (75% of the activity of styrene RML), shortly followed by octadecyl methacrylate. RML specific activity was the highest using DVD methacrylate and the lowest using octadecyl methacrylate. Regarding the activity of both isomers ratio, the enzyme preferred the *S* isomer and values ranged from 14 using styrene RML to less than 2 using octadecyl methacrylate.

Using TLL biocatalyst, the highest activity was observed using styrene methacrylate TLL, almost doubling the activity of the second (octadecyl methacrylate TLL), while the least active ones were the commercial IM TLL and octyl agarose TLL (around 3.5 folds). The highest specific activity was observed using styrene methacrylate and almost 3 folds that of the second one (octyl agarose). All preparations preferred the *S* isomers, with activity ratios using both isomers ranging from around 5 (octyl agarose TLL) to 1.1 (using styrene TLL).

3.6.4. Discussion. The results above are a new and clear example on how changing the support the enzyme stability, activity and specificity may be strongly modulated even using similar immobilization protocol. This is directly visualized using *R* and *S* mandelic acids, but the comparison between all substrates show the strong alterations on enzyme activity and specificity. Moreover it is not possible to point an “optimal” supports for lipase immobilization that depends on the enzyme and the substrate. In some cases, a support and lipase pair is among the most active ones with some of the substrates, while is poorly active with other. It should be remarked the lack of significant activity using the new preparations and *p*NPB (we have discarded substrate adsorption by adding the support to the reaction mixture and after some time free enzyme, where we cannot visualize any alteration of the enzyme activity at short times). Thus, using only the conventional *p*NPB assay, these supports could be discarded, when with other substrate produced catalyst with activities far better than the commercial ones or octyl agarose.

3.7. Reuse of the biocatalyst

All the CALB biocatalysts could be reused in hydrolysis of 100 mM triacetin for 3 cycles without a significant decrease of activity during use or washing, even although 20% acetonitrile was present in the medium. This, the new supports showed excellent properties for their industrial implementation.

3.8. Reuse of the support

Another important question is the real possibility of reusing the supports. The reversibility of the immobilization protocol permits this. Thus, we washed the enzyme preparations 3 folds with 5 volumes 2% triton X-100 at 25 °C. Although most enzyme molecules were released, we could appreciate in some cases (even using the octyl support) that a small percentage of the protein remained immobilized (less than 5%) by SDS-PAGE. By increasing the washing *T* at 37 °C, we have been able to fully release all the enzyme molecules from the support, even using preparations submitted to previous thermal or solvent inactivation (this may affect the adsorption strength of inactivated enzymes to the support).⁸⁵ The fact that Triton X-100 is able to release most of the enzyme molecules confirm that the main force of the immobilization is a hydrophobic adsorption.

The washed supports presented identical maximum loading capacity and the immobilized enzyme identical stability that the initial preparations.

4. Conclusion

The new supports studied in these paper present very good properties to prepare immobilized lipases. However, there is not a universal optimal support; the “best” support depends on the enzyme, the parameter studied and the substrate used. That means even although all the supports immobilize the lipases *via* interfacial activation *versus* the hydrophobic surface of the support, the final properties of the biocatalyst will depend on the support features. For this reason, a large library of methods

and supports to immobilized lipases become the only way to ensure the full utilization of the potential of immobilization to improve enzyme properties. The reversible mechanism of immobilization permits to re-use the supports after enzyme inactivation. However, it should be considered, as already described in other publications, that this may reduce the range of applicability: high cosolvent concentrations,^{86,87} and even some substrates or products⁸⁸ may produce the release of the enzyme. Simple strategies to solve this problem has been already proposed, enlarging the range of application of this kind of immobilized enzymes.⁸⁹

Nevertheless, under the conditions utilized in this paper, the preparations showed a very good performance in a diversity of reactions and permitted their reuse for several cycles. These supports will enlarge the library of immobilized lipase biocatalyst and that way, they will enhance the prospects of finding suitable biocatalyst for a specific process.³⁴

Acknowledgements

We gratefully recognize the support from the MINECO from Spanish Government, (project numbers CTQ2013-41507-R and CTQ2016-78587-R). The predoctoral fellowships for Miss Peirce (Universita' degli Studi di Napoli Federico II) and Miss Tacias-Pascacio (CONACyT, Mexico) are also gratefully recognized. Dr Virgen-Ortiz thanks CONACyT Mexico for his Postdoctoral fellowship (No. 263815). The authors wish to thank Mr Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) for kindly supplying some of the enzymes used in this research and Purolite for the kind donation of the supports. The advice and support of Drs A. Basso and S. Serban (Purolite) are also gratefully recognized.

Notes and references

- 1 G. Angajala, P. Pavan and R. Subashini, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2016, **7**, 257–270.
- 2 C. A. Carvalho, D. T. Fonseca, C. M. Mattos, D. M. Oliveira, L. T. Lemos, F. Molinari, D. Romano and I. Serra, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**.
- 3 A. S. de Miranda, L. S. M. Miranda and R. O. M. A. de Souza, *Biotechnol. Adv.*, 2015, **33**, 372–393.
- 4 K.-E. Jaeger and T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 390–397.
- 5 R. Sharma, Y. Chisti and U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.*, 2001, **19**, 627–662.
- 6 K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra and M. T. Reetz, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 315–351.
- 7 K.-E. Jaeger and M. T. Reetz, *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**, 396–403.
- 8 C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcrand and P. Villeneuve, *Green Chem.*, 2014, **16**, 1740–1754.
- 9 R. Bhavya, B. Ujjwal, M. Sandhya and M. Rajesh, *Curr. Chem. Biol.*, 2013, **7**, 114–120.
- 10 D. Sharma, B. Sharma and A. K. Shukla, *Biotechnology*, 2011, **10**, 23–40.
- 11 K. Hult and P. Berglund, *Trends Biotechnol.*, 2007, **25**, 231–238.

- 12 M. Kapoor and M. N. Gupta, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 555–569.
- 13 E. Busto, V. Gotor-Fernandez and V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4504–4523.
- 14 A. Salihu and M. Z. Alam, *Process Biochem.*, 2015, **50**, 86–96.
- 15 S. Sharma and S. S. Kanwar, *Sci. World J.*, 2014, 2014.
- 16 A. Ghanem and H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 3331–3351.
- 17 E. Durand, J. Lecomte and P. Villeneuve, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, **115**, 379–385.
- 18 T. De Diego, P. Lozano, M. A. Abad, K. Steffensky, M. Vaultier and J. L. Iborra, *J. Biotechnol.*, 2009, **140**, 234–241.
- 19 P. Lozano, *Green Chem.*, 2010, **12**, 555–569.
- 20 P. Lozano, J. M. Bernal and M. Vaultier, *Fuel*, 2011, **90**, 3461–3467.
- 21 P. Lozano, J. M. Bernal and A. Navarro, *Green Chem.*, 2012, **14**, 3026–3033.
- 22 P. Lozano, J. M. Bernal, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez and M. Vaultier, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 1328–1338.
- 23 A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar and L. Thim, *Nature*, 1991, **351**, 491–494.
- 24 H. van Tilbeurgh, M. P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger and C. Cambillau, *Nature*, 1993, **362**, 814–820.
- 25 R. Verger, *Trends Biotechnol.*, 1997, **15**, 32–38.
- 26 P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin and M. Cygler, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 12843–12847.
- 27 M. Martinelle, M. Holmquist and K. Hult, *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, 1995, **1258**, 272–276.
- 28 A. M. Brzozowski, H. Savage, C. S. Verma, J. P. Turkenburg, D. M. Lawson, A. Svendsen and S. Patkar, *Biochemistry*, 2000, **39**, 15071–15082.
- 29 O. G. Berg, Y. Cajal, G. L. Butterfoss, R. L. Grey, M. A. Alsina, B. Z. Yu and M. K. Jain, *Biochemistry*, 1998, **37**, 6615–6627.
- 30 J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar and T. A. Jones, *Structure*, 1994, **2**, 293–308.
- 31 C. Carrasco-Lopez, C. Godoy, B. de Las Rivas, G. Fernandez-Lorente, J. M. Palomo, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, M. Martinez-Ripoll and J. A. Hermoso, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 4365–4372.
- 32 C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **40**, 1451–1463.
- 33 C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente and R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2885–2904.
- 34 R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6290–6307.
- 35 J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 775–783.
- 36 J. M. Palomo, G. Muñoz, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, M. Fuentes, J. M. Guisan and R. Fernández-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2003, **21**, 201–210.
- 37 O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 1220–1227.
- 38 O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **71**, 124–132.
- 39 O. Barbosa, M. Ruiz, C. Ortiz, M. Fernández, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 867–876.
- 40 (a) J. M. Palomo, M. Fuentes, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, J. M. Guisan and R. Fernández-Lafuente, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 1–6; (b) J. M. Palomo, C. Ortiz, M. Fuentes, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1038**, 267–273.
- 41 J. M. Palomo, C. Ortiz, G. Fernández-Lorente, M. Fuentes, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **36**, 447–454.
- 42 J. M. Palomo, M. M. Peñas, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, A. G. Pisabarro, R. Fernández-Lafuente, L. Ramírez and J. M. Guisán, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 204–210.
- 43 E. A. Manoel, J. C. S. dos Santos, D. M. G. Freire, N. Rueda and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **71**, 53–57.
- 44 A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Huguet and J. M. Guisán, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **58**, 486–493.
- 45 (a) Z. Y. Zhao, J. Liu, M. Hahn, S. Qiao, A. P. J. Middelberg and L. He, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 22008–22013; (b) T. Liu, L. Qu, K. Qian, J. Liu, Q. Zhang, L. Liu and S. Liu, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 1709–1712; (c) L. Zhang, K. Q. Xupeng Wang, F. Zhang, X. Shi, Y. Jiang, S. Liu, M. Jaroniec and J. Liu, *Adv. Sci.*, 2016, 1500363; (d) K. Yasutaka, Y. Takato, K. Takashi, M. Kohsuke and Y. Hiromi, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 10335–10345; (e) T. Liu, L. Qu, K. Qian, J. Liu, Q. Zhang, L. Liu and S. Liu, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 1709–1712; (f) Y. Kuwahara, T. Yamanishi, T. Kamegawa, K. Mori and H. Yamashita, *ChemCatChem*, 2013, **5**, 2527–2536; (g) Y. Kuwahara, T. Yamanishi, T. Kamegawa, K. Mori, M. Che and H. Yamashita, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 2882–2884; (h) E. A. Manoel, M. Pinto, J. C. S. Dos Santos, V. G. Tacias-Pascacio, D. M. G. Freire, J. C. Pinto and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 62814–62824; (i) Z. Zhao, J. Tian, Z. Wu, J. Liu, D. Zhao, W. Shen and L. He, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4719–4722.
- 46 G. Fernandez-Lorente, Z. Cabrera, C. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo and J. M. Guisan, *Process Biochem.*, 2008, **43**, 1061–1067.
- 47 Z. Cabrera, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo and J. M. Guisan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **57**, 171–176.
- 48 K. Hernandez, C. Garcia-Galan and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, **49**, 72–78.
- 49 C. Garcia-Galan, O. Barbosa, K. Hernandez, J. Santos, R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *Molecules*, 2014, **19**, 7629–7645.
- 50 P. Sabuquillo, J. Reina, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1998, **1388**, 337–348.

- 51 G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, R. L. Segura, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán and J. M. Palomo, *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **92**, 773–779.
- 52 R. L. Segura, L. Betancor, J. M. Palomo, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, M. Terreni, C. Mateo, A. Cortés, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, **39**, 817–823.
- 53 G. Volpato, M. Filice, B. De las Rivas, R. C. Rodrigues, J. X. Heck, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, C. Mateo and M. A. Z. Ayub, *Biotechnol. Prog.*, 2011, **27**, 717–723.
- 54 R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero and G. Díaz-González, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2004, **30**, 83–93.
- 55 B. Al-Duri and Y. P. Yong, *Biochem. Eng. J.*, 2000, **4**, 207–215.
- 56 A. Galarneau, M. Muresanu, S. Atger, G. Renard and F. Fajula, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 562–571.
- 57 R. M. Blanco, P. Terreros, N. Muñoz and E. Serra, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2007, **47**, 13–20.
- 58 M. H. Sörensen, J. B. S. Ng, L. Bergström and P. C. A. Alberius, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **343**, 359–365.
- 59 K. Kawakami, Y. Oda and R. Takahashi, *Biotechnol. Biofuels*, 2011, **4**, 1.
- 60 (a) J. C. S. Dos Santos, N. Rueda, A. Sanchez, R. Villalonga, L. R. B. Gonçalves and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 35801–35810; (b) J. C. S. Dos Santos, N. Rueda, R. Torres, O. Barbosa, L. R. B. Gonçalves and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2015, **50**, 918–927.
- 61 (a) A. Basso, M. Hesseler and S. Serban, *Tetrahedron*, 2016, DOI: 10.1016/j.tet.2016.02.021; (b) A. Basso, L. Froment, M. Hesseler and S. Serban, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, **115**, 468–472.
- 62 E. M. Anderson, K. M. Larsson and O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.*, 1998, **16**, 181–204.
- 63 V. Gotor-Fernández, E. Busto and V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 797–812.
- 64 P. D. de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman and R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2005, **37**, 36–46.
- 65 R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 197–212.
- 66 R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 1–22.
- 67 R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **66**, 15–32.
- 68 L. De Maria, J. Vind, K. M. Oxenbøll, A. Svendsen and S. Patkar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **74**, 290–300.
- 69 K. Clausen, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001, **103**, 333–340.
- 70 J. C. S. dos Santos, C. Garcia-Galan, R. C. Rodrigues, H. B. de Sant'Ana, L. R. B. Goncalves and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2014, **49**, 1511–1515.
- 71 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
- 72 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.
- 73 E. W. Washburn, *Phys. Rev.*, 1921, **17**, 273–283.
- 74 K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol and T. Siemieniewska, *Pure Appl. Chem.*, 1985, **57**, 603–619.
- 75 A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. J. Dodson, G. G. Dodson and J. P. Turkenburg, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, 1992, **48**, 307–319.
- 76 S. K. Dalvie and R. E. Baltus, *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, **40**, 1173–1180.
- 77 J. L. Van Roon, M. Joerink, M. P. W. M. Rijkers, J. Tramper, P. H. Schroën, G. Catharina and H. H. Beeftink, *Biotechnol. Prog.*, 2003, **19**, 1510–1518.
- 78 J. M. Bolivar, A. Hidalgo, L. Sánchez-Ruiloba, J. Berenguer, J. M. Guisán and F. López-Gallego, *J. Biotechnol.*, 2011, **155**, 412–420.
- 79 J. Rocha-Martín, B. d. l. Rivas, R. Muñoz, J. M. Guisán and F. López-Gallego, *ChemCatChem*, 2012, **4**, 1279–1288.
- 80 A. Borchert and K. Buchholz, *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, **26**, 727–736.
- 81 A. Sanchez, J. Cruz, N. Rueda, J. C. S. dos Santos, R. Torres, C. Ortiz, R. Villalonga and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 27329–27334.
- 82 J. C. S. d. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 2413–2432.
- 83 N. Rueda, J. C. S. Dos Santos, R. Torres, C. Ortiz, O. Barbosa and R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 11212–11222.
- 84 K. Hernandez, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, **48**, 510–517.
- 85 J. J. Virgen-Ortiz, S. Peirce, V. G. Tacias-Pascacio, V. Cortes-Corberan, A. Marzocchella, M. E. Russo and R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 2016, **51**, 1391–1396.
- 86 D. B. Hirata, T. L. Albuquerque, N. Rueda, J. J. Virgen-Ortiz, V. G. Tacias-Pascacio and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2016, **133**, 117–123.
- 87 D. B. Hirata, T. L. Albuquerque, N. Rueda, J. M. Sánchez-Montero, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar and R. Fernandez-Lafuente, *ChemistrySelect*, 2016, **1**, 3259–3270.
- 88 J. J. Virgen-Ortiz, V. G. Tacias-Pascacio, D. B. Hirata, B. Torrestiana-Sanchez, A. Rosales-Quintero and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2017, **96**, 30–35.
- 89 S. Peirce, G. V. Tacias-Pascacio, E. M. Russo, A. Marzocchella, J. J. Virgen-Ortiz and R. Fernandez-Lafuente, *Molecules*, 2016, **21**, 751.

Publicación 3: Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports.

Enzyme and Microbial Technology (2017). 96: 30–35

Revista: Enzyme and Microbial Technology

ISSN: 0141-0229

Editorial: Elsevier

País: Países Bajos

Factor de impacto en 2017: 2.5



Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports

Jose J. Virgen-Ortíz^{a,b,1}, Veymar G. Tacias-Pascacio^{a,c,1}, Daniela B. Hirata^d,
Beatriz Torrestiana-Sanchez^c, Arnulfo Rosales-Quintero^e, Roberto Fernandez-Lafuente^{a,*}

^a Departamento de Biotransformación, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC, Madrid, Spain

^b Catedrático CONACYT – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán, A.C., Antigua Carretera a Pátzcuaro s/n, 58341, Morelia, Michoacán, Mexico

^c Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel A. de Quevedo 2779, 91897, Veracruz, Mexico

^d Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

^e Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Carretera Panamericana Km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2016

Received in revised form 7 September 2016

Accepted 19 September 2016

Available online 20 September 2016

Keywords:

Lipase interfacial activation

Octyl agarose

Detergents

Enzyme leakage

Enzyme reuse

ABSTRACT

Lipase B from *Candida antarctica* (CALB) has been physically immobilized on octyl-agarose via interfacial activation. The incubation of the enzyme in 80% ethanol at pH 5 and 25 °C has not significant effect on enzyme activity. Moreover, the hydrolysis of 100 mM tributyrin catalyzed by this biocatalyst exhibited a quite linear reaction course. However, a new cycle of tributyrin hydrolysis showed a drastic drop in the activity. SDS-PAGE gels of the supernatant and the biocatalyst showed a significant enzyme desorption after the reaction. Similar results could be appreciated using triacetin or sunflower oil, while using 300 mM methyl phenyl acetate, butyl butyrate or ethyl butyrate most enzyme molecules remained immobilized. The results show that the detergent properties of some reaction products increase the enzyme release from the hydrophobic support, and this problem increased if the concentration of the reactants increased. Using 500 mM tributyrin, even in fully aqueous medium, some enzyme desorption from the support may be observed. Thus, the results show a limitation of this kind of biocatalysts that should be considered in the selection of an industrial lipase biocatalyst.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Immobilization of lipases on hydrophobic supports is a very popular immobilization technique for these enzymes due to the inherent advantages: it is very simple and permits the one step purification, immobilization, stabilization and hyperactivation of most lipases [1–5]. Moreover, the lipase immobilization on these supports is reversible, enabling the reuse of the support when the enzyme is inactivated [1–5]. The lipase immobilization on hydrophobic supports is based on the interfacial activation of the lipases versus the hydrophobic surface of the support [6]. Lipase interfacial activation is the mechanism that permits lipases to act

in interfaces and involves the movement of a polypeptide chain called flap or lid that in many instances isolated the active center of lipases from the reaction media, to produce the stabilized open form of the lipase, with the active center exposed to the medium [7–12].

Therefore, the protocol seems almost ideal for lipase immobilization. However, it has a main drawback; the enzyme is desorbed when exposed at high temperatures, or in the presence of detergents or organic solvents [13]. In fact, detergents are the usual way to desorb the enzyme from hydrophobic supports [2,13]. This has produced a great interest in the development of protocols that can combine the good properties of immobilization via interfacial activation and reduce enzyme desorption. Among them, initially the covalent crosslinking of the immobilized enzyme molecules using aldehyde dextran gave good results, but it fully avoided the reversibility of the immobilization [14]. Physical crosslinking with ionic polymers has been also proposed, and this protocol maintained the reversibility of the immobilization [15]. Other solution for the lipase desorption has been the design of heterofunc-

* Corresponding author at: ICP-CSIC, C/Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

E-mail addresses: rf1@icp.csic.es, rfernandezlafuente@hotmail.com (R. Fernandez-Lafuente).

¹ Both authors have evenly contributed to this paper.

tional supports that reduced this undesired enzyme desorption. To produce a covalent attachment after the immobilization, usually coupled to an improved stability, heterofunctional supports simultaneously bearing acyl-glyoxyl, acyl-epoxyde, acyl-vinylsulfone or acyl-glutaraldehyde have been recently proposed [13,16–24]. However, again we lost enzyme immobilization reversibility and after enzyme inactivation both enzyme and support should be discarded. The use of ionic groups combined with the acyl chains maintains the reversibility and also reduces lipase desorption in certain cases, however the results are not so clear in the stability effects [25,26].

The desorption of the lipase is frequently considered to be mainly caused by the reaction media (e.g., high concentration of organic cosolvents), forgetting that many substrates/products of reactions involving lipases may behave like a good (or at least moderate) detergent, and sometimes they may be at very high concentrations. For example, in the hydrolysis of oils, the long fatty acids are typical anionic detergents, di and monoglycerides have also surfactant properties [27,28]. Thus, in some instances the desorption problems found when using lipases physically immobilized on hydrophobic supports may be related to the presence of these reaction products and not only with the conditions of the reaction media.

To this study this, we have immobilized CALB, one of the most used enzyme in biocatalysis [29,30], and having a small lid [31], on octyl agarose. This is a support frequently utilized in the immobilization of this enzyme and that has been used in many reactions involving very different kind of substrates [2,4,6]. The immobilized enzyme has been incubated in high ethanol concentration, and also in this medium plus different substrates like methyl phenylacetate (producing phenylacetic acid), butyl butyrate or ethyl butyrate (producing butyric acid), triacetin (producing 1,2-diacetin and finally 2- monoacetin) [32] tributyrin (producing 1,2-dibutyryl and 2-monobutyryl) [33] and sunflower oil (producing fatty acids and 2-monoglycerides). To ensure that the reaction using triglycerides stop in 2-monoglycerides, the reaction was performed at pH 5, to avoid acyl migration [32,33]. Ethanol enables the production of ethyl esters of the corresponding acids [34]. Our objective is to check the effect or the lack of effect of some substrates/products in lipase release from hydrophobic supports.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Solution of CALB (6.9 mg of protein/mL) was a kind gift from Novozymes (Spain). Methyl phenylacetate, butyl butyrate, ethyl butyrate, triacetin, tributyrin and *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Octyl-agarose CL–4 B beads were from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Standard determination of enzyme activity

This assay was performed by measuring the increase in absorbance at 348 nm produced by the release of *p*-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM *p*-NPB in 25 mM sodium phosphate at pH 7.0 and 25 °C (ϵ under these conditions is $5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaction was started by adding 50–200 μL of lipase solution or suspension to 2.55 mL of substrate solution. Spontaneous hydrolysis of *p*-NPB was monitored under identical conditions without enzyme. One international unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μmol of *p*-NPB per min. under the condi-

tions described previously. Protein concentration was determined by Bradford's dye binding method [35] recording the absorbance at 595 nm using bovine serum albumin as the reference.

2.3. Immobilization of CALB on octyl-agarose beads

The commercial preparation of the CALB was diluted to 0.2 mg/mL in the corresponding volume of 5 mM sodium phosphate at pH 7 (samples were prepared containing 1 mg CALB/g octyl-agarose and 5 mg/g). Then, the octyl-agarose beads were added under continuous agitation at 200 rpm. Activities of supernatant and suspension were followed using *p*NPB. After enzyme immobilization, the suspension was filtered and the supported lipase was washed several times with distilled water.

2.4. Inactivation of octyl-CALB biocatalyst in the presence of ethanol

Octyl-CALB biocatalyst was incubated in a mixture of 80% ethanol/20% 500 mM sodium acetate buffer (v/v) at pH 5 and 25 °C. Periodically, samples were withdrawn and the activity was measured using *p*-NPB. In some instances, different compounds were added.

2.5. Hydrolysis of tributyrin in the presence of ethanol

1 g of immobilized CALB was added to 10 mL of substrate with 100 mM of tributyrin. The substrate was prepared by adding the desired molar concentration of tributyrin in a certain volume of 80% ethanol/500 mM sodium acetate buffer (pH 5) in order to complete a final volume of 10 mL. The pH was not controlled, as the addition of any basic titrating reagent may favor acyl migration in dibutyryl and monobutyryl [32,33]. The hydrolysis reactions were performed under continuous stirring at 25 °C and samples were periodically withdrawn. The concentration of the reactions products were analyzed at 208 nm by RP-HPLC (Jasco PU-2085 coupled with a UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector) using a Kromasil C18 (15 cm \times 0.46 cm) column. The HPLC was operated at 25 °C and at a flow rate of 1.0 mL/min, and standard solutions were used for calculation the tributyrin and the esters concentrations. The mobile phase was composed by a mixture of 45% acetonitrile and 55% of 10 mM ammonium acetate buffer, and adjusted at pH 3 using concentrated HCl.

2.6. Reuses of octyl-CALB biocatalyst in the hydrolysis of tributyrin

Operational stability of octyl-CALB was studied in the hydrolysis of tributyrin in a medium with 100 mM tributyrin in 80% of ethanol and 500 mM of sodium acetate buffer (pH 5) at 25 °C in a batch system. At the end of each reaction batch, the immobilized enzyme was removed from the reaction medium and washed several times with distilled water and finally it was also washed with the reaction medium without tributyrin, in order to keep the relation of the solvent in the medium. After this, the biocatalyst was filtered under vacuum and immediately introduced into a fresh reaction medium. The reaction was followed as previously described.

2.7. SDS-PAGE of octyl-CALB incubated in ethanol and in the presence of different substrates and products

For the assessment of desorption of lipase toward different substrates or products, octyl-CALB biocatalyst was incubated for 100 h at 25 °C in: 300 mM methyl phenylacetate, butyl butyrate or ethyl butyrate, 100 mM triacetin, tributyrin and sunflower oil. In all cases, substrates were prepared in 80% (v/v) ethanol/500 mM sodium

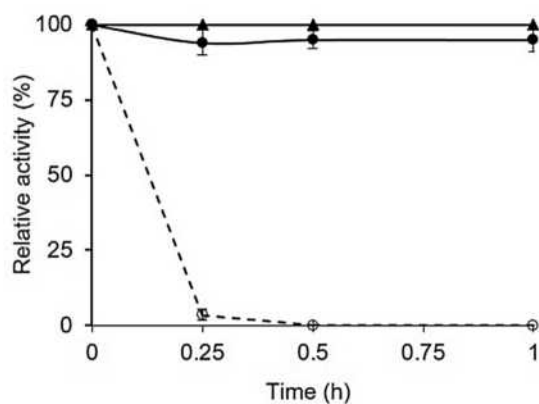


Fig. 1. Immobilization course of CALB at pH 7 on octyl agarose at low ionic strength. Close circles, solid line: suspension; Open circles, dashed line: supernatant; triangles, solid line: reference.

acetate buffer (pH 5). After the incubation, samples were taken from the supernatant, and the biocatalyst was filtered and washed thoroughly with distilled water. Biocatalysts and supernatants were analyzed by SDS-PAGE. In the case of tributyrin, concentrations of substrate were increased to 250 and 500 mM, and concentration of sodium acetate to 1 M. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a 5% polyacrylamide stacking gel and a 14% polyacrylamide resolving gel according to Laemmli [36] using a Miniprotean tetra-cell (Bio-Rad). One hundred milligrams of the immobilized enzyme samples was re-suspended in 1 mL of rupture buffer (2% SDS and 10% 2-mercaptoethanol), boiled for 8 min and a 10 μ L aliquot of the supernatant was used in the experiments. This treatment released all enzyme just interfacially activated on the support [2]. For SDS-PAGE analysis of free enzyme in 80% ethanol, the sample buffer consisted of 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 30% glycerol, and 10% 2-mercaptoethanol. 50 μ L of centrifuged reaction media was mixed with 50 μ L of sample buffer, boiled and a 10 μ L aliquot was loaded onto gel. Gels were stained with colloidal Coomassie blue. A low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare) was used as a molecular weight marker (14.4–97 kDa).

3. Results and discussion

3.1. Immobilization of CALB on octyl agarose beads

Fig. 1 shows the immobilization course of CALB on octyl agarose beads. The enzyme is readily immobilized (30 min) and the activity remained almost unaltered. The small lid of CALB [41] permits its immobilization by interfacial activation, but it did not fully isolate the CALB active center, that way the immobilization on octyl agarose did not produce an evident hyper activation of the enzyme as reported with other lipases [2,4,6]. This agrees with previous reports using this enzyme [13].

3.2. Stability of octyl-CALB in the presence of ethanol

Fig. 2 shows the stability of octyl-CALB at 25 °C in 80% (v/v) ethanol at pH 5 and 25 °C. The activity remained almost unaltered after 24 h of incubation. The very high stability of this preparation in organic solvents had been previously reported, a combination of temperature over 40 °C and solvent was necessary to produce the octyl-CALB inactivation [13]. Free lipase readily precipitated when it was incubated under these conditions, losing rapidly its activity.

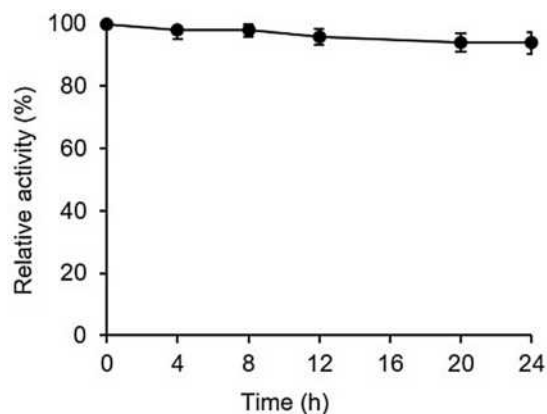


Fig. 2. Octyl-CALB inactivation in 80% ethanol/500 mM sodium acetate at pH 5 and 25 °C. Other specifications are in Materials and methods section.

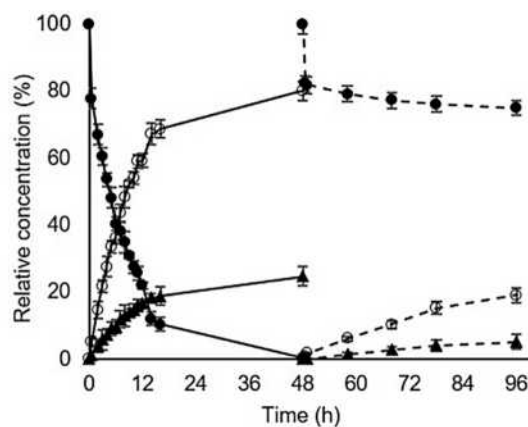


Fig. 3. Reaction courses of two cycles of hydrolysis of tributyrin. Reaction conditions were 100 mM tributyrin in 80% ethanol utilizing OC-CALB as biocatalyst. The reactions were performed using 1 g of biocatalysts in 10 mL of reaction medium at pH 5 and 20 °C. Solid lines correspond to first cycle of hydrolysis of tributyrin while dashed lines represent the second one. Close circles: tributyrin; open circles: 1,2-dibutyrin; triangles: ethyl butyrate.

3.3. Reuses of octyl-CALB biocatalyst in the hydrolysis of tributyrin catalyzed in the presence of ethanol

Fig. 3 shows the hydrolysis of tributyrin in 80% ethanol catalyzed by octyl-CALB. The reaction produced ethyl butyrate, 1,2-dibutyrin and 2-monobutyrin, (not visualized in the figure) [33,34]. Due to the selected conditions, there was not a rapid acyl migration and 2-monobutyrin remains in the reaction mixture as reaction product [32,33]. The first cycle of hydrolysis of tributyrin proceeds quite rapidly, however, when the biocatalyst is washed and a second reaction cycle was intended, the activity dropped to less than 20% (Fig. 3). This result was in contradiction with the very high stability found in the inactivation experiment (Section 3.2), and also with the shape of the first reaction course, where there was not an apparent inactivation of the enzyme.

The likeliest explanation for this phenomena is the desorption of the enzyme from the support caused by the combined effect of ethanol and the reaction products. Thus, we have analyzed this possibility.

3.4. Analysis of octyl-CALB incubated in 80% ethanol and in the presence of different substrates and products

Octyl-CALB preparations were left in the reaction media for 100 h in the hydrolysis of 100 mM of triacetin, tributyrin and

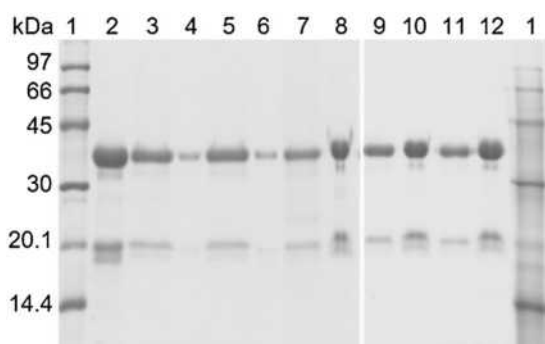


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of octyl-CALB biocatalyst after 100 h of incubation in 80% ethanol at pH 5 under different conditions. Gel shows the enzyme that remains bound to the support after the incubation and the enzyme released to reaction medium. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: octyl-CALB biocatalyst. Lanes 3 and 4: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated in 80% ethanol. Lanes 5 and 6: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 300 mM methyl phenylacetate. Lanes 7 and 8: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 100 mM triacetin. Lanes 9 and 10: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 100 mM tributyrin. Lanes 11 and 12: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 100 mM sunflower oil.

sunflower oil and 300 mM methyl phenylacetate, butyl butyrate or ethyl butyrate and compared to the initial preparation. The preparations incubated in methyl phenylacetate, butyl butyrate or ethyl butyrate showed not significant activity versus *p*-NPB in the supernatant, while the preparations incubated in the three triglycerides solutions showed significant activity in the supernatant (in *p*-NPB activity determinations), suggesting that more than 30% of the activity had been desorbed from the support. However, the detected activity may be conditioned by the inhibition caused by the components of the reaction medium, or even inactivation of the free enzyme or hyperactivation of the enzyme by any reason. Therefore, to ensure the level of desorption of the enzyme from the support, we compared the SDS-PAGE of the supernatants and octyl-CALB obtained after the different incubations (Fig. 4).

Results show that in 80% ethanol less than 10% of the immobilized enzyme was released to the medium, and most enzyme molecules remained immobilized after 100 h: the supernatant showed a moderate protein band and the support showed the CALB band with intensity slightly lower than that of the initial support. This may be even related to the effect of acetic acid, as a similar experiment in 10 mM sodium phosphate did not release enzyme from the support (not shown result). Similar results were obtained when the immobilized enzyme was incubated in 300 mM phenyl acetate (Fig. 4) and the other monoester molecules (results not shown).

However, using 100 mM of tributyrin, triacetin or sunflower oil, the electroforetical analysis showed a large amount of enzyme in the supernatant and a significant reduction of the amount of enzyme that remained attached to the support. The intensity of the bands showed that the lipase desorption was higher using sunflower oil and lower using triacetin. Therefore, a large proportion of the lipase molecules had been desorbed from the support. This did not occur when using just 80% ethanol or small substrates under these conditions. Consequently, the substrate/products were the real responsible of the massive enzyme desorption, not only the presence of 80% ethanol. The detergent properties of these compounds, even at moderate concentration, were able to desorb CALB molecules from the support. This fact converted these kind of immobilized preparations in unsuitable when using this kind of reactions. This could be expected using oils and producing free fatty acids, but the small size of the acyl chain of triacetin and tributyrin did not point to that possibility.

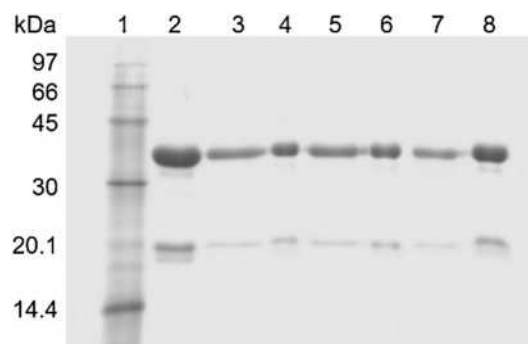


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of octyl-CALB biocatalyst after 100 h of incubation in 80% ethanol at pH 5 and growing concentrations of tributyrin. Gel shows the enzyme that remains bound to the octyl after the incubation and the enzyme released to reaction medium. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: octyl-CALB biocatalyst. Lanes 3 and 4: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated in 100 mM tributyrin. Lanes 5 and 6: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 250 mM tributyrin. Lanes 7 and 8: biocatalyst and reaction medium, respectively, incubated with 500 mM tributyrin.

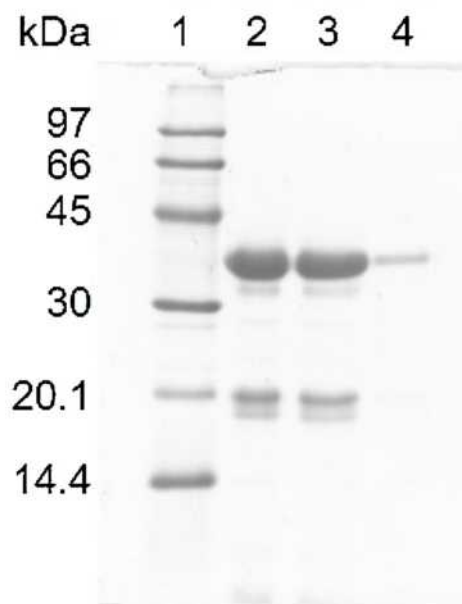


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of octyl-CALB biocatalyst after 100 h of incubation in 500 mM tributyrin in aqueous medium. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: octyl-CALB biocatalyst. Lanes 3 and 4: biocatalyst and aqueous medium after the incubation in tributyrin.

3.5. Effect of the tributyrin concentration on enzyme desorption

Next, we analyzed the importance of the substrate concentration on this CALB desorption effect, using tributyrin in 80% ethanol as model. Thus, the experiment was performed using 100, 250 and 500 mM of tributyrin. The industrial interest of using high concentrations of substrate is evident. In the case of the reaction of hydrolysis of tributyrin to produce 1,2-dibutyryn, improving of the solubility of the substrate is the main reason for using a high concentration of cosolvent [33]. This concentration of ethanol facilitates the substrate solubility and that way the competition between 1,2-dibutyryn (target product that should not be hydrolyzed) and tributyrin is in the desired direction [33]. Fig. 5 shows the SDS-PAGE analysis of the supernatant and octyl-CALB biocatalyst obtained after 100 h of incubation with the respective concentrations of tributyrin. There was a clear relation between concentration of sub-

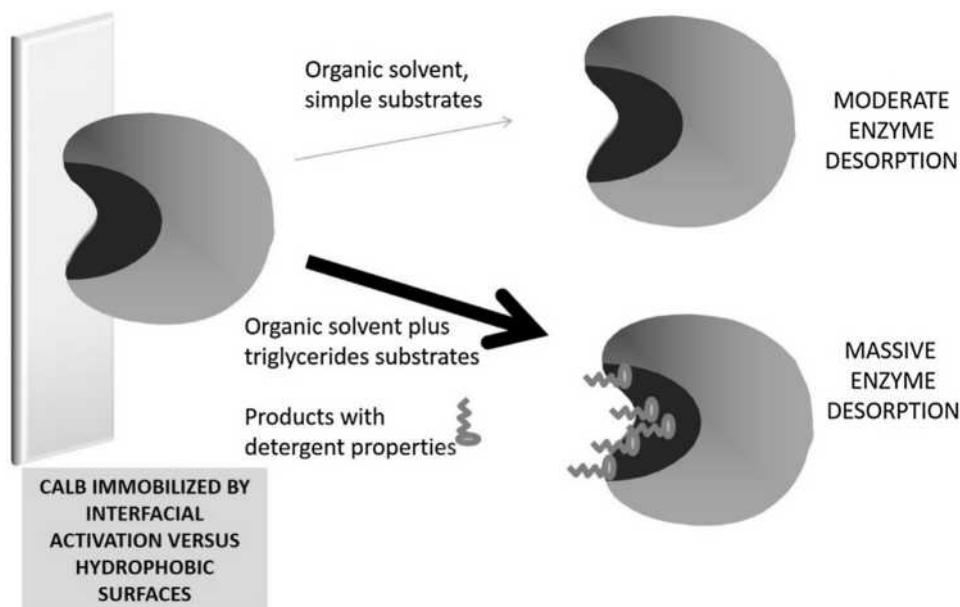


Fig. 7. Effect of detergent-like substrates and products on enzyme desorption from hydrophobic supports.

strate and enzyme desorption, using 500 mM tributyrin almost not enzyme remained attached to the support.

Finally, we have checked if just a high concentration of substrate could be able to force enzyme leakage even in fully aqueous medium. To this goal, a concentration of 500 mM tributyrin was utilized as substrate in fully aqueous medium. Fig. 6 shows that 500 mM of tributyrin is enough to produce some enzyme desorption, in a significant way although with a much smaller intensity than in 80% ethanol. This showed that there is a synergic effect of the cosolvent and the reaction products favoring enzyme leakage from hydrophobic supports. Moreover, some reaction products may be able to desorb lipases from hydrophobic supports, driving to lower operational stabilities than those expected after inactivation experiments under similar conditions but in absence of substrate. This low operational stability should not be related to enzyme inactivation by the substrate or products, but to the enzyme desorption.

4. Conclusions

Octyl agarose is able to retain most CALB molecules immobilized on its surface even in 80% of organic solvents, like ethanol. However, the enzyme is massively released to the medium when certain substrates are involved, in the presence of organic cosolvents, even at moderate concentrations, like 100 mM. The results presented in this paper show that lipase leakage from octyl agarose is strongly helped by the presence of reaction products with detergent properties using triglycerides as substrates (Fig. 7). Even 2- monoacetin, that apparently has a very small hydrophobic tail and should not be a too good detergent, is able to produce this enzyme desorption effect, while simpler molecules like methyl phenyl acetate did not presented this negative effect in a significant way. The increase of the concentration of reaction products intensifies this desorption effect, and using 500 mM tributyrin in fully aqueous medium a significant enzyme leakage could be detected. Heterofunctional supports able to produce irreversible enzyme –support bonds avoided this problem, and may become the only alternative to use the enzymes immobilize via interfacial activation and without risks of enzyme desorption [13,16–24,33,34]. The combination of acyl groups with ionic groups [25,26] may be inefficient to solve this enzyme leakage using high substrate concentration. In the case of oil hydrolysis, the products of the reaction (free fatty

acids) are anionic detergents. And anionic detergents are utilized to release the lipase molecules from ion-acyl heterofunctional supports [25,26], moreover, they behave as a very efficient reagents favoring the desorption of lipases from octyl supports. Using triacetin or tributyrin, the final products are 2 monoglycerides, and they are not ionic [32,33]. However, a large amount of acetic or butyric acid is produced and should decrease the ionic interactions with the ion-acyl heterofunctional supports. Other option to avoid this problem may be the use of much more hydrophobic supports, where lipase became more strongly adsorbed and, therefore, cannot be released so easily. In any case, these data show a new limitation of the use of hydrophobic supports to immobilize lipases that should be considered in the design of industrial biocatalysts for certain uses, and may explain some disagreement between stability in batch conditions and operational stability involving enzyme reuses [33,34]. The importance of this discovery is great considering that Novozym 435, the most used biocatalyst of CALB, is immobilized following this strategy (interfacial activation on hydrophobic supports) but the immobilization is weaker than using octyl agarose [37–40]. These results did not affect to enzyme irreversible immobilized by covalent attachment [41,42] nor trapped inside nanoflowers [43–45].

Author contributions

Jose J. Virgen-Ortiz and Veymar G. Tacias-Pascacio performed the inactivations with different compounds, Daniela B. Hirata performed the studies with tributyrin, Beatriz Torrestiana-Sanchez and Arnulfo Rosales-Quintero supervised the experiments and writing of the paper, Fernandez-Lafuente designed the experiments and write the paper.

Acknowledgments

We gratefully recognize the support from the MINECO from Spanish Government, (project numbers CTQ2013-41507-R and CTQ2016-78587-R). Dr. Hirata thanks CNPq (Process number 232522/2014-6) for a PDE fellowship. The predoctoral fellowship for Miss Tacias-Pascacio (CONACyT, Mexico) is also gratefully recognized. Dr. Virgen-Ortiz thanks CONACyT Mexico for his Postdoctoral fellowship (No. 263815). The authors wish to thank Mr.

Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) for kindly supplying some of the enzymes used in this research.

References

- [1] P. Adlercreutz, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6406–6436.
- [2] A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Huguete, J.M. Guisán, A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnol. Bioeng.* 58 (1998) 486–493.
- [3] R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: characterization of the support and the catalysts, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 30 (2004) 83–93.
- [4] R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente, J.M. Guisán, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 185–197.
- [5] D.-G. Lee, K.M. Ponvel, M. Kim, S. Hwang, I.-S. Ahn, C.-H. Lee, Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57 (2009) 62–66.
- [6] E.A. Manoel, J.C.S. dos Santos, D.M.G. Freire, N. Rueda, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, *Enzyme Microb. Technol.* 71 (2015) 53–57.
- [7] A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Høge-Jensen, S.A. Patkar, L. Thim, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature* 351 (1991) 491–494.
- [8] C. Cambillau, S. Longhi, A. Nicolas, C. Martinez, Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (1996) 449–455.
- [9] M. Cygler, J.D. Schrag, Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase1, *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 1441 (1999) 205–214.
- [10] K.-E. Jaeger, S. Ransac, H.B. Koch, F. Ferrato, B.W. Dijkstra, Topological characterization and modeling of the 3 D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS Lett.* 332 (1993) 143–149.
- [11] K.K. Kim, H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S.W. Suh, The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure* 5 (1997) 173–185.
- [12] R. Verger, 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 32–38.
- [13] N. Rueda, J.C.S. dos Santos, R. Torres, C. Ortiz, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads, *RSC Adv.* 5 (2015) 11212–11222.
- [14] G. Fernandez-Lorente, M. Filice, D. Lopez-Vela, C. Pizarro, L. Wilson, L. Betancor, Y. Avila, J.M. Guisán, Cross-linking of lipases adsorbed on hydrophobic supports: highly selective hydrolysis of fish oil catalyzed by RML, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 801–807.
- [15] S. Peirce, G.V. Tacias-Pascacio, E.M. Russo, A. Marzocchella, J.J. Virgen-Ortíz, R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) immobilized on octyl agarose by treatment with polyethyleneimine (PEI), *Molecules* 21 (2016) 751.
- [16] E. Abaházi, Z. Boros, L. Poppe, Additives enhancing the catalytic properties of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on mixed-function-grafted mesoporous silica gel, *Molecules* 19 (2014) 9818–98378.
- [17] T.L.d. Albuquerque, N. Rueda, J.C.S. dos Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, B. Binay, E. Özdemir, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment, *Process Biochem.* 51 (2016) 865–874.
- [18] C. Bernal, A. Illanes, L. Wilson, Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis, *Langmuir* 30 (2014) 3557–3566.
- [19] C. Bernal, A. Illanes, L. Wilson, Improvement of efficiency in the enzymatic synthesis of lactulose palmitate, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 3716–3724.
- [20] L. Fernandez-Lopez, N. Rueda, R. Bartolome-Cabrero, M.D. Rodriguez, T.L. Albuquerque, J.C.S. dos Santos, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂, *Process Biochem.* 51 (2016) 48–52.
- [21] N. Guajardo, C. Bernal, L. Wilson, Z. Cabrera, Asymmetric hydrolysis of dimethyl-3-phenylglutarate in sequential batch reactor operation catalyzed by immobilized *Geobacillus thermocatenulatus* lipase, *Catal. Today* 255 (2015) 21–26.
- [22] N. Guajardo, C. Bernal, L. Wilson, Z. Cabrera, Selectivity of R- α -monobenzoate glycerol synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B immobilized on heterofunctional supports, *Process Biochem.* 50 (2015) 1870–1877.
- [23] N. Rueda, J.C.S. dos Santos, R. Torres, C. Ortiz, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, in: Vijaya K. Challa (Ed.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, 2016, pp. 73–85.
- [24] A. Suescun, N. Rueda, J.C.S. dos Santos, J.J. Castillo, C. Ortiz, R. Torres, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on glyoxyl-octyl supports: improved stability and reactivation strategies, *Process Biochem.* 50 (2015) 1211–1217.
- [25] N. Rueda, L.T. Albuquerque, R. Bartolome-Cabrero, L. Fernandez-Lopez, R. Torres, C. Ortiz, C.J. dos Santos, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octyl-amino agarose beads prevents enzyme desorption, *Molecules* 21 (2016) 646.
- [26] N. Rueda, C.S. dos Santos, M.D. Rodriguez, T.L. Albuquerque, O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 128 (2016) 10–18.
- [27] H. Maag, Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 259–267.
- [28] V.R. Murty, J. Bhat, P.K.A. Muniswaran, Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 7 (2002) 57–66.
- [29] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, One biocatalyst—many applications: the use of *Candida Antarctica* B-lipase in organic synthesis, *Biocatal. Biotransform.* 16 (1998) 181–204.
- [30] V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds, *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 797–812.
- [31] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*, *J. Mol. Biol.* 235 (1994) 790–792.
- [32] K. Hernandez, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente, Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 510–517.
- [33] D.B. Hirata, T.L. Albuquerque, N. Rueda, J.M. Sánchez-Montero, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente, Production of 1,2-dibutyrin by specific and selective hydrolysis of tributyrin catalyzed by immobilized lipases, *ChemistrySelect* 1 (2016) 3259–3270.
- [34] D.B. Hirata, T.L. Albuquerque, N. Rueda, R. Fernandez-Lafuente, Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133 (2016) 117–123.
- [35] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [36] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [37] Z. Cabrera, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, J.M. Guisán, Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57 (2009) 171–176.
- [38] B. Chen, J. Hu, E.M. Miller, W. Xie, M. Cai, R.A. Gross, *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis, *Biomacromolecules* 9 (2008) 463–471.
- [39] B. Chen, M.E. Miller, R.A. Gross, Effects of porous polystyrene resin parameters on *Candida antarctica* lipase B adsorption, distribution and polyester synthesis activity, *Langmuir* 23 (2007) 6467–6474.
- [40] Y. Mei, L. Miller, W. Gao, R.A. Gross, Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy, *Biomacromolecules*, 4 2033 70–74.
- [41] C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 2885–2904.
- [42] R.A. Sheldon, S. Van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235.
- [43] J. Zeng, Y. Xia, Hybrid nanomaterials: not just a pretty flower, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 415–416.
- [44] X. Wu, J. Ge, C. Yang, M. Hou, Z. Liu, Facile synthesis of multiple enzyme-containing metal-organic frameworks in a biomolecule-friendly environment, *Chem. Commun.* 51 (2015) 13408–13411.
- [45] F. Lyu, Y. Zhang, R.N. Zare, J. Ge, Z. Liu, One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities, *Nano Lett.* 14 (2014) 5761–5765.

5.3. Evaluación de nuevos biocatalizadores en la producción de biodiésel

En comparación con la catálisis química, la catálisis enzimática tiene numerosas ventajas. A pesar de eso, y debido a su alto costo, los biocatalizadores no son utilizados en la producción industrial de biodiésel. Por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevos biocatalizadores que compitan con los catalizadores comerciales en actividad, rendimientos y vida útil.

Como parte de este proyecto de investigación, se desarrollaron nuevos biocatalizadores de lipasas para su uso en la producción de biodiésel. Estos biocatalizadores se obtuvieron mediante inmovilización, por activación interfacial, de cinco lipasas en cinco diferentes soportes comerciales. Los soportes fueron: Lifetech™ ECR1061M (estireno metacrilato), Lifetech™ ECR8804M (octadecil metacrilato), Lifetech™ ECR8806M (octadecil metacrilato), Lifetech™ ECR1090M (estireno) y Lifetech™ ECR1030M (DVB/metacrilato). Las enzimas utilizadas fueron: lipasa de *Rhizomucor miehii* (RML), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasas A and B de *Candida antarctica*, (CALA and CALB), así como una fosfolipasa llamada *Lecitasa*.

Los biocatalizadores desarrollados fueron evaluados en la producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales y metanol. Las reacciones se llevaron a cabo en sistemas libre y con solvente (empleando hexano y t-butanol), y los resultados obtenidos fueron comparados con los catalizadores comerciales Novozyme 435, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM.

Se encontró que en todos los casos, al menos uno de los nuevos biocatalizadores fue mejor que su contraparte comercial en condiciones libres de solvente, y que en general, los soportes con grupos acilos dieron mejores rendimientos. La metodología, resultados, discusión y conclusión de este trabajo se presentan en la publicación: Tacias-Pascacio, V. G., Virgen-Ortíz, J. J., Jiménez-Pérez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A. y Fernandez-Lafuente, R. 2017. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiésel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel*. **200**: 1-10

Publicación 4: Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support.

Fuel (2017). 200:1-10

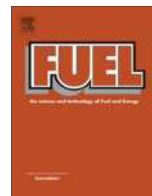
Revista: Fuel

ISSN: 0016-2361

Editorial: Elsevier

País: Países Bajos

Factor de impacto en 2017: 4.6



Full Length Article

Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support



Veymar G. Tacias-Pascacio^{a,b}, Jose J. Virgen-Ortíz^c, Mauricio Jiménez-Pérez^d, Malcolm Yates^b, Beatriz Torrestiana-Sanchez^{a,*}, Arnulfo Rosales-Quintero^{d,*}, Roberto Fernandez-Lafuente^{b,*}

^a Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel A. de Quevedo 2779, 91897 Veracruz, Mexico

^b Instituto de Catálisis y Petroquímica – CSIC, 28049 Madrid, Spain

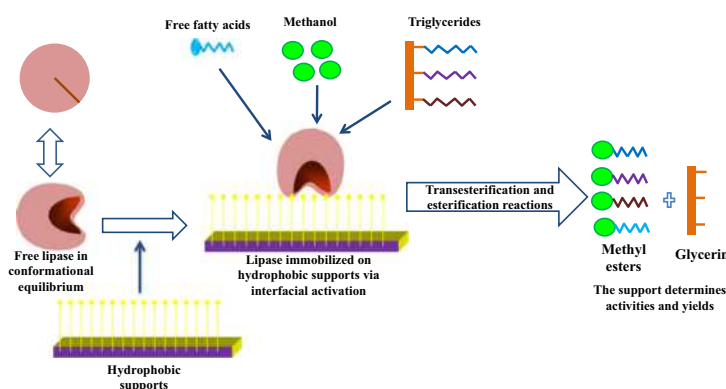
^c CONACYT – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) – Consorcio CIDAM, Km. 8 Antigua Carretera a Pátzcuaro s/n, 58341 Morelia, Michoacán, Mexico

^d Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana Km. 1080, 29050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

HIGHLIGHTS

- Different lipases were physically immobilized on hydrophobic supports via interfacial activation.
- These biocatalysts were utilized in the production of biodiesel from used cooking oil.
- The properties of the lipase were very dependent on the immobilization support.
- Some of the new biocatalysts enhanced the results obtained with the commercial immobilized biocatalyst.
- TLL immobilized in the new supports showed to be the best biocatalyst, with more than 80% yield in 2 h.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2017

Received in revised form 16 March 2017

Accepted 17 March 2017

Keywords:

Lipase immobilization
Modulation of enzyme properties
Hydrophobic supports
Biodiesel
Lipase interfacial activation

ABSTRACT

A new battery of biocatalyst was evaluated in the synthesis of biodiesel using a mix of used cooking oil and fats and methanol as substrates. Biocatalysts were prepared using five different commercial supports (Lifetech™ ECR1061M (styrene/methacrylic polymer), Lifetech™ ECR8804M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR8806M (octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR1090M (styrene) and Lifetech™ ECR1030M (DVB/methacrylic polymer)) for the immobilization of four different lipases (from *Rhizomucor miehiei* (RML), from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and the A and B forms from *Candida antarctica*, (CALA and CALB)) and of the phospholipase Lecitase Ultra™ (LU), and their performance were compared with that from commercial biocatalysts (when available: TL-IM, RM-IM and Novozyme 435). Results clearly showed that the methyl ester yields and specific activities greatly depend on the support. The addition of organic solvents usually had positive effects on all preparations activities but not on the yields, and the results depend on the solvent used, enzyme and media. In all cases, at least one of the new preparations was better than the commercial one in solvent free conditions, and in general supports having a layer of acyl groups gave better activities (octadecyl) that when the enzyme was directly immobilized on the support surface. TLL immobilized the new supports (except Lifetech™ ECR1061M) seemed to be very promising in solvent free medium, and yields near to 80% could be achieved in direct addition of

* Corresponding authors at: ICP-CSIC, C/ Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain (R. Fernandez-Lafuente).

E-mail addresses: btorrestiana@gmail.com (B. Torrestiana-Sanchez), arnold122@gmail.com (A. Rosales-Quintero), rfl@icp.csic.es (R. Fernandez-Lafuente).

3:1 methanol to triglyceride molar ratio. The results show that is not possible to discard one couple enzyme/support using other couple because the strong dependence.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing production of used frying oils from household and industrial sources is a growing problem worldwide [1–4]. Huge quantities of used cooking oils and animal fats are available throughout the world, especially in the developed countries. Management of such oils and fats is a significant challenge due to disposal problems and possible contamination of water and land resources [5]. A likely solution is oil recycling by transformation into a valuable product, such as biodiesel (methyl or ethyl esters of the fatty carboxylic acids). Hence, we significantly enhance the economic viability of biodiesel production and solve two environmental problems, the uncontrolled disposal of used oil in the environment and the production of a combustible that has no CO₂ print [6,7]. Biodiesel is produced by transforming triglycerides into fatty acid alkyl esters in the presence of an alcohol, mainly methanol, and an acid, alkali or enzymatic (lipases) catalyst [8,9] each with some advantages and drawbacks.

Waste vegetable oils have different properties compared to refined and crude oils, since they undergo degradation by hydrolytic and oxidative reactions, and their properties are dependent on the type of treatment to which they have been subjected [2,10,11]. It has been reported that the high temperatures of typical cooking processes and the water from foods accelerates the hydrolysis of triglycerides and increases the free fatty acid (FFA) content [1,12]. High FFA content of used cooking oils affects negatively the most frequently employed technology for biodiesel production, alkaline catalyzed transesterification [13]. Therefore, these waste oils can hardly be used in this conventional process [14]. In addition, the chemical-catalyzed transesterification of vegetable oils to biodiesel suffers from several inherent drawbacks related to energy-intensive and environmentally unfriendly processing steps such as catalyst and product recovery, and waste water treatment [15]. In this regard, the use of lipases to transform used oils into biodiesel may be a very suitable alternative [16–19].

Particularly, enzyme catalyzed processes for biodiesel production is characterized by certain environmental and economic advantages over the conventional chemical method. These include room-temperature reaction conditions, elimination of treatment costs associated with recovery of chemical catalysts, enzyme reuse, high substrate specificity, the ability to convert both free fatty acids and triglycerides to biodiesel in one step, lower alcohol to oil ratio, avoidance of side reactions and minimized impurities, easier product separation and recovery; biodegradability and environmental acceptance [9,15,20–25].

Lipases offer a green route for this transformation, although their use is limited due to several facts such as moderate activity in the reaction (compared to alkaline catalysis), not good enough reusability, high cost, etc. [26,27]. Some work has been conducted showing how biodiesel production may be improved by using different strategies, such as combination of different lipases (oils are heterogeneous substrates) [13,28,29], optimal reactor configuration [18,30–34], and the way the lipases are immobilized on a support [18,35–43].

Frequently, the use of lipases 1,3 specific allows reaching 100% yields, this is due to the acyl migration that relocates the fatty acid in position 2 to position 1, making it a substrate of 1,3 selective enzymes [44–47]. It has been also shown that some diffusional problems may produce the moderate activity of immobilized

enzymes observed in these reactions [48,49]. The accumulation in the support environment of reaction by-products (water and glycerin) is the main reason for lipase inactivation during operation, in addition to the negative effect of alcohols (mainly methanol) on the enzymes stability [20,50–52]. This situation has encouraged the use of free enzymes as an alternative to solve the problems generated by the support [53–56]. The authors show that the non-previously immobilized enzyme may be easily recovered from the reaction medium.

However, a proper immobilization may greatly improve enzyme features, from stability to activity and resistance to stirring, as well as decreasing inhibitions and the effect of chemical modifications, etc. [8,57–70]. Moreover, enzyme reuse is simpler when immobilized [71,72]. For these reasons, it seems a good strategy to look for supports where the problems generated in the biodiesel reaction may be decreased and simultaneously maintain the positive effects of immobilization on enzyme properties. It has been shown that the use of hydrophobic supports may prevent glycerin adsorption on the support leading to improved biocatalyst operational stability [39–43]. Hence, the use of hydrophobic supports may improve the enzyme performance in esterifications (using free fatty acids) by reducing the accumulation of water and in transesterifications (using the glycerides) by decreasing the concentration of glycerin in the enzyme environment.

Moreover, the negative accumulation of glycerol on supports on lipase activity and the diffusion problems generated using an immobilized enzyme may be reduced by using hydrophobic organic solvents such as hexane, n-heptane or cyclohexane as reaction media [48,49,71,73]. The hydrophilic *tert*-butanol is described to permit high transesterification yields and rates, due to its moderate hydrophobicity, is able to dissolve both glycerol and methanol, so the negative effects of short chain alcohols and glycerol on enzyme activity could be totally eliminated resulting in high reaction yields and high stability of lipases [23,74,75]. The use of solvent free medium or some solvent permits to go from biphasic systems to a homogenous reaction media [74]. These solvents also reduced the negative effects of methanol on the enzyme properties. This may be also reduced by a stepwise addition of the methanol, avoiding a high concentration of this solvent being reached [76–79].

Recently a new battery of biocatalysts of different lipases has been prepared using hydrophobic supports [80]. The supports utilized were always hydrophobic, but to different degrees and with different internal morphologies. Immobilization in these hydrophobic supports followed the same mechanism, interfacial activation of the enzyme versus the hydrophobic support (involving the open form of the lipase) [81]. However, the catalysts exhibited very different features, regarding substrate specificity in hydrolysis reactions and stability under different conditions, and always at least one of the new home-made lipase biocatalysts showed better features than the enzyme immobilized on octyl agarose or the commercial counterpart [80].

In this new research effort, we analyzed the possibilities of using this new battery of biocatalysts in the synthesis of biodiesel employing a mix of used cooking oil and fats and methanol as substrates. As enzymes, we have used some of the most frequently reported in literature: lipases A and B from *C. antarctica* [82–84], lipases from *T. lanuginosus* [85] and from *R. miehei* [86,87]. Lecitase Ultra, a commercial artificial chimeric phospholipase A1 [88,89]

has been also used, as this enzyme is able to suffer artificial activation as a standard lipase [90]. This enzyme is the result of the fusion of the gen of the lipase from *T. lanuginosus* and that of the phospholipase from *Fusarium oxysporum* [89]. All the enzymes were immobilized in different hydrophobic supports, Lifetech™ ECR1061M (Styrene/methacrylic polymer), Lifetech™ ECR8804M (Octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR8806M (Octadecyl methacrylate), Lifetech™ ECR1090M (Styrene) and Lifetech™ ECR1030M (DVB/methacrylic polymer), and their performance compared with that of commercial biocatalysts (when available: TL-IM, RM-IM and Novozyme 435) [80]. We utilized solvent free reactions and also the role of some organic solvents to reduce the diffusional problems and evaluate likely changes in the different enzyme preparations. The responses of the different biocatalysts to these experimental conditions were analyzed. Our target is not the optimization of the reaction, but to check if the enzyme properties may be so strongly modulated in this reaction via immobilization, as it has been described in many reactions in aqueous media [60,67,70,80] and how the changes in the reaction media may differently affect the different enzyme/support couples.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Free lipases from *T. lanuginosus*, phospholipase Lecitase Ultra, *R. miehie* and *C. antarctica* (isoforms A or B) as well as Lipozyme® TL-IM, Novozym® 435 and Lipozyme® RM-IM immobilized enzymes were a kind gift from Novozymes (Spain). Supports were kindly donated by Purolite® ECR Enzyme Immobilization Resins (Wales, UK). Feedstock was a mix of waste cooking oils and fats (WCOF), collected from different restaurants of Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico. The physicochemical characteristics of the feedstock are presented in Table 1 [14]. *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bradford protein assay kit was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Methanol, heptane, hexane and *tert*-butanol were of analytical or HPLC grade.

2.2. Assay of lipase enzyme activity

Lipase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 348 nm caused by the release of *p*-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM *p*-NPB in 25 mM sodium phosphate at pH 7.0 and 25 °C (ϵ under these conditions is $5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). To initialize the reaction, 50–100 μL of lipase solution or suspension

was added to 2.55 mL of substrate solution. The initial rates of all enzyme reactions were corrected for the rate of spontaneous hydrolysis of *p*-NPB under identical conditions without enzyme solution. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μmol of *p*-NPB per minute under the conditions described previously. Protein content was determined according to the Bradford method [91] recording the absorbance at 595 nm and using bovine serum albumin as a protein standard.

2.3. Immobilization of lipases

2.3.1. Wetting of the Purolite supports

Prior to use, Purolite supports were submitted to a treatment to remove air and fill the pores with water, because these supports are so hydrophobic that water hardly goes directly into their pores. A sample of 10 g of each support was suspended in 50 mL of methanol for 1 h under mild stirring; subsequently, 50 mL of distilled water were added to have a 50% water solution. After 15 additional minutes of mild stirring, the supports were filtered under vacuum and washed 5 times in a glass funnel with 5 volumes of water. When supports were not used, they were stored at 4 °C, in a flask with distilled water to avoid their dehydration.

2.3.2. Immobilization of lipases on wet Purolite supports

Immobilization of lipases was performed suspending 10 g of each support in an adequate volume of a 5 mM sodium phosphate enzyme solution (0.5 mg of protein per mL) at pH 7 and 25 °C and left in continuous stirring at 200 rpm [80]. Activity of supernatant was followed using the *p*NPB assay. When immobilization ended, the suspension was filtered and the immobilized enzymes were washed several times with distilled water, and stored at 4 °C. Table 2 shows the loading capacity of the different supports for each enzyme, as well as their pore diameters [80]. Maximum loads were used for each support to prepare the biocatalysts used in this paper.

2.4. Transesterification reactions in solvent free systems

All transesterification reactions were carried out in 50-mL Erlenmeyer flasks at 30 °C under orbital stirring at 350 rpm. The reaction mixture consisted of 2 g WCOF, biocatalyst 10% (w/w of WCOF), distilled water 1% (w/w of WCOF) and 3:1 methanol to WCOF molar ratio. The biocatalysts were previously dried at 40 °C for 24 h. Reaction mixtures were agitated for 24 h, then 5 mL of distilled water was added, followed by centrifugation in a Eppendorf centrifuge (from Fisherbrand, Model “gusto”)

Table 1

Physicochemical properties and fatty acid composition of the feedstock. Each value represents the mean of three replicates \pm SD.

Feedstock	Acid value (mg KOH/g)	Free fatty acid content (%)	Moisture (%)	Saponification index (mg KOH/g)	Fatty acid average composition (%)						
					16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Others
WCOF	2.09 \pm 0.09	1.05 \pm 0.04	0.04 \pm 0.001	198.54 \pm 0.71	17.82 \pm 0.23	0.51 \pm 0.04	5.75 \pm 0.11	40.98 \pm 0.33	28.77 \pm 0.15	4.51 \pm 0.36	1.67 \pm 0.01

Table 2

Pore diameter and loading capacity of the different commercial Purolite® supports studied [80].

Supports	Maximum pore size (nm)	Loading capacity (mg protein/g support)				
		CALA	CALB	Lecitase Ultra	RML	TLL
Macroporous styrene	108 \pm 3	5 \pm 0.24	11 \pm 0.61	25 \pm 0.37	31 \pm 0.56	12 \pm 0.02
Styrene methacrylate	48 \pm 3	0.5 \pm 0.01	4 \pm 0.18	8 \pm 0.45	24 \pm 0.39	6 \pm 0.22
Octadecyl methacrylate	52 \pm 2	10 \pm 0.41	13 \pm 0.21	21 \pm 0.62	47 \pm 0.43	17 \pm 0.83
DVB methacrylate	29 \pm 1	10 \pm 0.14	10 \pm 0.20	17 \pm 0.37	16 \pm 0.83	13 \pm 0.30
Octadecyl methacrylate	40 \pm 2	5 \pm 0.25	9 \pm 0.19	14 \pm 0.21	20 \pm 0.39	10 \pm 0.44

Table 3
Initial rate values and yield (%) (at 24 h) for CALB biocatalysts in transesterification of WCOF in solvent-free, hexane and *tert*-butanol systems. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) was calculated based on methyl esters (ME) produced after 1.5 h of reaction and is expressed as amount of ME per hour per gram of biocatalyst or mg of immobilized enzyme. ME formation within 1.5 h progresses linearly with time.

Lipase	Enzymatic derivative	Solvent-free			Hexane			<i>tert</i> -Butanol		
		Initial activity			Initial activity			Initial activity		
		<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)
CAL-B	Macroporous styrene	0.032 ± 0.0008	0.35 ± 0.016	52 ± 2.0	0.06 ± 0.003	0.67 ± 0.02	26 ± 1.0	0.15 ± 0.006	1.60 ± 0.06	47 ± 1
	Styrene methacrylate	0.021 ± 0.0009	0.08 ± 0.002	10 ± 0.4	0.10 ± 0.004	0.40 ± 0.02	17 ± 0.6	0.15 ± 0.004	0.60 ± 0.02	41 ± 1
	Octadecyl methacrylate	0.032 ± 0.01	0.42 ± 0.018	71 ± 3.2	0.06 ± 0.002	0.73 ± 0.03	33 ± 1.3	0.21 ± 0.008	2.73 ± 0.08	43 ± 1
	DVB methacrylate	0.012 ± 0.0004	0.12 ± 0.004	20 ± 0.5	0.05 ± 0.002	0.53 ± 0.02	13 ± 0.5	0.13 ± 0.005	1.33 ± 0.05	53 ± 2
	Octadecyl methacrylate	0.033 ± 0.0007	0.30 ± 0.014	69 ± 3.0	0.06 ± 0.002	0.53 ± 0.02	46 ± 2.0	0.28 ± 0.009	2.53 ± 0.09	44 ± 2
	Novozym [®] 435		0.37 ± 0.016	60 ± 2.0						

(4000 rpm, 15 min, 4 °C). The upper phase, containing esters, was analyzed by gas chromatography.

2.5. Transesterification reactions with solvents

All transesterification reactions were carried out in 50-mL Erlenmeyer flasks at 30 °C under orbital stirring at 350 rpm. The reactions were performed with 2 g WCOF, biocatalyst 10% (w/w of WCOF), distilled water 0.25% (w/w of WCOF), 3:1 methanol to WCOF molar ratio, and 3 mL hexane or *tert*-butanol. In some instances, methanol to WCOF molar ratio was increased to 9:1, and the methanol could be added stepwise (initially we added 1 M equivalent, and then 1/3 M equivalent each 1.5 h). As control, 6:1 and 9:1 methanol to WCOF molar ratios were evaluated in one step. In other instances, 50% *tert*-butanol or 50% hexane was added. Samples were periodically withdrawn from the flasks eliminating the biocatalyst. Reaction was stopped after 24 h and biocatalyst was separated from the reaction media. The samples were incubated in an oven at 40 °C for 24 h to evaporate the solvent, subsequently the remaining solutions were centrifuged (4000 rpm, 15 min, 4 °C). The upper phase, containing the esters, was analyzed by gas chromatography as described below.

2.6. Analyses of fatty acid methyl esters by gas chromatography

Analyses of fatty acid methyl esters (FAME) were conducted by gas chromatography in an Agilent Technologies gas chromatograph (model 5975) equipped with a flame ionization detector (FID) and BD-EN14103 capillary column (30 m × 320 μm × 0.25 μm). The split ratio was 50:1, and nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 2.0 mL min⁻¹. Injector and detector temperatures were 250 °C and 300 °C, respectively.

The temperature program was as follows: starting at 120 °C for 0 min and then heating to 220 °C at 4 °C min⁻¹, holding at 220 °C for 2 min, followed by heating from 220 to 250 °C at 15 °C min⁻¹ (hold for 10 min). The amount of sample injected was 1 μL, and total time of the analysis was 39 min.

100 mg of each sample was accurately weighed and mixed with 2 mL of an internal standard stock solution of methyl heptadecanoate in heptane (10 mg/mL). An analytical standard FAME mix (C4–C24) from Supelco was used to identify the peaks at different retention times. The FAME content was calculated using the compensated normalization method with internal standardization, based on the European standard EN 14103 [92].

3. Results and discussion

3.1. Effect of the support on the properties of CALB as catalyst for the production of biodiesel from used cooking oils

Table 3 resumes the results observed with the different preparations. Using solvent free medium and an equimolecular molar ratio fatty acids/methanol (3 mol of methanol per mol of triglyceride), the system is a biphasic and very viscous one. Under these conditions, CALB-octadecyl methacrylate was the biocatalyst with the highest activity, closely followed by the commercial Novozym 435 and CALB-styrene. CALB immobilized on styrene methacrylate or DVB methacrylate were the preparations with the lowest activities.

Considering the activity per mg of enzyme, and discarding Novozym 435 due to the difficulties to analyze the loading, only CALB immobilized in DVB methacrylate (0.012 U/mg) was clearly less active than the other preparations, that ranged from 0.021 U/mg using styrene methacrylate to 0.33 U/mg using octadecyl methacrylate. DVB methacrylate was the biocatalyst with the narrower pore size (Table 2), and that could increase the diffusion problems using this solvent free system [48,49]. However, styrene presented the largest pores (Table 2) and it was the third worst CALB biocatalyst in specific activity. Thus, the differences in activity of the biocatalyst came from differences in activity per enzyme molecule (a new example of enzyme tuning after immobilization), loading capacity and generation of diffusion limitations in this complex reaction medium.

Yields after 24 h of reaction were 71% using CALB-octadecyl methacrylate and 69% using CALB-octadecyl methacrylate both clearly improving the result using the commercial using Novozym 435 (60%) after this time.

Next, we added 50% v/v of hexane to analyze the effect on enzyme activity on the home made preparations. Hexane will have several effects: decrease the diffusion limitations, reduce the viscosity of the reaction medium and making a more homogenous one, but also may directly affect the enzyme structure and this may be different depending on the immobilization support [66,70]. However, hexane produced a general decrease in the yields after 24 h; the best results were achieved using CALB-octadecyl methacrylate. However, initial reaction rates in general increased and differences in activity between the various preparations become smaller, CALB-octadecyl methacrylate remained the most active, while DVB methacrylate CALB improved its activity and surpassed that of styrene methacrylate and become similar to octade-

Table 4

Activity and yield (%) (at 24 h) of CALA biocatalysts in transesterification of WCOF in solvent-free, hexane and *tert*-butanol systems. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) was calculated based on methyl esters (ME) produced after 1.5 h of reaction and is expressed as amount of ME per hour per gram of biocatalyst or mg of immobilized enzyme.

Lipase	Enzymatic derivative	Solvent-free			Hexane			<i>tert</i> -Butanol		
		Initial activity			Initial activity			Initial activity		
		<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)
CAL-A	Macroporous styrene	0.013 ± 0.0006	0.07 ± 0.003	6 ± 0.2	0.09 ± 0.004	0.47 ± 0.022	8 ± 0.2	0.11 ± 0.004	0.53 ± 0.024	17 ± 0.6
	Styrene methacrylate	0.013 ± 0.0006	0.01 ± 0.003	2 ± 0.1	0.67 ± 0.031	0.33 ± 0.016	9 ± 0.3	1.07 ± 0.052	0.53 ± 0.025	9 ± 0.3
	Octadecyl methacrylate	0.015 ± 0.0006	0.15 ± 0.006	21 ± 0.8	0.05 ± 0.002	0.53 ± 0.022	8 ± 0.2	0.08 ± 0.003	0.80 ± 0.035	25 ± 0.9
	DVB methacrylate	0.005 ± 0.0002	0.05 ± 0.002	9 ± 0.3	0.05 ± 0.002	0.47 ± 0.022	11 ± 0.4	0.05 ± 0.002	0.53 ± 0.022	16 ± 0.6
	Octadecyl methacrylate	0.027 ± 0.001	0.13 ± 0.006	19 ± 0.6	0.13 ± 0.006	0.67 ± 0.032	12 ± 0.5	0.13 ± 0.006	0.67 ± 0.031	18 ± 0.7

cyl methacrylate. CALB specific activity was maximum using styrene methacrylate (0.1 U/mg), while with the other preparations remained very similar (0.05–0.06 U/mg). Hexane will have several effects: decrease the diffusion limitations (that may be very relevant in DVB methacrylate), but also may directly affect the enzyme structure and this may be different depending on the immobilization support [66].

The use of *tert*-butanol permits to have a fully monophasic system. This medium generally gave higher yields after 24 h than the use of hexane (except using octadecyl methacrylate) but lower than using solvent free systems (except using DVB methacrylate because of the high increment in enzyme activity). Activity is clearly the highest detected using this enzyme, in some cases multiplying by 4–5-fold that observed using hexane (octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate). The most active CALB biocatalyst remained CALB octadecyl methacrylate, but it was closely followed by octadecyl methacrylate. The least active biocatalyst also remained CALB styrene methacrylate. Considering specific activity of CALB, qualitative order of the biocatalyst was quite different to when using hexane: the most active CALB molecules were immobilized on octadecyl methacrylate, followed by octadecyl methacrylate and the least active one was CALB immobilized in styrene methacrylate. The change of solvent had minimal effect on DVB methacrylate and styrene methacrylate.

Thus, the support has significant effects on the performance of immobilized CALB when used as catalyst for biodiesel production, affecting both yields and activities, and this effect depended on the reaction conditions.

3.2. Effect of the support on the properties of CALA as catalyst for the production of biodiesel from cooking oils

Table 4 shows the main results obtained using CALA. All CALA biocatalysts gave much worse results than using CALB in all conditions, with a maximum yield of only 25%. However, differences among the various preparations and the changes caused by hexane and *tert*-butanol are very clear. In solvent free systems, only octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate have significant yields, with similar specific activities. Using hexane as reaction media, these biocatalysts decreased their yields; all preparations gave 8–12%. Immobilized CALA activity greatly increased in this medium. The specific activities of CALA mainly using CALA immobilized in styrene methacrylate, that was the one with the highest specific activity, while differences between CALA immobilized on octadecyl methacrylate (0.13 U/mg) and octadecyl methacrylate (0.05 U/mg) became more significant.

The use of *tert*-butanol had the most significant effects. It permits the maximum yields after 24 h (25%) using CALA octadecyl methacrylate. However, except CALA styrene methacrylate (9%) all the preparations gave yields over 15%. Activity was generally higher in this medium than in hexane, except using octadecyl methacrylate, where the activity was maintained. The CALA with the highest specific activity was that immobilized in styrene methacrylate, one order of magnitude higher than the specific activity observed with the enzyme immobilized on the other supports. Thus, even if all these preparations of CALA can be discarded as biocatalysts for the production of biodiesel from used cooking oil, the effect of the immobilization support and the reaction media is quite significant and, as in the case of CALB, may be the combined effect of many different causes.

3.3. Effect of the support on the properties of LU as catalyst for the production of biodiesel from used cooking oils

Table 5 shows the main results obtained using LU. This enzyme offers the largest influence on experimental conditions and immobilization protocols in its performance in the studied reaction.

In solvent free medium, yields after 24 h were under 10% except using LU-octadecyl methacrylate (22%). Octadecyl methacrylate and styrene gave 9% yields. LU-octadecyl methacrylate was also the most active and the one with the highest LU specific activity. Hexane permitted to reach 9–11% yields for all LU-preparations. Styrene was the most active preparation (0.67 U/g), followed by styrene methacrylate and octadecyl methacrylate (0.60 U/g), being DVB the one with the lowest activity (0.33 U/g). Styrene methacrylate gave the highest specific activity of immobilized LU, more than doubling the other immobilized enzyme molecules, DVB methacrylate was the one with lowest specific activity (0.02 U/mg). The situation is very different using *tert*-butanol as solvent. LU-octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate gave around 60% biodiesel yield after 24 h, LU-styrene gave 50% and DVB methacrylate was near to this value. This meant that this enzyme, that could be discarded from the results in the other media, become competitive even with CALB. The most active preparation was LU-octadecyl methacrylate (3.2 U/g), closely followed by octadecyl methacrylate (2.8 U/g), the least active one was LU-styrene methacrylate (0.47 U/g). Regarding specific activity, LU immobilized on octadecyl methacrylate was the most active (0.2 U/mg), followed by the enzyme immobilized on octadecyl methacrylate (0.15 U/mg), the other three yielded values around 0.05/0.06 U/mg.

Table 5
Activity and yield (%) (at 24 h) of Lecitase Ultra biocatalysts in transesterification of WCOF in solvent-free, hexane and *tert*-butanol systems. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) was calculated based on methyl esters (ME) produced after 1.5 h of reaction and is expressed as amount of ME per hour per gram of biocatalyst or mg of immobilized enzyme.

Lipase	Enzymatic derivative	Solvent-free			Hexane			<i>tert</i> -Butanol		
		Initial activity			Initial activity			Initial activity		
		<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)
LU	Macroporous styrene	0.006 ± 0.0002	0.15 ± 0.0065	9 ± 0.4	0.03 ± 0.001	0.67 ± 0.02	11 ± 0.4	0.06 ± 0.001	1.47 ± 0.05	50 ± 2
	Styrene methacrylate	0.002 ± 0.0001	0.01 ± 0.0005	3 ± 0.1	0.08 ± 0.002	0.60 ± 0.02	9 ± 0.3	0.06 ± 0.001	0.47 ± 0.02	22 ± 1
	Octadecyl methacrylate	0.020 ± 0.0006	0.33 ± 0.015	22 ± 1.0	0.03 ± 0.001	0.60 ± 0.01	9 ± 0.2	0.15 ± 0.004	3.20 ± 0.12	61 ± 2
	DVB methacrylate	0.003 ± 0.0001	0.05 ± 0.0022	4 ± 0.1	0.02 ± 0.001	0.33 ± 0.01	9 ± 0.3	0.05 ± 0.001	0.80 ± 0.02	47 ± 1
	Octadecyl methacrylate	0.010 ± 0.0004	0.15 ± 0.0060	9 ± 0.2	0.03 ± 0.001	0.47 ± 0.02	11 ± 0.4	0.20 ± 0.001	2.80 ± 0.12	59 ± 2

Again, it a significant effect on the immobilization protocol on the performance of the phospholipase as catalyst for the production of biodiesel was clear.

3.4. Effect of the support on the properties of rml as catalyst for the production of biodiesel from used cooking oils

Table 6 resumes the results obtained with different RML biocatalysts. In solvent free medium, RML octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate are the only ones with yields over 20% after 24 h, while RML immobilized in DVB methacrylate was virtually inactive. RML immobilized in octadecyl methacrylate was the most active enzyme molecules, although RML octadecyl methacrylate was the most active preparation due to the higher load.

The use of hexane reduced the yields obtained after 24 h with the best biocatalyst above (14 and 10%), but now all preparations gave yields around 10%. In this medium, RML immobilized in DVB methacrylate gave the maximum specific activity (0.03 U/mg); all the others gave values around 0.2 U/mg except the enzyme immobilized in styrene methacrylate, which gave the lowest activity. The situation was quite different using *t*-butanol, except using styrene methacrylate and octadecyl methacrylate (yields are 11%), the other three preparations gave yields after 24 h over 40%. Among these three biocatalysts, the most active was octadecyl methacrylate (2.47 U/g), closely followed by DVB methacrylate (2.27 U/g)

and the least active was RML styrene (1.2 U/g). Regarding specific activity, the enzyme immobilized in DVB methacrylate (0.14 U/mg) almost tripled the second one, octadecyl methacrylate (0.05 U/mg); only the enzyme immobilized in octadecyl methacrylate was significantly less active (0.01 U/mg).

Again, there was a significant effect of the immobilization protocol on the yields, activity and effect of the medium on the enzyme performance.

3.5. Effect of the support on the properties of tll as catalyst for the production of biodiesel from used cooking oils

Table 7 shows that this enzyme permitted the highest yields after 24 h reported in this paper under the standard conditions, again with a large dependence on the medium and immobilization protocol.

The highest yield after 24 h was obtained using TLL styrene, octadecyl methacrylate and octadecyl methacrylate (79%), closely followed by TLL DVB methacrylate (77%). In fact, this maximum yield was obtained after just 3 h of reaction. TLL immobilized on styrene methacrylate gave just 50% yield of biodiesel, while the commercial TL-IM gave the lowest yield (13%). By adding 50% (v/v) hexane yields had slight variations, using TLL octadecyl methacrylate the yield increased to 83%, while using the other TLL preparations yields slightly decreased (2–3%). Maximum yield

Table 6
Activity and yield (%) (at 24 h) of RML biocatalysts in transesterification of WCOF in solvent-free, hexane and *tert*-butanol systems. Experiments were performed as described in Section 2. The activity (*V*) was calculated based on methyl esters (ME) produced after 1.5 h of reaction and is expressed as amount of ME per hour per gram of biocatalyst or mg of immobilized enzyme.

Lipase	Enzymatic derivative	Solvent-free			Hexane			<i>tert</i> -Butanol		
		Initial activity			Initial activity			Initial activity		
		<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)	<i>V</i> (U mg ⁻¹ protein)	<i>V</i> (U g ⁻¹ enzymatic derivative)	Yield (%)
RML	Macroporous styrene	0.003 ± 0.00014	0.10 ± 0.005	7 ± 0.2	0.02 ± 0.0006	0.53 ± 0.01	8 ± 0.2	0.04 ± 0.001	1.20 ± 0.04	41 ± 1.4
	Styrene methacrylate	0.0002 ± 0.00001	0.01 ± 0.0002	2 ± 0.1	0.01 ± 0.0004	0.33 ± 0.01	9 ± 0.3	0.03 ± 0.001	0.67 ± 0.02	11 ± 0.3
	Octadecyl methacrylate	0.008 ± 0.0002	0.38 ± 0.012	27 ± 1.2	0.02 ± 0.0005	0.80 ± 0.02	14 ± 0.4	0.05 ± 0.001	2.47 ± 0.08	45 ± 1.5
	DVB methacrylate	0.0001 ± 0.000002	0.001 ± 0.00004	0.6 ± 0.1	0.03 ± 0.0012	0.53 ± 0.01	9 ± 0.2	0.14 ± 0.004	2.27 ± 0.10	48 ± 1.6
	Octadecyl methacrylate	0.015 ± 0.0004	0.30 ± 0.012	20 ± 0.8	0.02 ± 0.0006	0.33 ± 0.02	10 ± 0.3	0.01 ± 0.0003	0.27 ± 0.01	11 ± 0.5
	Lipozyme [®] RM IM		0.05 ± 0.002	6 ± 0.2						

Table 7Yield (%) (at 24 h) of TLL biocatalysts in transesterification of WCOF in solvent-free, hexane and *tert*-butanol systems. Experiments were performed as described in Section 2.

Lipase	Enzymatic derivative	Yield (%)		
		Solvent-free	Hexane	<i>tert</i> -Butanol
TLL	Macroporous styrene	79 ± 2.0	77 ± 2	41 ± 1
	Styrene methacrylate	50 ± 1.2	49 ± 2	53 ± 2
	Octadecyl methacrylate	79 ± 2.2	76 ± 3	57 ± 2
	DVB methacrylate	77 ± 2.0	74 ± 2	61 ± 3
	Octadecyl methacrylate	79 ± 2.3	83 ± 4	53 ± 1
	Lipozyme® TL	13 ± 0.5		

had been almost reached after only 1.5 h of reaction. *tert*-Butanol, that with the other enzymes produced the best results, in this case produced a significant decrease in yields (the most significant one was from 83% to 53% using octadecyl methacrylate and from 77% to 41% using TLL-styrene). However, there was an exception, using TLL styrene methacrylate yields increased from 49% in hexane to 53% in *t*-butanol. Again, in general the maximum yields after 24 h had been almost reached after only 1.5 h of reaction.

That is, TLL should be an enzyme almost discarded for this reaction if using the commercial preparation of TLL, but the enzyme immobilized on the new supports enabled much higher yields and activities than using the other enzymes evaluated in this study. In fact, decreasing the amount of biocatalyst to 5% still over 70% could be achieved in only 2 h, and using 1% of catalyst in 2 h a yield over 20% (and over 60% in 6 h) was obtained, almost doubling the yield obtained with 10% of IM-TL after 24 h. These results favorable compare with many optimized reaction using lipases in literature. Considering that we have not optimized the reaction, our new TLL catalyst seems to be an optimal alternative as biocatalyst for this reaction [73–75].

3.6. Optimization of the transesterification reaction using TLL

From previous results, the new TLL biocatalysts seemed very promising for this reaction in solvent free medium. We selected the two affording the higher yields, octadecyl methacrylate (79%) and octadecyl methacrylate (79%), for these studies. Fig. 1 shows the reaction courses using commercial and the new preparations,

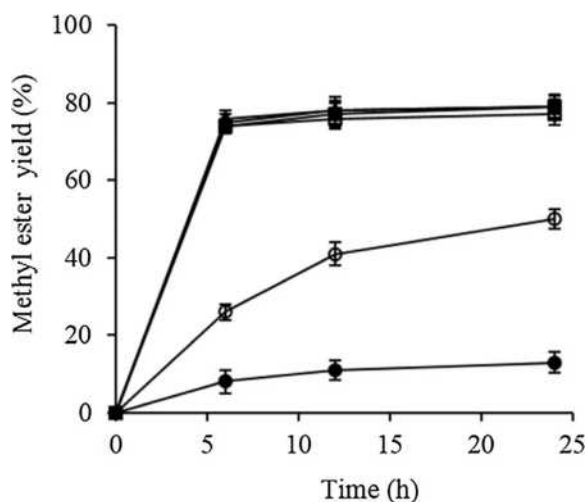


Fig. 1. Reaction courses of FAMES yield of TLL-biocatalyst in transesterification of WCOF using commercial and new TLL-preparations. Reaction conditions: 2 g WCOF, biocatalyst 10% (w/w of WCOF), distilled water 1% (w/w of WCOF), 3:1 methanol to WCOF molar ratio, 30 °C and 350 rpm. Filled circles: TLL-IM; empty circles: TLL-styrene methacrylate; filled squares: TLL-Octadecyl methacrylate; empty squares: TLL-DVB methacrylate; filled triangles: TLL-Octadecyl methacrylate; empty triangles: TLL-Macroporous styrene.

where it was clearly visible the much better performance of all the preparations compared to the commercial one, being very similar the performance of all except TLL-styrene methacrylate, which was the least active among the new biocatalysts. In order to increase the yields the molar relation of methanol to fatty acid content was increased from 1:1 to 2:1 and 3:1, using two strategies, a direct addition of the methanol or a stepwise addition to prevent enzyme inactivation (Figs. 2 and 3). It was clear that the increase of molar ratio and direct addition of methanol negatively affects the methyl esters yields. For octadecyl methacrylate the yield decreased from 79% for 1:1 to 40% and 38% for 2:1 and 3:1 methanol to fatty acid molar ratios, respectively, while for octadecyl methacrylate the yield decreased from 79% for 1:1 to 26% for both 2:1 and 3:1 methanol to triglyceride molar ratios. No differences were found between direct addition of 1:1 methanol to triglyceride molar ratio and stepwise addition, yields did not go over 80% after 24 h, and maximum yields were reached after just 2 h of reaction. Considering the extremely high reaction rate, this moderate yield could be caused by different reasons, e.g., the cooking can produce some products that are not recognized by the enzyme as substrates (nonvolatile polar compound and triacylglycerol dimers and polymers) [93], perhaps the acyl migration is so slow that it becomes the limiting step (2 acyl glycerols are not recognized as substrates by 1,3 specific enzymes). Further optimization of the reaction catalyzed by these new biocatalysts is nowadays in course in our laboratory. Together to optimize the reaction conditions, the use of mixtures of lipases may permit to further improve the biocatalyst,

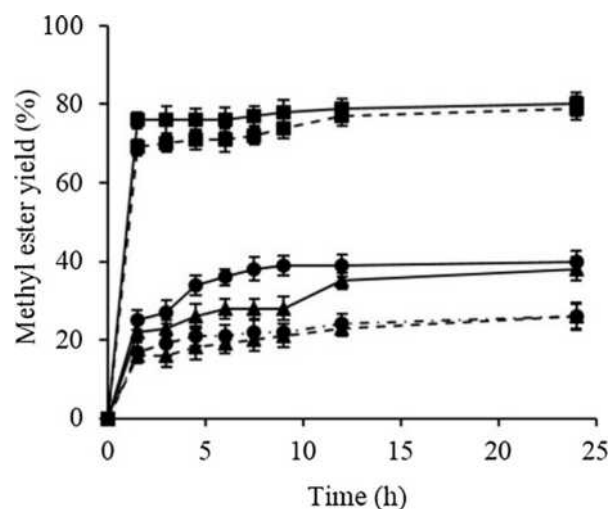


Fig. 2. Effect of methanol to WCOF molar ratio (direct addition) on methyl ester yield using TLL-Octadecyl methacrylate or TLL-Octadecyl methacrylate as biocatalyst. Reaction conditions: 2 g WCOF, biocatalyst 10% (w/w of WCOF), distilled water 0.25% (w/w of WCOF), 3:1 methanol to WCOF molar ratio, 30 °C and 350 rpm. Solid lines correspond to TLL-Octadecyl methacrylate while dashed lines correspond to TLL-Octadecyl methacrylate. Filled squares: 3:1 methanol to WCOF molar ratio; filled circles: 6:1 methanol to WCOF molar ratio; filled triangles: 9:1 methanol to WCOF molar ratio.

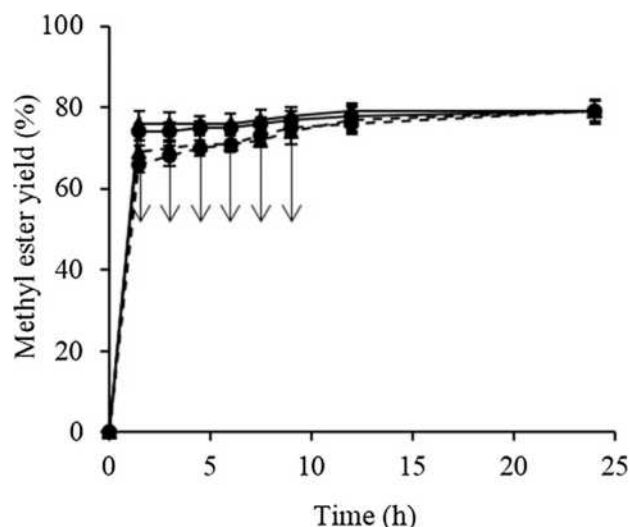


Fig. 3. Effect of stepwise addition of methanol on methyl ester yield using TLL-Octadecyl methacrylate or TLL-Octadecyl methacrylate as biocatalyst. Reaction conditions: 2 g WCOF, biocatalyst 10% (w/w of WCOF), distilled water 0.25% (w/w of WCOF), 3:1 methanol to WCOF molar ratio, 30 °C and 350 rpm. Solid lines correspond to TLL-Octadecyl methacrylate while dashes lines correspond to TLL-Octadecyl methacrylate. Filled circles: 9:1 methanol to WCOF molar ratio; filled triangles: reference (3:1 methanol to WCOF molar ratio (direct addition)). The arrows indicate the addition of 1/3 M equivalent of methanol.

using the concept of combi-lipases, because oils are not homogeneous substrates but very heterogeneous ones [94–96]. Moreover, may be possible to analyze the effect of different alcohols in the esterification, as ethanol has lower effects on enzyme properties [97,98]. Nevertheless, these initial results are very promising.

4. Conclusions

The results reported in this paper clearly show the very relevant effect of the immobilization support on the lipase performance in biodiesel transesterification of used cooking oils. It should be remarked that this is a kinetically controlled process; therefore the yields may be transient and determined by the exact properties of the biocatalyst. In the examples shown in this paper, the yields and specific activities greatly depend on the support. The addition of some solvent to decrease the diffusion problems usually had positive effects on all preparation activities (but not on the yields), but still the various preparations have different performances, and the results depend on the solvent used. Thus, the diffusion limitations may not be the only explanation for the effect of the immobilization support, and a direct effect on the enzyme performance after immobilization, as reported in many other cases, seem to be the most likely explanation for the great discrepancies found.

Results greatly depend on the enzyme and media. Thus, TLL gave the best results immobilized on some of the new supports using solvent free media, while LU only gave moderately good results using *t*-butanol and immobilized in octadecyl methacrylate or methacrylate. In contradistinction, commercial TLL and LU immobilized on other supports or under other media offered very bad results.

In all cases, we witnessed at least one preparation better than the commercial one in solvent free conditions, and in general supports having a layer of acyl groups gave better activities (octadecyl) that when the enzyme was directly immobilized on the support. This could be founded in a better diffusion of the substrate to the active center of the enzyme, oriented toward the support wall. However, there are so many exceptions that this cannot be taken

as a general rule for any enzyme under any condition. It may be expected that the combination of the use of different immobilization protocols with changes in the reaction media may permit further improvements of the enzyme reaction. For example, the combination of different immobilization protocols with the use of reaction media like ionic liquids or supercritical fluids may permit further chances of getting a good biocatalyst performance [99–101].

From the preparations used, TLL immobilized on one of the new supports different from styrene methacrylate seemed to be the most promising in solvent free medium (economically the most interesting one), Yields near to 80% could be achieved in direct addition of 3:1 methanol to triglyceride molar ratio in only 6 h, using 5% of biocatalyst. These results are over most of the published, even when the other reactions have been optimized.

Nevertheless, the main conclusion of this paper is that it is not possible to discard one enzyme or one support using the results obtained with a different enzyme-support couple, as the changes are not just related to the support textural properties, but with specific enzyme-support interactions.

Acknowledgments

We gratefully recognize the support from the MINECO from Spanish Government, (project numbers CTQ2013-41507-R and CTQ2016-78587-R). The predoctoral fellowship for Miss Tacias-Pascacio (CONACyT, Mexico) is also gratefully recognized. Miss Tacias-Pascacio also thanks to Dr. Celina Lujan for her support in laboratory analyses. The authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) for kindly supplying some of the enzymes used in this research and PuroLite for the kind donation of the supports. The advice and support of Dr. A. Basso and Dr. S. Serban (PuroLite) are also gratefully recognized.

References

- [1] Felizardo P, Neiva Correia MJ, Raposo I, Mendes JF, Berkemeier R, Bordado JM. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage* 2006;26:487–94.
- [2] Kulkarni MG, Dalai AK. Waste cooking oil – an economical source for biodiesel: a review. *Ind Eng Chem Res* 2006;45:2901–13.
- [3] Predojević ZJ. The production of biodiesel from waste frying oils: a comparison of different purification steps. *Fuel* 2008;87:3522–8.
- [4] Sabudak T, Yildiz M. Biodiesel production from waste frying oils and its quality control. *Waste Manage* 2010;30:799–803.
- [5] Chhetri A, Watts K, Islam M. Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies* 2008;1:3–18.
- [6] Peterson CL, Hustrulid T. Carbon cycle for rapeseed oil biodiesel fuels. *Biomass Bioenergy* 1998;14:91–101.
- [7] Gerpen JV. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol* 2005;86:1097–107.
- [8] Vasudevan PT, Briggs M. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:421–30.
- [9] Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour Technol* 2008;99:3975–81.
- [10] Encinar JM, González JF, Rodríguez-Reinares A. Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel. *Ind Eng Chem Res* 2005;44:5491–9.
- [11] Wyse-Mason RR, Beckles DM. An investigation of restaurant waste oil characteristics for biodiesel production in Trinidad and Tobago. *Energy Sustain Dev* 2012;16:515–9.
- [12] Costa Neto PR, Rossi LFS, Zagonel GF, Ramos LP. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Quím Nova* 2000;23:531–7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017>.
- [13] Poppe JK, Matte CR, Peralba MDCR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Appl Catal A* 2015;490:50–6.
- [14] Tacias Pascacio VG, Rosales Quintero A, Torrestiana Sánchez B. Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Rev Int Contam Ambie* 2016;32:303–13.
- [15] Christopher LP, Hemanathan K, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. *Appl Energy* 2014;119:497–520.

- [16] Gog A, Roman M, Toşa M, Paizs C, Irimie FD. Biodiesel production using enzymatic transesterification – current state and perspectives. *Renew Energy* 2012;39:10–6.
- [17] Hsu A-F, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. *J Am Oil Chem Soc* 2004;81:749–52.
- [18] Lu J, Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. *Process Biochem* 2007;42:1367–70.
- [19] Soumanou MM, Bornscheuer UT. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:97–103.
- [20] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 2001;92:405–16.
- [21] Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal B* 2001;16:53–8.
- [22] Köse Ö, Tüter M, Aksoy HA. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresour Technol* 2002;83:125–9.
- [23] Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B* 2006;43:58–62.
- [24] Nelson LA, Foglia TA, Marmer WN. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* 1996;73:1191–5.
- [25] Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS, Mazaheri H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Appl Energy* 2013;104:683–710.
- [26] Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *J Mol Catal B* 2010;62:9–14.
- [27] Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew Sustain Energy Rev* 2015;44:182–97.
- [28] Alves JS, Vieira NS, Cunha AS, Silva AM, Zachia Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. *RSC Adv* 2014;4:6863–8.
- [29] Rodrigues RC, Ayub MAZ. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochem* 2011;46:682–8.
- [30] Chesterfield DM, Rogers PL, Al-Zani EO, Adesina AA. A novel continuous extractive reactor for biodiesel production using lipolytic enzyme. *Proc Eng* 2012;49:373–83.
- [31] Hajar M, Shokrollahzadeh S, Vahabzadeh F, Monazzami A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme Microb Technol* 2009;45:188–94.
- [32] Hama S, Tamalampudi S, Yoshida A, Tamadani N, Kuratani N, Noda H, et al. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochem Eng J* 2011;55:66–71.
- [33] Hama S, Yoshida A, Tamadani N, Noda H, Kondo A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: an engineering approach to separation of hydrophilic impurities. *Bioresour Technol* 2013;135:417–21.
- [34] Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. *Biotechnol Adv* 2015;33:511–25.
- [35] Dizge N, Keskinler B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass Bioenergy* 2008;32:1274–8.
- [36] Fedosov SN, Brask J, Pedersen AK, Nordblad M, Woodley JM, Xu X. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. *J Mol Catal B* 2013;85–86:156–68.
- [37] Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B* 2006;43:142–7.
- [38] Shieh CJ, Liao HF, Lee CC. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresour Technol* 2003;88:103–6.
- [39] Graebing NG, Martins AB, Lorenzoni ASG, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ, et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. *Biotechnol Prog* 2012;28:406–12.
- [40] Friedrich JLR, Peña FP, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ, Rodrigues RC. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *J Chem Technol Biot* 2013;88:1089–95.
- [41] Martins AB, Friedrich JLR, Cavalheiro JC, Garcia-Galan C, Barbosa O, Ayub MAZ, et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. *Bioresour Technol* 2013;134:417–22.
- [42] Séverac E, Galy O, Turon F, Pantel CA, Condoret J-S, Monsan P, et al. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. *Enzyme Microb Technol* 2011;48:61–70.
- [43] Poppe JK, Garcia-Galan C, Matte CR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *J Mol Catal B* 2013;94:51–6.
- [44] Hernández-Martín E, Otero C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresour Technol* 2008;99:277–86.
- [45] Wang Y, Wu H, Zong MH. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresour Technol* 2008;99:7232–7.
- [46] Du W, Xu Y-Y, Liu D-H, Li Z-B. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *J Mol Catal B* 2005;37:68–71.
- [47] Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochem Eng J* 2005;23:45–51.
- [48] Verdasco-Martín CM, Villalba M, dos Santos JCS, Tobajas M, Fernandez-Lafuente R, Otero C. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. *Biochem Eng J* 2016;111:75–86.
- [49] Villalba M, Verdasco-Martín CM, dos Santos JCS, Fernandez-Lafuente R, Otero C. Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an alcoholysis reaction. *Enzyme Microb Technol* 2016;90:35–44.
- [50] Modi MK, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresour Technol* 2007;98:1260–4.
- [51] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal B* 2002;17:133–42.
- [52] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 2000;77:355–60.
- [53] Zhao X, El-Zahab B, Brosnahan R, Perry J, Wang P. An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. *Appl Biochem Biotechnol* 2007;143:236–43.
- [54] Shah S, Sharma S, Gupta MN. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. *Energy Fuels* 2004;18:154–9.
- [55] Cesarini S, Pastor F, Nielsen P, Diaz P. Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process. *Sustain Basel* 2015;7:7884–903.
- [56] Cesarini S, Diaz P, Nielsen PM. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. *Process Biochem* 2013;48:484–7.
- [57] Verma ML, Puri M, Barrow CJ. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production. *Crit Rev Biotechnol* 2016;36:108–19.
- [58] Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv* 2015;33:435–56.
- [59] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. *Molecules* 2014;19:8995–9018.
- [60] Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev* 2013;42:6290–307.
- [61] DiCosimo R, McAuliffe J, Poulou AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev* 2013;42:6437–74.
- [62] Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chem Soc Rev* 2013;42:6262–76.
- [63] Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* 2013;42:6223–35.
- [64] Liese A, Hiltnerhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem Soc Rev* 2013;42:6236–49.
- [65] Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev* 2013;42:6406–36.
- [66] Secundo F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chem Soc Rev* 2013;42:6250–61.
- [67] Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv Synth Catal* 2011;353:2885–904.
- [68] Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett* 2009;31(11):1639–50.
- [69] Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* 2008;43(10):1019–32.
- [70] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1451–63.
- [71] Du W, Xu Y, Liu D. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol Appl Biochem* 2003;38:103–6.
- [72] Silva JA, Macedo GP, Rodrigues DS, Giordano RLC, Gonçalves LRB. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem Eng J* 2012;60:16–24.
- [73] Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;79:331–7.
- [74] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol* 2007;98:648–53.

- [75] Wang L, Du W, Liu D, Li L, Dai N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. *J Mol Catal B* 2006;43:29–32.
- [76] Lotti M, Pleiss J, Valero F, Ferrer P. Effects of methanol on lipases: molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnol J* 2015;10:22–30.
- [77] Cerveró JM, Álvarez JR, Luque S. Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. *Biomass Bioenergy* 2014;61:131–7.
- [78] Rodrigues RC, Pessela BCC, Volpato G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Ayub MAZ. Two step ethanolysis: a simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem* 2010;45:1268–73.
- [79] Ko C-H, Yeh K-W, Wang Y-N, Wu C-H, Chang F-C, Cheng M-H, et al. Impact of methanol addition strategy on enzymatic transesterification of jatropha oil for biodiesel processing. *Energy* 2012;48:375–9.
- [80] Tacias-Pascacio VG, Peirce S, Torrestiana-Sanchez B, Yates M, Rosales-Quintero A, Virgen-Ortiz JJ, et al. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv* 2016;6:100281–94.
- [81] Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 2015;71:53–7.
- [82] Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst – many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal Biotransform* 1998;16:181–204.
- [83] Gotor-Fernández V, Busto E, Gotor V. *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Adv Synth Catal* 2006;348:797–812.
- [84] Domínguez de María P, Carboni-Oerlemans C, Tuin B, Bargeman G, van der Meer A, van Gemert R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art. *J Mol Catal B* 2005;37:36–46.
- [85] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B* 2010;62:197–212.
- [86] Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J Mol Catal B* 2010;66:15–32.
- [87] Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J Mol Catal B* 2010;64:1–22.
- [88] Clausen K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *Eur J Lipid Sci Technol* 2001;103:333–40.
- [89] De Maria L, Vind J, Oxenbøll KM, Svendsen A, Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:290–300.
- [90] dos Santos JCS, Garcia-Galan C, Rodrigues RC, de Sant’Ana HB, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. *Process Biochem* 2014;49:1511–5.
- [91] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [92] British Standards Institution. Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME): determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (English version). London: British Standards Institution; Brussels: European Committee for Standardization; 2011.
- [93] Choe E, Min DB. Chemistry of deep-fat frying oils. *J Food Sci* 2007;72:77–86.
- [94] Qiao H, Zhang F, Guan W-T, Zuo J, Feng D. Optimisation of combi-lipases from *Aspergillus niger* for the synergistic and efficient hydrolysis of soybean oil. *Anim Sci J*. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12718>.
- [95] Poppe JK, Matte CR, Do Carmo Ruaro Peralba M, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipase. *Appl Catal A* 2015;490:50–6.
- [96] Alves JS, Vieira NS, Cunha AS, Silva AM, Záchia Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. *RSC Adv* 2014;4:6863–8.
- [97] Todeschini JKP, Aguiéiras ECG, Castro AMD, Langone MAP, Freire DMG, Rodrigues RC. Synthesis of butyl esters via ultrasound-assisted transesterification of macaúba (*Acrocomia aculeata*) acid oil using a biomass-derived fermented solid as biocatalyst. *J Mol Catal B*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.01.007>.
- [98] Rodrigues RC, Volpato G, Wada K, Ayub MAZ. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *J Am Oil Chem Soc* 2008;85:925–30.
- [99] Lozano P, García-Verdugo E, Bernal JM, Izquierdo DF, Burguete MI, Sánchez-Gómez G, et al. Immobilised lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the continuous synthesis of biodiesel in scCO₂. *ChemSusChem* 2012;5:790–8.
- [100] Lozano P, Bernal JM, Piamtongkam R, Fetzer D, Vaultier M. One-phase ionic liquid reaction medium for biocatalytic production of biodiesel. *ChemSusChem* 2010;3:1359–63.
- [101] Lozano P, Bernal JM, Vaultier M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel* 2011;90:3461–7.

5.4. Optimización de las condiciones de operación de la catálisis química y enzimática para la producción de biodiésel

La producción industrial del biodiésel es llevada a cabo por transesterificación homogénea alcalina (KOH o NaOH) de aceites vegetales comestibles y metanol. Esto es debido a los altos rendimientos en cortos tiempo de reacción y a la excelente calidad del biodiésel que se obtiene con esta catálisis.

La principal desventaja del biodiésel es su alto costo, derivado de las materias primas que se utilizan en su proceso de producción. Para superar este inconveniente se ha propuesto el uso materias primas alternas, como las grasas y aceites residuales de la industria alimentaria, las cuales son mucho menos costosas que los aceites vírgenes. Sin embargo, esta materia prima afecta seriamente a la catálisis alcalina convencional, ya que contiene ácidos grasos libres y humedad, que al reaccionar con el catalizador conducen a la formación de jabón, disminuyendo el rendimiento de metil ésteres.

Existen otros tipos de catálisis que pudieran superar los inconvenientes que presenta la catálisis homogénea alcalina; dentro de estas pueden mencionarse la catálisis ácida homogénea y heterogénea, la alcalina heterogénea y la enzimática. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue comparar de forma sistemática y en condiciones óptimas de operación, el desempeño de los catalizadores químicos más utilizados en la producción de biodiésel (KOH, CaO y H₂SO₄) y el del biocatalizador TLL-octadecil metacilato (desarrollado en este trabajo), para poder identificar cuál de ellos genera los mejores resultados, cuando se usa como materia prima una mezcla de grasas y aceites residuales.

La metodología, resultados, discusión y conclusión de este trabajo, está descrita en el manuscrito: Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization.

Manuscrito 5: Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization.

Fuel (enviado).

Revista: Fuel

ISSN: 0016-2361

Editorial: Elsevier

País: Países Bajos

Factor de impacto en 2017: 4.6

1 **Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of**
2 **biodiesel after RMS optimization**

3
4 Veymar G. Tacias-Pascacio^a, Beatriz Torrestiana-Sánchez^a, Lucas Dal Magro^b, Jose J.
5 Virgen-Ortíz^c, Francisco J. Suárez-Ruíz^d, Rafael C. Rodrigues^{b,*}, and Roberto Fernandez-
6 Lafuente^{e,*}

7
8 ^a Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz,
9 Calzada Miguel A. de Quevedo 2779, 91897 Veracruz, México.

10 ^b Biocatalysis and Enzyme Technology Lab, Institute of Food Science and Technology,
11 Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090,
12 Porto Alegre, RS, Brazil.

13 ^c CONACYT - Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) -
14 Consorcio CIDAM, Km. 8 Antigua Carretera a Pátzcuaro s/n, 58341 Morelia, Michoacán,
15 México.

16 ^d Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana Km. 1080, 29050 Tuxtla
17 Gutiérrez, Chiapas, México.

18 ^e Instituto de Catálisis y Petroleoquímica - CSIC, Cantoblanco, Marie Curie 2, 28049
19 Madrid, Spain

20
21 *Corresponding authors

22 E-mail address: rfl@icp.csic.es (R. Fernández-Lafuente) and rafaelcrodrigues@ufrgs.br
23 (R.C. Rodrigues)

24

25

26 **Abstract**

27 This paper shows the direct comparison of 4 different catalyst (homogenous alkaline
28 (KOH), heterogeneous alkaline (CaO), homogenous acid (H₂SO₄) and a new biocatalyst
29 (lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) immobilized on octadecyl methacrylate)) in
30 the production of biodiesel from cooking oils. The reactions for each catalyst were
31 optimized using response surface statistical methodology, considering as main parameters
32 substrates molar ratio, percentage of catalyst and reaction time, whereas for enzymatic
33 catalysis instead reaction time, we studied water concentration. Alkaline homogenous
34 catalysis was found to be the most effective, as expected from literature. However, for first
35 time, the new biocatalyst from TLL is just around one order of magnitude under the
36 homogenous catalysis and surpassed the heterogeneous catalysis or the acid catalysis
37 (similar yields in 6 h versus the 1 h of the alkaline catalyst). Moreover, the reaction
38 product using the biocatalytic approach was much cleaner and less energy demanded than
39 the other catalytic approaches. From our view, this is the first report where biocatalysis
40 become near to the conventional catalysis in the production of biodiesel.

41 **Key words:** wasted cooking oils, optimization of the biocatalysts, response surface
42 methodology, alkaline catalysis, acid catalysis, biodiesel.

43

44 **1. Introduction**

45

46 Biodiesel is defined as mono alkyl esters of long chain fatty acids derived from natural
47 renewable materials, such as vegetable oils or fats and they are mainly used as combustible
48 for engines of vehicles [1]. The advantages of biodiesel compared to standard combustible
49 are many: it is not toxic, biodegradable, and proceeds from renewable raw materials, it
50 presents physico-chemical features near to those of standard diesel and it is miscible with it
51 [2]. It has even some technical advantages compared to the diesel: biodiesel has inherent
52 lubricant potential, higher inflammation temperature, negligible sulfur content and lower
53 full emissions [3-7].

54

55 Biodiesel is produced via esterification of free fatty acids or by transesterification of an oil
56 or fat with a small alcohol (methanol or ethanol) in presence of a catalyst [8-13]. The
57 reaction is catalyzed using chemical (acid or basic) [6, 14-20], or enzymatic (mainly
58 lipases) catalysis [21-28]. These catalysts can be divided into two categories, homogeneous
59 and heterogeneous types. Homogeneous catalyst remains in the same (liquid) phase to that
60 of the reactants during transesterification, and the heterogeneous catalyst remains in
61 different phase (i.e. solid, immiscible liquid or gaseous) to that of reactants [3, 29].
62 Selection of a catalyst from these groups depends on the type of feedstock, operating
63 conditions, required catalyst activity, cost and availability [30, 31].

64

65 The use of sunflower, soya or colza oils is preferred because they permit to produce a
66 biodiesel with properties near to that of standard diesel. However, these are food materials
67 and shortly was recognized that they were not a good selection for biodiesel production

68 considering the social problems. Furthermore, the biodiesel from these food oils was more
69 expensive than diesel [14, 15, 32-35].

70

71 Cooking used oils are much cheaper, in some instances are even free as they are a residue
72 that cannot be posted in the environment without control. That way, the use of these
73 wasted oils in biodiesel is a good alternative to the use of fresh oils, as solve two
74 environmental problems: the use of nonrenewable diesel and the disposal to the
75 environment of wasted materials [15, 19, 36-37]. The use of this material has some
76 problems, *e.g.*, the physic-chemical features of the oil differ from that of the fresh oils [38].
77 These depends on the kind of oils, time and temperature of use, kind of cooked food,
78 exposition to air or other oxidants, the storage time and conditions, etc. These factors
79 determine the contaminants that will alter the final properties of the oil [18, 39-40], and
80 this may affect the yields and quality of the final product. The presence of water in the
81 cooked product may favored the release of free fatty acids at the high temperature of
82 cooking, therefore free fatty acids, monoglycerides or diglycerides may be presented [41,
83 42].

84

85 The most utilized catalysts are the homogeneous alkaline ones like KOH, NaOH or sodium
86 metoxyde (NaOCH_3) [1, 43-47]. The reactions using homogeneous alkaline catalysis may
87 be performed at moderate temperature and pressure, with high conversion in minimal time
88 because of the high catalytic activity of these catalysts [44, 48-49]. The principal limitation
89 of this process is its high sensitivity to the purity of reactants, mainly free fatty acid and
90 water content of the sample. The presence of a high percentage of free fatty acids is not
91 compatible with these catalysts, as they neutralize the catalyst and produce soap. This not
92 only inactive the catalyst, also becomes a problem for the downstream of the final product

93 by different reasons [8, 11, 50]. The homogeneous acid catalysts have not this problem, but
94 their activities are lower, being the reaction around 4000 times slower, and require a higher
95 molar ratio of substrates to reach good yields [39, 51]. These catalysts are not inactivated
96 by the presence of free fatty acids, in fact, they simultaneously catalyze esterification and
97 esterification reactions; however, acid transesterification is especially sensitive to the
98 presence of water [52]. Sulfuric acid, hydrochloric acid, and sulfonic acid are the most
99 common compounds used as acid catalysts [29]. They give high yields and the separation
100 of reaction products is simple, yielding a glycerin of high quality [49, 53-56]. However, a
101 high concentration of catalysts, a high temperature and a high excess of alcohol and special
102 reactors (able to stand under this acid conditions) are required, and even in that way the
103 reaction is far slower than using the alkaline catalysis [39, 57-58]. Finally, if some catalyst
104 is presented on the final product, there are risks of corrosion of the motor [59].

105

106 Heterogeneous catalysis (acid or alkaline) may solve some of the previous problems,
107 always that there is not release of the active catalyst to the medium. They can facilitate the
108 separation of the final product from the catalyst, preventing some of the problems listed
109 above and enabling its simple reuse in new reaction cycles [60]. Among the most used
110 alkaline heterogeneous catalyst we can remark alkaline earths, hydrocalcites, MgO or CaO
111 [61-64]. The last one is widely used as solid basic catalyst because has many advantages
112 such as long catalyst lifetimes, high activity, low environmental impacts due to its lower
113 solubility in methanol and requires only moderate reaction conditions [65-67]. In the case
114 of acid heterogeneous catalysts, the most used are Nafion-NR50, sulfated zirconia and
115 tungstated zirconia [29, 68-69]. Chemical heterogeneous catalysis has also some
116 disadvantages like raising of diffusion problems [66, 70]; possible active component
117 lixiviation into the reaction mixture (thus metal ions would still have to be removed from

118 the biodiesel by water washing) [29, 71], and poisoning of the catalyst by contact with
119 room air due to the adsorption of CO₂ and H₂O at the surface of the solid (*e.g.*, carbonates
120 or hydroxyls groups) [72]. Thus, chemical catalysis requires a high energy demand, and
121 produces many secondary products, that may depend on the oil source and previous
122 treatment [24, 73].

123

124 Biocatalysis raised as a good alternative: enzymes are less sensible to the oil quality, the
125 reaction conditions are very mild, biocatalysts can catalyze either esterification or
126 transesterification, the energy demand is low, the reaction does not produce by-products,
127 and the global process generates low amount of effluents in the product purification [74-
128 80]. However, they have many limitations: the price is much higher than that of NaOH or
129 KOH, the reaction rates are slower than that of the alkaline catalysis, suffer from
130 inhibition/inactivation derived from the presence of glycerin or even the alcohol substrate,
131 and they presented a moderate stability under reaction conditions [13, 81-84]. Lipases are
132 the enzymes more utilized for this goal. They can be used using solvent free systems [85,
133 86], or different cosolvents, like organic solvents, ionic liquids or supercritical fluids [87-
134 91] in a diversity of reactor configurations [92]. The solvents decrease the diffusion
135 limitations [93-96], and permit higher reaction rates.

136

137 The lipase performance in these reactions may be improved by different ways. For
138 example, ultrasounds have proved to avoid the promotion of water layers that can drive to
139 the enzyme inactivation [97-99]. Recently, the concept of combilipase has been launched,
140 suggesting that as oils are heterogeneous substrates, more than an “optimal lipase” for one
141 oil, should be better to use a collection of different lipases to improve the reaction rates
142 [82, 92, 100]. Finally, lipases may be used in free form or in immobilized one. Really, in

143 anhydrous media the enzyme will be not as individual enzyme molecules, but forming
144 aggregates, whose properties may depend on the purity, additives, etc., of the enzyme
145 extract. This may be solved using a proper immobilization protocol. Together to facilitate
146 the enzyme reuse, it has been shown that a proper immobilization of the lipase may have
147 many advantages: enzyme stability or activity may be increased; the use of an hydrophobic
148 support may reduce the adsorption of glycerin in the enzyme environment [101-104], the
149 enzyme purity may be increase [105], the resistance to inhibitor or distorting conditions
150 may increase, etc. [106-109]. Lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) is among the
151 most utilized in biocatalysis [110].

152

153 Very recently, we have shown how the lipase immobilized in octadecyl methacrylate beads
154 [111] may greatly improve the performance of this enzyme in the production of biodiesel
155 [112], in fact the results overtake those obtained with any commercial enzyme preparation.

156

157 This new paper compares for first time the different kind of chemical catalysts (KOH, CaO
158 and H₂SO₄) with this new biocatalyst from TLL, in the production of biodiesel from
159 cooking used oil. Usually, the enzymatic catalysis is really very far from the alkaline one,
160 but the good behavior of the new biocatalyst may open new opportunities. Response
161 surface methodology has been used to optimize each of the catalysis, as the covariance of
162 the effects of the different variables in this reaction may be many and difficult to detect
163 using individual optimization [27, 82, 113-115]. That way, the comparison between the
164 different strategies will be quite fair. The parameter that we want to optimize is the methyl
165 ester yields. To this goal, we will study the most relevant variables in the reaction: for
166 chemical catalysis were percentage of catalyst, methanol to oil molar relation and reaction

167 time, whereas for enzymatic catalysis instead reaction time, we studied water
168 concentration.

169

170 **2. Materials and methods**

171

172 *2.1 Materials*

173 Lipase from *T. lanuginosus* (TLL) and octadecyl methacrylate support were a kind gift
174 from Novozymes (Spain) and Purolite® ECR Enzyme Immobilization Resins (Wales,
175 UK), respectively. TLL was immobilized on octadecyl methacrylate as described elsewhere
176 [111]. Feedstock was a mix of waste cooking oils and fats (WCOF), collected from
177 different restaurants of Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico. The physicochemical
178 characteristics of the feedstock are presented in Table 1 [116]. Methyl heptadecanoate
179 from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) has been used as an internal standard. Sulfuric
180 acid, sodium hydroxide and calcium oxide powder catalysts were purchased from J.T.
181 Baker (Mallindckrodt Maker, Inc. Phillipsburg, EUA). Methanol, heptane and other
182 chemicals were of analytical or HPLC grade.

183

184 *2.2. Chemical transesterification reactions*

185 *2.2.1. Acid and alkaline homogeneous catalysis*

186 The transesterification reaction was carried out in a 125 mL flat-bottom flasks connecting
187 with a reflux condenser using tap water to condense methanol vapor. The mixture was
188 agitated by using a magnetic stirrer at 300 rpm. The flasks were preheated at 65°C for 0.5h,
189 to eliminate moisture, and then 30 g of WCOF was added. When the WCOF reached 65°C,
190 the methanol and the catalyst (KOH or H₂SO₄) were added in the amount established in
191 the experimental design, closed and the stirring started, taking this moment as time zero of

192 the reaction. The reaction temperature was kept at $60^{\circ}\text{C} \pm 2$, during the time indicate in the
193 experimental design.

194 After certain times, the mixture was poured into a separating funnel. The upper phase
195 containing the methyl esters was separated by gravity. The glycerol, excess of methanol
196 and other products were in the lower layer and were decanted. The ester layer was purified
197 by successive rinses with distilled water at 60°C each until the washings were neutral.
198 After that the methyl ester layer was dried in an oven at 40°C during 24 h, and finally
199 analyzed by gas chromatography.

200

201 *2.2.2. Alkaline heterogeneous catalysis*

202 The transesterification reaction was carried out in a 125 mL flat-bottom flasks connecting
203 with a reflux condenser using tap water to condense methanol vapor. The mixture was
204 agitated by using a magnetic stirrer. The flasks were preheated to 65°C for 0.5 h, to
205 eliminate moisture, and then the amounts of methanol and CaO (previously calcined at
206 900°C during 1.5 h)(Kouzu, Kasuno, Tajika, Yamanaka, & Hidaka, 2008) according to the
207 experimental design were added (Table 2), in order to activate the catalyst by contact with
208 the methanol. The mixture was agitated during 2 h at room temperature; after that 30 g of
209 WCOF was added, and the moment when the reaction medium reached 60°C , it was as
210 time zero of the reaction. The reaction temperature was kept at $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$, during the time
211 indicate in the experimental design.

212 After a certain time, the reaction mixture was left cooling, followed by centrifugation
213 (4000 rpm, 20 min, 4°C) in order to remove the catalyst. The upper phase containing the
214 methyl esters was separated and purified by successive rinses with distilled water each
215 until the washings were neutral. After that the methyl ester layer was the dried in an oven
216 at 40°C during 24 h, and then analyzed by gas chromatography.

217

218 *2.2.3. Enzymatic transesterification reactions*

219 Enzymatic transesterification reactions were carried out with the biocatalyst TLL-octadecyl
220 methacrylate in solvent free system with stepwise addition of methanol. The first portion of
221 methanol and the whole amount of oil were added at the start of the reaction, and then 1/3
222 molar equivalent was added each 20 minutes. Transesterification has taken place in 50-mL
223 Erlenmeyer flasks containing 2 g WCOF and varying amounts of biocatalyst (previously
224 dried at 40°C for 24 h), methanol and water, according to the experimental design (Table
225 2). The reactions were carried out at 30°C under orbital stirring at 350 rpm. After 6 h of
226 reaction time, 5 mL of distilled water was added to the samples followed by centrifugation
227 (4000 rpm, 15 min, 4 °C). The upper phase, containing the methyl esters, was analyzed by
228 gas chromatography as described below.

229

230 *2.3. Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography*

231 Fatty acid methyl esters (FAME) content was determinate by gas chromatography in an
232 Agilent Technologies gas chromatograph (model 5975) equipped with a flame ionization
233 detector (FID) and BD-EN14103 capillary column (30 m x 320 µm x 0.25 µm). Nitrogen
234 was used as carrier gas at a flow rate of 2.0 mL min⁻¹. The split ratio was 50:1. Injector and
235 detector temperatures were 250 °C and 300 °C, respectively.

236 The temperature program was as follows: starting at 120 °C for 0 min and then heating to
237 220 °C at 4 °C min⁻¹, holding at 220 °C for 2 min, followed by heating from 220 to 250
238 °C at 15 °C min⁻¹ (hold for 10 min). The amount of sample injected was 1 µL, and total
239 time of the analysis was 39 min. 2 mL of an internal standard stock solution of methyl
240 heptadecanoate in heptane (10 mg/mL) was mixed with 100 mg of each sample accurately
241 weighed. An analytical standard FAME mi (C4–C24) from Supelco was used to identify

242 the peaks at different retention times. The FAME content was calculated using the
243 compensated normalization method with internal standardization, based on the European
244 standard EN 14103 [117].

245

246 *2.4. Experimental design*

247 A Box-Benhen Desing (B-B design) was employed to obtain the optimum conditions for
248 biodiesel synthesis for each catalyst. Table 2 shows the 15 treatments of the three
249 variables, each at three levels. For chemical catalysts, the variables were substrate molar
250 ratio, catalyst concentration and reaction time, while for enzymatic catalysis the reaction
251 time was fixed in 6 h and substituted in the B-B design by added water. Substrate molar
252 ratio varied from 4:1 to 8:1 for alkaline, 30:1 to 90:1 for acid, 6:1 to 12:1 for
253 heterogeneous and from 3:1 to 9:1 for enzymatic catalysts. Catalyst concentration varied
254 from 0.5 to 1 % for alkaline, 1 to 5 % for acid and heterogeneous and from 5 to 15 % for
255 enzymatic catalysts. Reaction time varied from 0.5 to 1.5 h for alkaline, 36 to 60 h for acid
256 and 1 to 3 h for heterogeneous. Added water varied from 0 to 10 % for enzymatic catalysts.
257 In each case, the percentage yield conversion was determined. Second-order polynomial
258 equation for the variables was as follows:

259

$$260 \quad Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1),$$

261

262 where Y is the response variable, β_0 the constant, β_i the coefficient for the linear effect, β_{ii}
263 the coefficient for the quadratic effect, β_{ij} the coefficient for the interaction effect, and X_i
264 and X_j the coded level of variable x_i and x_j . The above quadratic equation was used to plot
265 surfaces for the variables.

266

267 2.5. Statistical analysis

268 The experimental design and results analysis were carried out using Statistica 12.0
269 (Statsoft). The statistical analysis of the model was performed in the form of analysis of
270 variance (ANOVA). The significance of the regression coefficients and the associated
271 probabilities, P(t), were determined by Student's t -test; the second-order model equation
272 significance was determined by Fisher's F-test. The variance explained by the model is
273 given by the multiple determination coefficients, R². For each variable, the quadratic
274 models were represented as contour plots (2D).

275

276 3. Results and discussion

277

278 3.1. Optimization of reaction conditions for biodiesel synthesis

279 In order to compare the different catalysts (alkaline, acid, heterogeneous and biocatalyst),
280 the reactions parameters substrate molar ratio, catalyst concentration and reaction time
281 were analyzed using a Box-Behnken design (B-B-design). In the case of enzymatic
282 catalyst, the parameter "reaction time" was changed by the parameter "added water", and
283 the reaction time was fixed at 6 h. The results for the experimental design were presented
284 in Table 2. In general, for all catalysts the biodiesel yields varied from 60 to 80 % in the
285 range of studied conditions. For alkali and acid catalysts, the highest reaction yield was
286 obtained in the Run 4 and 15, respectively, when the catalyst concentration was in its
287 highest level. On the other hand, for heterogeneous basic catalyst the highest yield was in
288 the Run 1, when the catalyst concentration was in its lower level, while for enzymatic
289 synthesis the highest yield was when the catalyst was in the center level (Run 14).

290 The results were submitted to statistical analysis and the adequacy of the proposed model
291 was done using Fisher's statistical test for analysis of variance (ANOVA). The computed

292 F-value for each response was 133.34, 41.01, 18.08 and 12.55, respectively for alkali, acid,
 293 heterogeneous and enzymatic catalyzes. For all models p-value was $p < 0.0001$, showing
 294 the models presented a high significance. Additionally, the determination coefficient (R^2)
 295 for the models was $R^2 > 0.85$, implying that the sample variation of at least 85% for
 296 biodiesel production is attributed to the independent variables, and can be explained by the
 297 models. The second-order polynomial order for each response is presented in the equations
 298 2 to 5.

299

$$300 \quad Y_1 = 73.66 + 6.88X_1 + 6.53X_2 + 0.62X_3 + 2.48X_1^2 + 2.29X_2^2 - 0.41X_3^2 - 3.61X_1X_2 - 0.93X_1X_3$$

$$301 \quad - 0.62X_2X_3 \quad (2)$$

$$302 \quad Y_2 = 77.38 + 1.65X_1 + 11.33X_2 + 9.05X_3 + 1.02X_1^2 + 2.70X_2^2 + 2.05X_3^2 - 3.91X_1X_2 -$$

$$303 \quad 1.48X_1X_3 - 8.59X_2X_3 \quad (3)$$

$$304 \quad Y_3 = 68.12 - 0.58X_1 - 2.77X_2 + 1.90X_3 + 0.94X_1^2 + 0.49X_2^2 + 0.76X_3^2 - 3.55X_1X_2 - 2.28X_1X_3 +$$

$$305 \quad 3.26X_2X_3 \quad (4)$$

$$306 \quad Y_4 = 70.95 + 1.43X_1 + 1.93X_2 + 3.00X_3 + 0.15X_1^2 + 0.78X_2^2 + 1.34X_3^2 - 0.12X_1X_2 +$$

$$307 \quad 1.75X_1X_3 - 3.75X_2X_3 \quad (5)$$

308

309 Where Y_1 , Y_2 , Y_3 , and Y_4 were the biodiesel yield for the reaction catalyzed by alkali,
 310 acid, heterogeneous and enzymatic catalysts, respectively. X_1 is the coded values of
 311 substrate molar ratio, X_2 the coded values of catalyst concentration and X_3 is coded values
 312 of reaction time in the alkali, acid and heterogeneous catalyzes or added water for the
 313 enzymatic catalysis.

314

315 *3.2. Effects of parameters in the biodiesel reaction*

316 Linear, quadratic and interaction parameters for the variables were presented in
317 Table 3. It can be observed that for each catalyst the response is different concerning to the
318 variables. Among the linear effects, only substrate molar ratio was not statistically
319 significant at 5 % concentration of the heterogeneous basic catalysis. The effect of
320 substrate molar ratio (methanol/oil) was positive and this fact reached the highest
321 difference for free alkali catalysis, indicating that increasing the methanol concentration
322 lead to an increase in the reaction yield. As expected, the catalyst concentration (X_2) was
323 statistically significant for all studied catalysts. However, its effect was different for each
324 response. While for alkali, acid and enzymatic catalyses the effect of catalyst concentration
325 is positive, i.e., increasing catalyst concentration led to a higher yield, for heterogeneous
326 catalysis, its effect was negative, which means that as raising the CaO concentration the
327 reaction yield decrease. This behavior can be easily observed in the Figure 1c, in the
328 surface plots of catalyst concentration and reaction time for heterogeneous catalyst. At the
329 highest level of reaction time (+1, 3 h) the effect of catalyst concentration was negligible.
330 However, at the lowest level of reaction time (-1, 1 h), increasing the catalyst concentration
331 from the level -1 (1 %) to level +1 (5 %), the reaction yield decreased from 72 to 60 %.
332 This negative effect of the amount of CaO could be explained because during the used
333 conditions the particles tended to aggregate and went to the bottom of the reactor. This will
334 greatly increase diffusion limitations and drive to a worse performance of the catalyst
335 when higher amounts were used. In the acid catalysis, catalyst concentration and reaction
336 time were the highest linear effects among all variables and catalysts studied. This is also
337 reflected in the interaction effect (X_2X_3). In Figure 1b, it is clear that the increase of both
338 variables lead to the reaction yield to its maximum.

339 In the contour plots of Figures 1-4, it was plotted the two variables that presented
340 the highest linear effect for each response, fixing the third variable in the central point.

341 These plots helps to understand the results of the effects from Table 3. It is important to
342 remark that for all tested catalysts, the variable X_2 (catalyst concentration) was always
343 between the two most important variables, and as stated above, only for heterogeneous
344 catalysis its effect was negative.

345

346 *3.3. Optimal conditions and model validation*

347 The optimal conditions for the reactions catalyzed by the four studied catalysts
348 were determined by a desirability function (which is a linear combination of four
349 responses) using the response desirability profiling tool from the software Statistica 12.
350 The optimal conditions for the alkali-catalyzed reaction were: substrate molar ratio, 7.2:1
351 (methanol:oil); catalyst concentration, 1.27 %; reaction time, 1 h. Under these conditions
352 the reaction yield predicted by the model was 83.94 %. For the acid-catalyzed reaction the
353 optimal conditions were: substrate molar ratio, 41.7:1 (methanol:oil); catalyst
354 concentration, 5 %; reaction time, 50 h. Under these conditions the reaction yield predicted
355 by the model was 91.75 %. For the basic heterogeneous-catalyzed reaction, the optimal
356 conditions were: substrate molar ratio, 12:1 (methanol:oil); catalyst concentration, 1 %;
357 reaction time, 1 h. Under these conditions the reaction yield predicted by the model was
358 76.04 %. And for the enzymatic-catalyzed reaction the optimal conditions were: substrate
359 molar ratio, 9:1 (methanol:oil); catalyst concentration, 7 %; added water, 10 % and 6 h of
360 reaction time Under these conditions the reaction yield predicted by the model was 77.78
361 %.

362 The reactions were carried out under the optimal conditions for each catalyst. The
363 results for the reaction yield in the optimal condition for each response were: 84 % for
364 alkali catalysis, 91 % for acid catalysis, 75 % for heterogeneous catalysis and 78 % for

365 enzymatic catalysis. These results were close to those predicted by the model showing a
366 good correlation of the experimental results and the prediction model (Figure 5).

367

368 The results points above may be the first reports where an enzymatic biocatalyst may
369 compete with standard catalysts, in fact clearly overpassing the results achieved using acid
370 catalyst in term of reaction time and approaching to the values obtained by the
371 homogeneous basic catalyst. It should consider that from the 7% of biocatalysts utilized,
372 only 0.24 % corresponds to the lipase. This is due to the very good properties of the new
373 biocatalyst of TLL immobilized on octadecyl methacrylate.

374 Figure 6 shows the aspect of the reaction media using the 4 catalyst. Only the biocatalyst
375 maintained a transparent look of the reaction mixture, the other give a very dark color. This
376 is a clear example of the very good performance of biocatalysis compared to the chemical
377 catalyst.

378

379 **4. Conclusion**

380 This paper shows for first time how a biocatalyst can compete with classical chemical
381 catalyst in the production of biodiesel, in terms of reaction rate, but it seems that the
382 biocatalyst used in this paper is closing the gap. The biocatalyst utilized in this paper offers
383 the advantage of low T and the lack of by-products, as shown by the aspect of the reaction
384 mixtures.

385 Further improvements may be accomplished using different strategies, as stated in
386 introduction. For example, the use of ultrasounds to get a perfect mixing of the reactants
387 and stirring inside the particle may further improve the results, the use of combi-lipases
388 may permit to eliminate some compounds that can inhibit TLL, and even to find a better

389 support that the currently utilized. Hopefully, some further improvements may help to
390 locate biocatalysis in the industrial production of biodiesel.

391

392 **Acknowledgements**

393 We gratefully recognize the support from the MINECO from Spanish Government,
394 (project numbers CTQ2013-41507-R and CTQ2016-78587-R). The predoctoral fellowship
395 for Miss Tacias-Pascacio (CONACyT, Mexico) is also gratefully recognized. Miss Tacias-
396 Pascacio also thanks to Dr. Celina Lujan for her support in laboratory analyses. The
397 authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) for kindly supplying the
398 enzymes used in this research and Purolite for the kind donation of the supports. The
399 advice and support of Dr. A. Basso and Dr. S. Serban (Purolite) are also gratefully
400 recognized. The help o from Dr Miguel Ángel García Alvarado (Instituto Tecnológico de
401 Veracruz) is gratefully thanked.

402

403 **References**

404

- 405 [1] Saleh J, Tremblay AY, Dubé MA. Glycerol removal from biodiesel using
406 membrane separation technology. *Fuel* 2010;89(9):2260-6.
- 407 [2] Tomasevic AV, Siler-Marinkovic SS. Methanolysis of used frying oil. *Fuel Process
408 Technol* 2003;81(1):1-6.
- 409 [3] Atadashi IM, Aroua MK, Aziz AA. High quality biodiesel and its diesel engine
410 application: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2010;14(7):1999-2008.
- 411 [4] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of
412 oils. *J Biosci Bioeng* 2001;92(5):405-16.
- 413 [5] Moser BR. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell Dev
414 Biol-Plant* 2009;45(3):229-66.
- 415 [6] Phan AN, Phan TM. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel*
416 2008;87(17):3490-6.
- 417 [7] Yusaf T, Al-Zuhair S, Al-Atabi M. Performance of diesel engine using an emulsion
418 of biodiesel-conventional diesel fuel. *Strojnícky casopis – J Mech Eng*
419 2005;56:137-42.
- 420 [8] Gerpen JV. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol*
421 2005;86(10):1097-107.
- 422 [9] Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic, and
423 energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci
424 USA* 2006;103(30):11206-10.
- 425 [10] Ma F, Hanna MA. Biodiesel production: a review. *Technology* 1999;70(1):1-15.
426 *Bioresour Technol* 1999;70(1):1-15.

- 427 [11] Meher LC, Vidya Sagar D, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by
428 transesterification - a review. *Renew Sust Energ Rev* 2006;10(3):248-68.
- 429 [12] Poppe JK, Matte CR, Peralba MdCR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub
430 MAZ. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using
431 mixtures of immobilized lipases. *Appl Catal A-Gen* 2015;490:50-6.
- 432 [13] Varanda MG, Pinto G, Martins F. Life cycle analysis of biodiesel production. *Fuel*
433 *Process Technol* 2011;92(5):1087-94.
- 434 [14] Canesin EA, de Oliveira CC, Matsushita M, Dias LF, Pedrão MR, de Souza NE.
435 Characterization of residual oils for biodiesel production. *Electron J Biotechnol*
436 2014;17(1):39-45.
- 437 [15] Dias JM, Alvim-Ferraz MCM, Almeida MF. Production of biodiesel from acid
438 waste lard. *Bioresour Technol* 2009;100(24):6355-61.
- 439 [16] Dias JM, Alvim-Ferraz MCM, Almeida MF, Méndez Díaz JD, Sánchez Polo M,
440 Rivera Utrilla J. Biodiesel production using calcium manganese oxide as catalyst
441 and different raw materials. *Energy Conv Manag* 2013;65:647-53.
- 442 [17] Ehsan M, Chowdhury MTH. Production of biodiesel using alkaline based catalysts
443 from waste cooking oil: A case study. *Procedia Eng* 2015;105:638-45.
- 444 [18] Encinar JM, González JF, Rodríguez-Reinares A. Biodiesel from used frying oil.
445 Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel. *Ind Eng Chem*
446 *Res* 2005;44(15):5491-9.
- 447 [19] Predojević ZJ. The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of
448 different purification steps. *Fuel* 2008;87(17):3522-8.
- 449 [20] Sabudak T, Yildiz M. Biodiesel production from waste frying oils and its quality
450 control. *Waste Manage* 2010;30(5):799-803.

- 451 [21] De Paola MG, Ricca E, Calabrò V, Curcio S, Iorio G. Factor analysis of
452 transesterification reaction of waste oil for biodiesel production. *Bioresour Technol*
453 2009;100(21):5126-31.
- 454 [22] Fedosov SN, Brask J, Pedersen AK, Nordblad M, Woodley JM, Xu X. Kinetic
455 model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase
456 B. *J Mol Catal B- Enzym* 2013;85:156-68.
- 457 [23] Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed
458 oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J*
459 *Mol Catal B- Enzym* 2006;43(1):58-62.
- 460 [24] Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel:
461 Optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B-Enzym* 2006;43(1):142-7.
- 462 [25] Rodrigues J, Canet A, Rivera I, Osório NM, Sandoval G, Valero F, et al. Biodiesel
463 production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial immobilized
464 heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases. *Bioresour Technol*
465 2016;213:88-95.
- 466 [26] Shah S, Gupta MN. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in
467 a solvent free system. *Process Biochem* 2007;42(3):409-14.
- 468 [27] Shieh CJ, Liao HF, Lee CC. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response
469 surface methodology. *Bioresour Technol* 2003;88(2):103-6.
- 470 [28] Tupufia SC, Jeon YJ, Marquis C, Adesina AA, Rogers PL. Enzymatic conversion
471 of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Process Technol* 2013;106:721-6.
- 472 [29] Abbaszaadeh A, Ghobadian B, Omidkhah MR, Najafi G. Current biodiesel
473 production technologies: A comparative review. *Energy Conv Manag* 2012;63:138-
474 48.

- 475 [30] Endalew AK, Kiros Y, Zanzi R. Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel
476 production from vegetable oils. *Biomass Bioenerg* 2011;35(9):3787-809.
- 477 [31] Helwani Z, Othman MR, Aziz N, Kim J, Fernando WJN. Solid heterogeneous
478 catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review. *Appl*
479 *Catal A-Gen* 2009;363(1):1-10.
- 480 [32] Ataya F, Dubé MA, Ternan M. Acid-catalyzed transesterification of canola oil to
481 biodiesel under single- and two-phase reaction conditions. *Energy Fuels*
482 2007;21(4):2450-9.
- 483 [33] Canakci M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks.
484 *Bioresour Technol* 2007;98(1):183-90.
- 485 [34] Leung DY, Guo Y. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization
486 for biodiesel production. *Fuel Process Technol* 2006;87(10):883-90.
- 487 [35] Zhang Y, Dubé MA, McLean DD, Kates M. Biodiesel production from waste
488 cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol*
489 2003;89(1):1-16.
- 490 [36] Chhetri A, Watts K, Islam M. Waste cooking oil as an alternate feedstock for
491 biodiesel production. *Energies* 2008;1(1):3.
- 492 [37] Issariyakul T, Kulkarni MG, Dalai AK, Bakhshi NN. Production of biodiesel from
493 waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Process Technol*
494 2007;88(5):429-36.
- 495 [38] Costa Neto PR, Rossi LFS, Zagonel GF, Ramos LP. Produção de biocombustível
496 alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em
497 frituras. *Quím Nova* 2000;23(4):531-7. [http://dx.doi.org/10.1590-S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017)
498 [40422000000400017](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017)

- 499 [39] Kulkarni MG, Dalai AK. Waste cooking oil - an economical source for biodiesel:
500 A review. *Ind Eng Chem Res* 2006;45(9):2901-13.
- 501 [40] Wyse-Mason RR, Beckles DM. An investigation of restaurant waste oil
502 characteristics for biodiesel production in Trinidad and Tobago. *Energy Sustain*
503 *Develop* 2012;16(4):515-9.
- 504 [41] Berrios M, Gutiérrez MC, Martín MA, Martín A. Obtaining biodiesel from spanish
505 used frying oil: Issues in meeting the EN 14214 biodiesel standard. *Biomass*
506 *Bioenerg* 2010;34(3):312-8.
- 507 [42] Felizardo P, Neiva Correia MJ, Raposo I, Mendes JF, Berkemeier R, Bordado JM.
508 Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage* 2006;26(5):487-94.
- 509 [43] Darnoko D, Cheryan M. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. *J*
510 *Am Oil Chem Soc* 2000;77(12):1263-7.
- 511 [44] Demirbas A. Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical
512 methanol transesterification. *Energy Conv Manag* 2009;50(4):923-7.
- 513 [45] Freedman B, Butterfield RO, Pryde EH. Transesterification kinetics of soybean oil
514 1. *J Am Oil Chem Soc* 1986;63(10):1375-80.
- 515 [46] Hameed BH, Lai LF, Chin LH. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis*
516 *guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. *Fuel Process*
517 *Technol* 2009;90(4):606-10.
- 518 [47] Soriano NU, Venditti R, Argyropoulos DS. Biodiesel synthesis via homogeneous
519 Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel* 2009;88(3):560-5.
- 520 [48] Kawashima A, Matsubara K, Honda K. Acceleration of catalytic activity of
521 calcium oxide for biodiesel production. *Bioresour Technol* 2009;100(2):696-700.
- 522 [49] Lotero E, Liu Y, Lopez DE, Suwannakarn K, Bruce DA, Goodwin JG. Synthesis of
523 biodiesel via acid catalysis. *Ind Eng Chem Res* 2005;44(14):5353-63.

- 524 [50] Freedman B, Pryde EH, Mounts TL. Variables affecting the yields of fatty esters
525 from transesterified vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 1984;61(10):1638-43.
- 526 [51] Enweremadu CC, Mbarawa MM. Technical aspects of production and analysis of
527 biodiesel from used cooking oil - A review. *Renew Sust Energ Rev*
528 2009;13(9):2205-24.
- 529 [52] Cerveró JM, Coca J, Luque S. Production of biodiesel from vegetable oils. *Grasas*
530 *Aceites*, 2008;59(1):76-83. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i1.494>
- 531 [53] Demirbas A. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel
532 characteristics. *Energy Conv Manag* 2006;47(15):2271-82.
- 533 [54] Haas MJ, Michalski PJ, Runyon S, Nunez A, Scott KM. Production of FAME from
534 acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80(1):97-
535 102.
- 536 [55] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour*
537 *Technol* 2006;97(6):841-6.
- 538 [56] Wu W-H, Foglia TA, Marmer WN, Dunn RO, Goering CE, Briggs TE. Low-
539 temperature property and engine performance evaluation of ethyl and isopropyl
540 esters of tallow and grease. *J Am Oil Chem Soc* 1998;75(9):1173-8.
- 541 [57] Di Serio M, Tesser R, Pengmei L, Santacesaria E. Heterogeneous catalysts for
542 biodiesel production. *Energy Fuels* 2008;22(1):207-17.
- 543 [58] Goff MJ, Bauer NS, Lopes S, Sutterlin WR, Suppes GJ. Acid-catalyzed alcoholysis
544 of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 2004;81(4):415-20.
- 545 [59] Morgenstern M, Cline J, Meyer S, Cataldo S. Determination of the kinetics of
546 biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H
547 NMR). *Energy Fuels* 2006;20(4):1350-3.

- 548 [60] Dossin TF, Reyniers M-F, Berger RJ, Marin GB. Simulation of heterogeneously
549 MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial
550 production. *Appl Catal B-Environ* 2006;67(1):136-48.
- 551 [61] Corma A, Iborra S, Miquel S, Primo J. Catalysts for the production of fine
552 chemicals. *J Catal* 1998;173(2):315-21.
- 553 [62] Gryglewicz S. Alkaline-earth metal compounds as alcoholysis catalysts for ester
554 oils synthesis. *Appl Catal B-Gen* 2000;192(1):23-8.
- 555 [63] Hattori H, Shima M, Kabashima H. Alcoholysis of ester and epoxide catalyzed by
556 solid bases. *Stud Surf Sci Catal* 2000;130:3507-12.
- 557 [64] Meyer U, Hoelderich WF. Transesterification of methyl benzoate and dimethyl
558 terephthalate with ethylene glycol over basic zeolites. *Appl Catal A-Gen*
559 1999;178(2):159-66.
- 560 [65] Liu X, He H, Wang Y, Zhu S, Piao X. Transesterification of soybean oil to
561 biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel* 2008;87(2):216-21.
- 562 [66] Zabeti M, Wan Daud WMA, Aroua MK. Activity of solid catalysts for biodiesel
563 production: A review. *Fuel Process Technol* 2009;90(6):770-7.
- 564 [67] Zhang J, Chen S, Yang R, Yan Y. Biodiesel production from vegetable oil using
565 heterogenous acid and alkali catalyst. *Fuel* 2010;89(10):2939-44.
- 566 [68] Antunes WM, Veloso CdO, Henriques CA. Transesterification of soybean oil with
567 methanol catalyzed by basic solids. *Catal Today* 2008;133:548-54.
- 568 [69] Singh AK, Fernando SD. Reaction kinetics of soybean oil transesterification using
569 heterogeneous metal oxide catalysts. *Chem Eng Technol* 2007;30(12):1716-20.
- 570 [70] Mbaraka IK, Radu DR, Lin VSY, Shanks BH. Organosulfonic acid-functionalized
571 mesoporous silicas for the esterification of fatty acid. *J Catal* 2003;219(2):329-36.

- 572 [71] Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS, Mazaheri H. A review on novel processes of
573 biodiesel production from waste cooking oil. *Appl Energy* 2013;104:683-710.
- 574 [72] Granados ML, Poves MDZ, Alonso DM, Mariscal R, Galisteo FC, Moreno-Tost R,
575 et al. Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. *Appl Catal B-
576 Environ* 2007;73(3):317-26.
- 577 [73] Szczęśna Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel
578 synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renew Energy*
579 2009;34(5):1185-94.
- 580 [74] Dabdoub MJ, Bronzel JL, Rampin MA. Biodiesel: visão crítica do status atual e
581 perspectivas na academia e na industria. *Quím Nova* 2009;32(3):776-92.
- 582 [75] Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel
583 production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng*
584 2009;102(5):1298-315.
- 585 [76] Guieysse D, Salagnad C, Monsan P, Remaud-Simeon M. Lipase-catalyzed
586 enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids.
587 *Tetrahedron-Asymmetry* 2003;14(3):317-23.
- 588 [77] Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of
589 biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renew Sust
590 Energ Rev* 2015;41:1447-64.
- 591 [78] Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL. A life-cycle comparison
592 between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *J Clean
593 Prod* 2008;16(13):1368-78.
- 594 [79] Leca M, Tcacenco L, Micutz M, Staicu T. Optimization of biodiesel production by
595 transesterification of vegetable oils using lipases. *Rom Biotech Lett* 2010;15(5):
596 5618-30.

- 597 [80] Sharma S, Kanwar SS. Organic solvent tolerant lipases and applications. Sci World
598 J 2014;2014:15.
- 599 [81] Chen Y, Xiao B, Chang J, Fu Y, Lv P, Wang X. Synthesis of biodiesel from waste
600 cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy Conv Manag
601 2009;50(3):668-73.
- 602 [82] Poppe JK, Garcia-Galan C, Matte CR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub
603 MAZ. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B
604 from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. J Mol Catal B-
605 Enzym 2013;94:51-6.
- 606 [83] Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E.
607 Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. Biotechnol Adv
608 2009;27(4):398-408.
- 609 [84] Shah S, Sharma S, Gupta MN. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed
610 transesterification of *Jatropha* oil. Energy Fuels 2004;18(1):154-9.
- 611 [85] Köse Ö, Tüter M, Aksoy HA. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed
612 alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. Bioresour Technol
613 2002;83(2):125-9.
- 614 [86] Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z. Enzymatic conversion of
615 sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the
616 immobilized system stability. Bioresour Technol 2009;100(21):5146-54.
- 617 [87] Lozano P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems.
618 Green Chem 2010;12(4):555-69.
- 619 [88] Lozano P, Bernal JM, Sanchez-Gomez G, Lopez-Lopez G, Vaultier M. How to
620 produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic
621 liquids. Energy Environ Sci 2013;6(4):1328-38.

- 622 [89] Lozano P, Bernal JM, Vaultier M. Towards continuous sustainable processes for
623 enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon
624 dioxide biphasic systems. *Fuel* 2011;90(11):3461-7.
- 625 [90] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for
626 biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol
627 Catal B-Enzym* 2002;17(3):133-42.
- 628 [91] Talukder MMR, Wu JC, Van Nguyen TB, Fen NM, Melissa YLS. Novozym 435
629 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis
630 methods. *J Mol Catal B- Enzym* 2009;60(3):106-12.
- 631 [92] Poppe JK, Matte CR, Peralba MdCR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub
632 MAZ. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using
633 mixtures of immobilized lipases. *Appl Catal A-Gen* 2015;490:50-6.
- 634 [93] Hernández-Martín E, Otero C. Different enzyme requirements for the synthesis of
635 biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresour Technol*
636 2008;99(2):277-86.
- 637 [94] Soumanou MM, Bornscheuer UT. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of
638 fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb Technol*
639 2003;33(1):97-103.
- 640 [95] Verdasco-Martín CM, Villalba M, dos Santos JCS, Tobajas M, Fernandez-Lafuente
641 R, Otero C. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in
642 the alcoholysis of camelina oil. *Biochem Eng J* 2016;111:75-86.
- 643 [96] Villalba M, Verdasco-Martín CM, dos Santos JCS, Fernandez-Lafuente R, Otero C.
644 Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an
645 alcoholysis reaction. *Enzyme Microb Technol* 2016;90:35-44.

- 646 [97] Fallavena LP, Antunes FHF, Alves JS, Paludo N, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente
647 R, et al. Ultrasound technology and molecular sieves improve the
648 thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by
649 immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. RSC Adv 2014;4(17):8675-81.
- 650 [98] Martins AB, Schein MF, Friedrich JLR, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ,
651 Rodrigues RC. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym
652 435: Enhanced activity and operational stability. Ultrasonics Sonochem
653 2013;20(5):1155-60.
- 654 [99] Paludo N, Alves JS, Altmann C, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues
655 RC. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis
656 of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase.
657 Ultrasonics Sonochem 2015;22:89-94.
- 658 [100] Alves JS, Vieira NS, Cunha AS, Silva AM, Zachia Ayub MA, Fernandez-Lafuente
659 R, et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis
660 of soybean oil using mixtures of biocatalysts. RSC Adv 2014;4(14):6863-8.
- 661 [101] Friedrich JLR, Peña FP, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ,
662 Rodrigues RC. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl
663 butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. J Chem Technol
664 Biotechnol 2013;88(6):1089-95.
- 665 [102] Graebin NG, Martins AB, Lorenzoni ASG, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R,
666 Ayub MAZ, et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous
667 styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. Biotechnol Progr
668 2012;28(2):406-12.
- 669 [103] Martins AB, Friedrich JLR, Cavaleiro JC, Garcia-Galan C, Barbosa O, Ayub
670 MAZ, et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces*

671 *lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. *Bioresour Technol*
672 2013;134:417-22.

673 [104] Séverac E, Galy O, Turon F, Pantel CA, Condoret J-S, Monsan P, et al. Selection
674 of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification:
675 Analysis of the economical impact. *Enzyme Microb Technol* 2011;48(1):61-70.

676 [105] Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-
677 Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as
678 industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv* 2015;33(5):435-56.

679 [106] Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Effect of the immobilization
680 protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media:
681 Enantiospecific production of atenolol acetate. *J Mol Catal B-Enzym*
682 2011;71(3):124-32.

683 [107] Dizge N, Keskinler B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using
684 immobilized lipase. *Biomass Bioenerg* 2008;32(12):1274-8.

685 [108] Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernandez-Lafuente R.
686 Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev*
687 2013;42(15):6290-307.

688 [109] Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D. Lipase-catalyzed process for biodiesel
689 production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew*
690 *Sustain Energy Rev* 2015;44:182-97.

691 [110] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects
692 as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B-Enzym* 2010;62(3):197-212.

693 [111] Tacias-Pascacio VG, Peirce S, Torrestiana-Sanchez B, Yates M, Rosales-Quintero
694 A, Virgen-Ortiz JJ, et al. Evaluation of different commercial hydrophobic supports

695 for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity.
696 RSC Adv 2016;6(102):100281-94.

697 [112] Tacias-Pascacio VG, Virgen-Ortíz JJ, Jiménez-Pérez M, Yates M, Torrestiana-
698 Sanchez B, Rosales-Quintero A, et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in
699 the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the
700 immobilization support. Fuel 2017;200:1-10.

701 [113] Chen X, Du W, Liu D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel
702 production with acid oil. Biochem Eng J 2008;40(3):423-9.

703 [114] Wang Y, Wu H, Zong MH. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL
704 IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration
705 enhancer. Bioresour Technol 2008;99(15):7232-7.

706 [115] Yücel Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using
707 response surface methodology. Fuel Process Technol 2012;99:97-102.

708 [116] Tacias-Pascacio VG, Rosales-Quintero A, Torrestiana-Sanchez B. Evaluación y
709 caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de
710 biodiésel: un caso de estudio. Rev Int Contam Ambient 2016;32(3):303-313. doi:
711 <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.05>

712 [117] British Standards Institution. Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters
713 (FAME): determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (English
714 version). London: British Standards Institution; Brussels: European Committee for
715 Standardization; 2011.

716

717 **Figure Legends**

718 Figure 1: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by KOH. The missing
719 variable was fixed in the central point.

720 Figure 2: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by H₂SO₄. The missing
721 variable was fixed in the central point.

722 Figure 3: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by heterogeneous basic
723 catalyst, CaOH. The missing variable was fixed in the central point.

724 Figure 4: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by immobilized TLL. The
725 missing variable was fixed in the central point.

726 Figure 5. Predicted and experimental obtained yields of the different types of catalysis
727 under optimal conditions.

728 Figure 6. Photos of the different reactions at termination.

729

730

731 Table 1. Physicochemical properties and fatty acid composition of the feedstock

732

733

Feedstock	Acid value (mg KOH/g)	Free fatty acid content (%)	Moisture (%)	Saponification index (mg KOH/g)	Fatty acid average composition (%)						
					16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Others
WCOF	2.09	1.05	0.04	198.54	17.82	0.51	5.75	40.98	28.77	4.51	1.67
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.09	0.04	0.001	0.71	0.23	0.04	0.11	0.33	0.15	0.36	0.01

734

735 Table 2: Matrix of B-B-design and the results of reaction yield for the 4 catalysts

Run	Variables			Reaction yield (%)			
	X1 ^a	X2	X3 ^b	Alkaline	Acid	Heterogeneous	Enzymatic
1	0	-1	-1	69.01	42.66	72.75	59.00
2	-1	0	-1	67.47	67.39	63.70	69.50
3	1	0	-1	81.50	72.86	69.00	69.00
4	0	1	-1	81.67	89.90	59.33	72.00
5	-1	-1	0	51.27	64.02	68.28	69.50
6	1	-1	0	73.88	75.98	72.30	72.50
7	0	0	0	79.39	84.87	70.98	73.50
8	0	0	0	79.70	85.69	70.52	76.00
9	0	0	0	79.38	84.71	71.68	72.50
10	-1	1	0	73.20	87.14	71.18	72.00
11	1	1	0	81.37	83.43	60.97	74.50
12	0	-1	1	71.03	78.44	71.25	75.00
13	-1	0	1	71.04	87.99	70.85	69.50
14	1	0	1	81.35	87.51	67.02	76.00
15	0	1	1	81.19	91.32	70.88	73.00

736 ^a X1: Substrate molar ratio; X2: Catalyst concentration; X3: Reaction time.

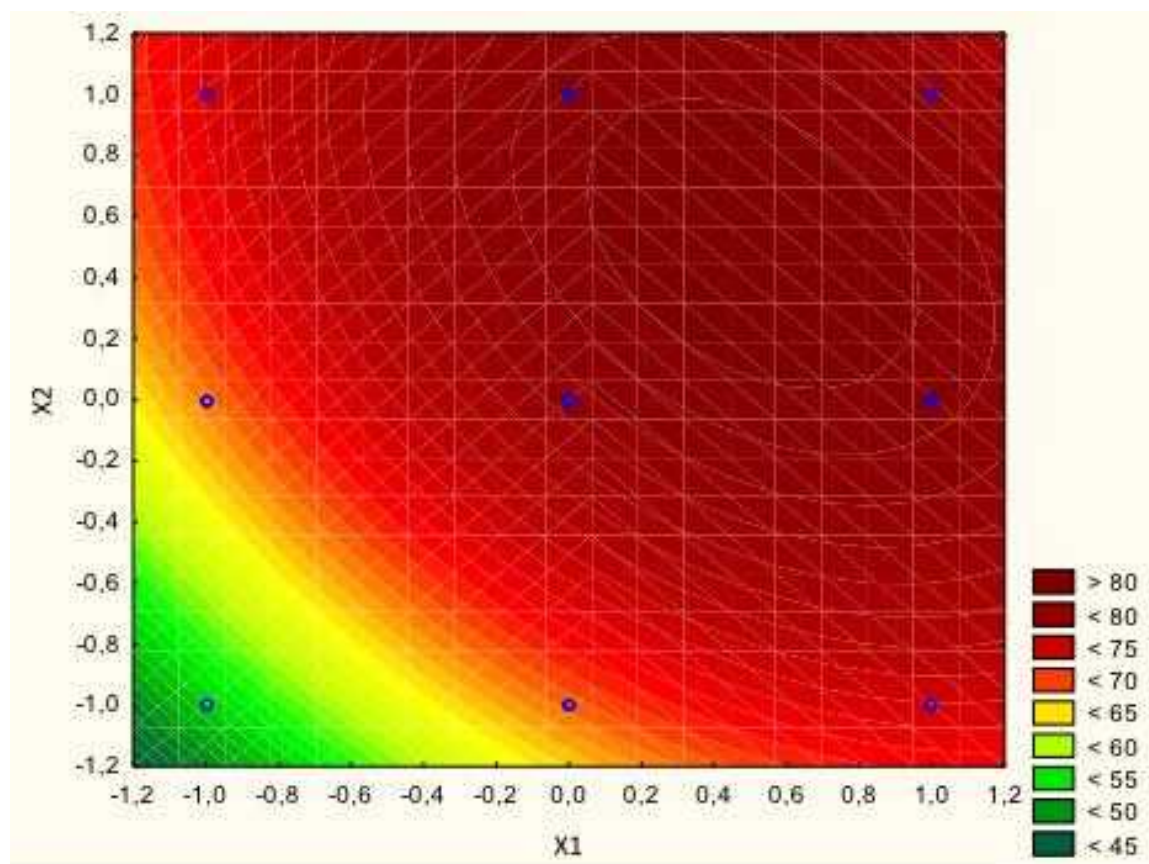
737

738 Table 3: Linear, quadratic and interaction effects for the variables in the reaction for the 4
 739 catalysts

Variable	Alkaline	Acid	Heterogeneous	Enzymatic
X ₁	13.77	3.31	1.17 *	2.87
X ₂	13.08	22.67	-5.55	3.87
X ₃	1.24	18.11	3.80	6.00
X ₁ X ₁	4.97	2.04	1.89	0.31 *
X ₂ X ₂	4.58	5.40	0.98 *	1.56
X ₃ X ₃	-0.82	4.10	1.52	2.68
X ₁ X ₂	-7.22	-7.83	-7.11	-0.25 *
X ₁ X ₃	-1.86	-2.97	-4.56	3.50
X ₂ X ₃	-1.24	-17.18	6.52	-7.50

740 * Not statistically significant at $p < 0.05$.

741



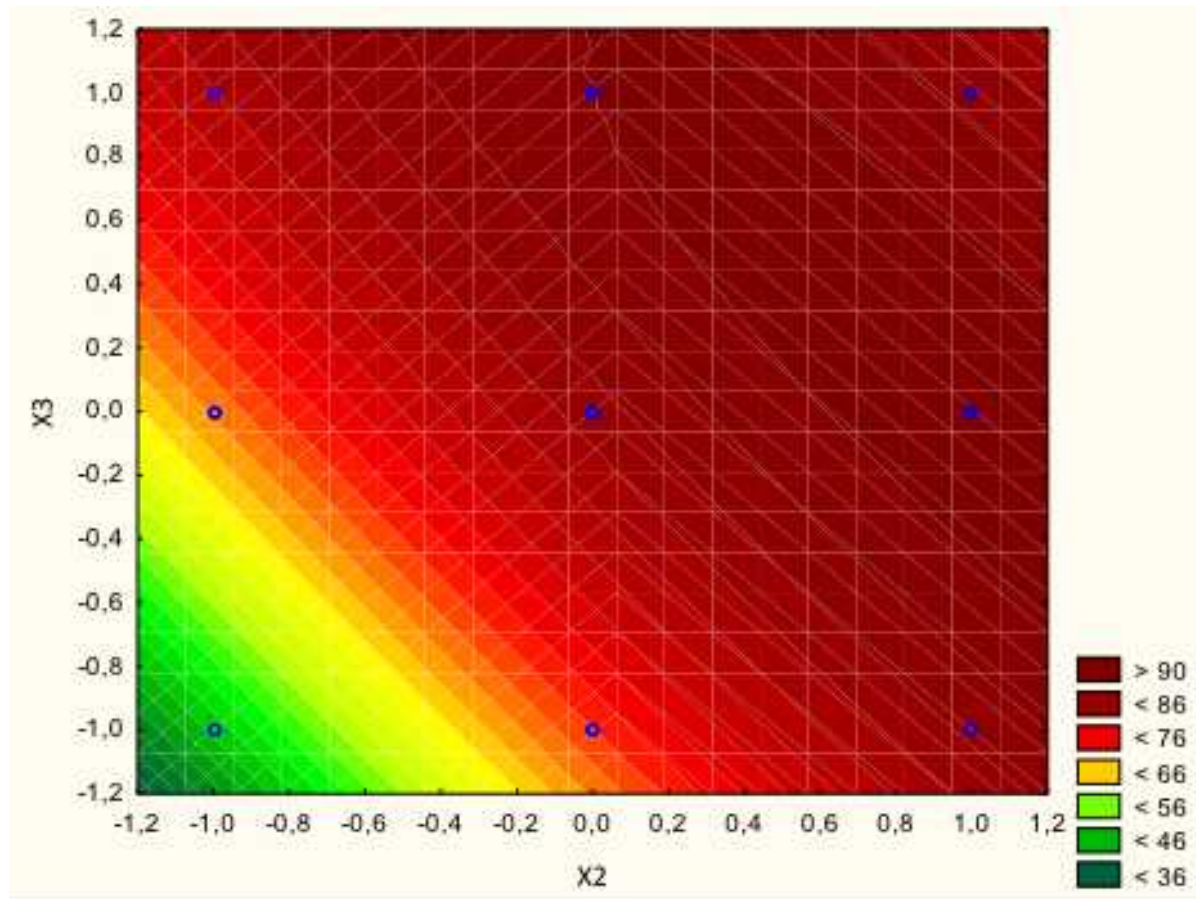
742

743

Figure 1: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by KOH. The missing variable was fixed in the central point.

744

745



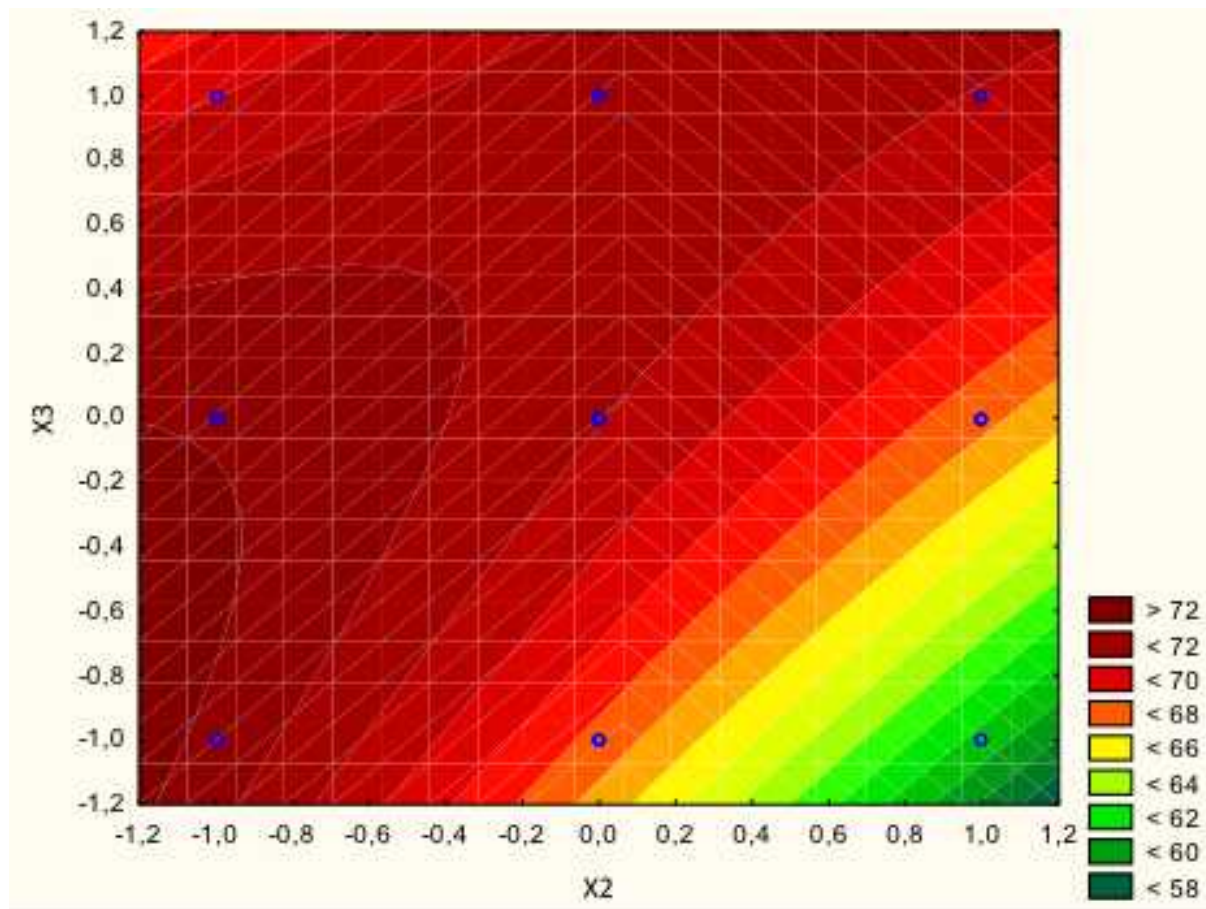
746

747

Figure 2: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by H_2SO_4 . The missing variable was fixed in the central point.

748

749



750

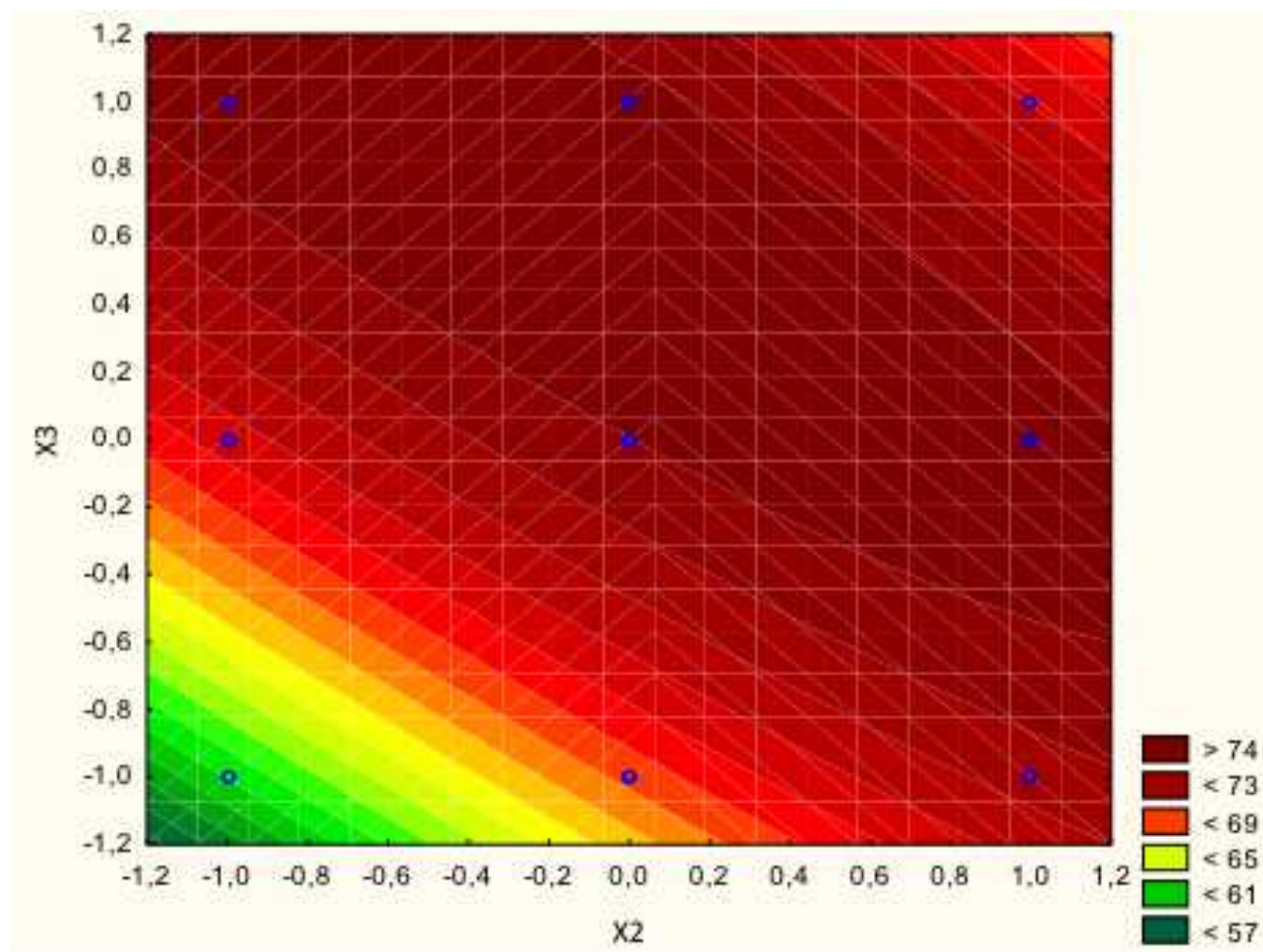
751

Figure 3: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by heterogeneous basic catalyst, CaOH. The missing variable was fixed in the

752

central point.

753

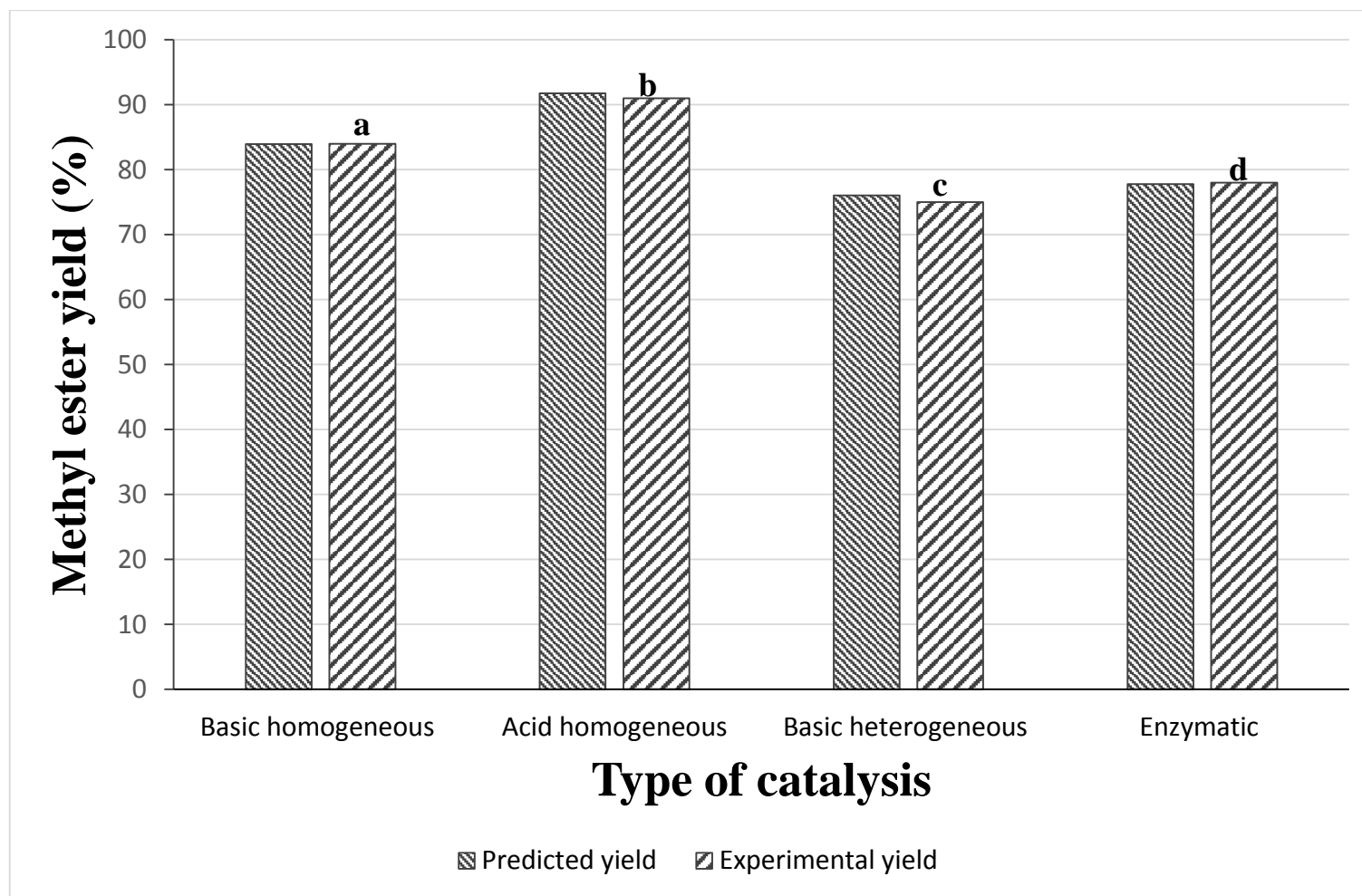


754

755

Figure 4: Contour plots for the biodiesel synthesis catalyzed by immobilized TLL. The missing variable was fixed in the central point.

756



757

758

759

Figure 5. Predicted and experimental obtained yields of the different types of catalysis under optimal conditions. Different letters mean significant difference according to the Tukey test ($P < 0.05$).

760

761

762



Acid homogeneous catalysis



Alkaline homogeneous catalysis

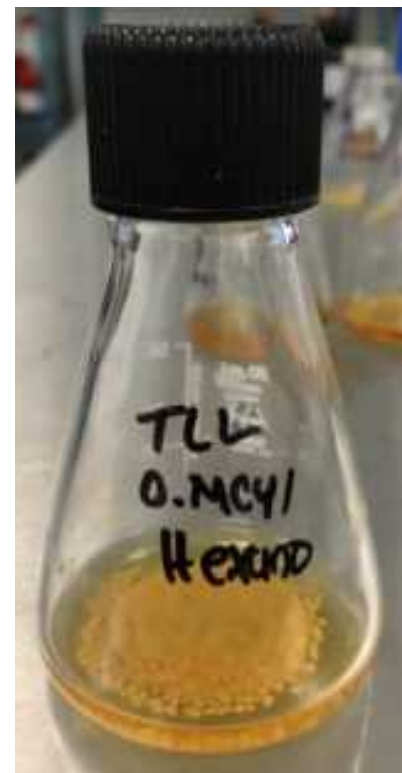


Basic heterogeneous catalysis

763

764

765



Enzymatic catalysis

Figure 6. Photos of the different reactions at termination.

DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis surgió de la necesidad de dar respuesta a preguntas relacionadas con la producción de biodiésel a partir de materias primas residuales, entre ellas ¿Es posible utilizar la mezcla de grasas y aceites residuales (GAR) de cocina como materia prima para establecer un proceso de producción de biodiésel? Para dar respuesta a esta pregunta, se realizó un estudio para estimar los volúmenes de producción de grasas y aceites residuales en una ciudad de tamaño medio en nuestro País (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas) y posteriormente determinar quiénes lo producen y cuál es su composición. Se encontró que en Tuxtla Gutiérrez se generan 174 t anuales de GAR, provenientes de ocho tipos de restaurantes en la siguiente proporción: 41 % restaurantes formales, 24 % comida rápida, 8 % taquerías, 7 % antojitos, 6 % cocinas económicas, 6 % bares, 4 % gorditas y 4 % rosticerías. Esta materia prima contiene 25 % y 75% de ácidos grasos saturados e insaturados, respectivamente, un porcentaje de ácidos grasos libres de 1.05 % y un contenido de humedad de 0.04%. Con respecto a la composición de ácidos grasos, es conveniente mencionar que si bien el porcentaje de ácidos grasos saturados es superior al del aceite fresco utilizado como referencia (con un contenido de ácidos grasos saturados de 13 %), esto no significa que la materia prima deba ser descartada, ya que, en realidad no existe una materia prima ideal para la producción de biodiésel, sino más bien se utiliza la que esté disponible en mayor cantidad. Esto se debe a que los ácidos grasos saturados o insaturados, presentan ventajas y desventajas. Por ejemplo, una alta presencia de saturados producirá un biodiésel más viscoso pero también con una estabilidad oxidativa superior. Por otro lado, altas concentraciones de ácidos grasos insaturados generan un biodiésel más fluido pero de una estabilidad oxidativa inferior. Los contenidos de ácidos grasos libres y humedad de las GAR obtenidas, fueron relativamente bajos, lo que dio la posibilidad de evaluar esta materia prima empleando catálisis química ácida o básica. Sin embargo, se sabe que la producción de biodiésel por transesterificación química presenta serios inconvenientes, por lo que se han estudiado catalizadores biológicos para la producción de biodiésel, específicamente lipasas inmovilizadas.

La desventaja principal de los biocatalizadores es el alto costo. Por lo que en este trabajo se planteó la siguiente pregunta: ¿Es posible desarrollar biocatalizadores que sean competitivos con los biocatalizadores comerciales para la producción de biodiésel? Para responder a esta interrogante se inmovilizaron varios tipos de lipasas en diferentes soportes. Se encontró que uno de los nuevos biocatalizadores desarrollados TLL-Octadecil metacilato, es altamente competitivo con el biocatalizador más utilizado Novozyme 435 y mucho mejor que su contraparte comercial, TL IM de Novozyme.

Los resultados obtenidos por catálisis enzimática fueron muy prometedores, por lo que se decidió comparar el catalizador obtenido con la catálisis química homogénea y heterogénea. Para llevar a cabo esta comparación se optimizaron primero los diferentes tipos de catálisis. Se encontró que el mejor rendimiento lo proporciona la catálisis homogénea ácida, sin embargo, las condiciones de operación necesarias para este tipo de catálisis no se consideran adecuadas para establecer el proceso a nivel industrial.

Por otro lado, los resultados obtenidos por catálisis enzimática fueron superiores a los de la catálisis heterogénea, y muy cercanos a la catálisis homogénea alcalina, que es la más utilizada en la producción industrial de biodiésel. Sobre la base de lo anterior y considerando las ventajas operacionales y el rendimiento generado, se concluyó que el biocatalizador desarrollado en este trabajo tiene un gran potencial para la producción de biodiésel a partir de grasas y aceites residuales de cocina.

CONCLUSIONES

En Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, anualmente son generadas alrededor de 174 t de grasas y aceites residuales, de las cuales el 41% corresponde a aceites provenientes de restaurantes formales, el 8% a taquerías, 6% a cocinas económicas, 7% a antojitos, 24% a comida rápida, 6% a bares, 4% a gorditas y 4% a rosticerías. Esta materia prima, que está compuesta por un 25% de ácidos grasos saturados y un 75% de ácidos grasos insaturados, demostró ser apta para su conversión a biodiésel.

Las catálisis químicas evaluadas para la producción de biodiésel a partir de estas grasas y aceites residuales, produjeron rendimientos del 91%, 84% y 75%, para la catálisis homogénea ácida, homogénea alcalina y heterogénea alcalina, respectivamente. Evidentemente la catálisis homogénea ácida tuvo un rendimiento superior, sin embargo, los largos tiempos de reacción (50 h) y altas relaciones molares metanol: aceite (42:1), son una importante desventaja para este proceso.

En el caso de la catálisis enzimática, se encontró que el biocatalizador TLL-Octadecil metacilato desarrollado en este trabajo, produjo un rendimiento de 78% en 3 horas de reacción. Este rendimiento es muy cercano a lo obtenido por la catálisis alcalina convencional, es 20% superior al biocatalizador comercial más utilizado (Novozyme 435) y 65% mayor a su contraparte comercial TL IM de Novozyme.

Los excelentes resultados obtenidos por catálisis enzimática ponen en evidencia la necesidad de seguir investigando en esta área, para poder desarrollar biocatalizadores que no solo superen a los catalizadores convencionales, sino que también cumplan con las normas de calidad, que estén disponibles a un costo accesible, que sean reutilizables y amigables con el medio ambiente. La catálisis enzimática puede ser el futuro de la producción de biodiésel, ya que sus ventajas sobre los catalizadores químicos son destacables, entre ellas, permitir el aprovechamiento de materias primas de baja calidad, lo cual es de suma importancia para la competitividad económica del biodiésel con respecto al diésel de petróleo.

RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo demostraron que la catálisis enzimática es altamente competitiva con la catálisis química en la producción de biodiésel. El biocatalizador TLL-octadecil metacilato desarrollado y utilizado en este trabajo, produjo un rendimiento superior al rendimiento teórico para esta catálisis (66%), muy cercano al obtenido por la catálisis alcalina convencional, 20% superior al biocatalizador comercial más utilizado (Novozyme 435) y 65% mayor a su contraparte comercial TL IM de Novozyme. Por este motivo, se recomienda profundizar en el estudio de este biocatalizador, para conseguir que sus rendimientos alcancen lo establecido por la norma europea EN 14 214. Ya que la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es una enzima específica sn-1,3, lo anterior puede conseguirse encontrando condiciones del medio de reacción y/o un soporte de inmovilización, que permitan o promuevan la migración de acilos en los triglicéridos, para que puedan ser catalizador por la enzima.

Además, se recomienda evaluar nuevas fuentes de lipasas, inmovilizadas en diferentes soportes, para ampliar la gama de biocatalizadores que puedan ser utilizados en la producción de biodiésel.

De forma adicional, se sugiere diversificar el uso del biocatalizador TLL-octadecil metacilato, evaluando su desempeño en otras reacciones de gran importancia, como la producción de monoglicéridos ampliamente utilizados en la industria alimentaria, y en la formación de ésteres de cera, compuestos de gran valor en la industria cosmética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alamu, O. J., Akintola, T. A., Enweremadu, C. C., y Adeleke, A. E. 2008. Characterization of palm-kernel oil biodiesel produced through NaOH-catalysed transesterification process. *Sci. Res. Essays*. **3** (7): 308-311.
- Alcantara, R., Amores, J., Canoira, L. T., Fidalgo, E., Franco, M. J., y Navarro, A. 2000. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass and Bioenergy*. **18** (6): 515-527.
- Alptekin, E. y Canakci, M. 2011. Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat. *Fuel*. **90** (8): 2630-2638.
- Antczak, M. S., Kubiak, A., Antczak, T., y Bielecki, S. 2009. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renew. Energy*. **34** (5): 1185-1194.
- Araujo, L. R. R. D., Scofield, C. F., Pastura, N. M. R., y Gonzalez, W. D. A. 2006. H₃PO₄/Al₂O₃ catalysts: characterization and catalytic evaluation of oleic acid conversion to biofuels and biolubricant. *Mat. Res.* **9** (2): 181-184.
- Arpigny, J. L. y Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343** (1), 177-183.
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., y Aziz, A. A. 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **14** (7): 1999-2008.
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., Aziz, A. A., y Sulaiman, N. M. N. 2012. Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **16** (5): 3275-3285.
- Ataya, F., Dubé, M. A., y Ternan, M. 2007. Acid-Catalyzed Transesterification of Canola Oil to Biodiesel under Single- and Two-Phase Reaction Conditions. *Energy & Fuels* **21**(4): 2450-2459.
- Benjumea, P., Agudelo, J., y Agudelo, A. 2008. Basic properties of palm oil biodiesel–diesel blends. *Fuel*. **87** (10): 2069-2075.

- Berrios, M., Gutierrez, M. C., Martin, M. A., y Martin, A. 2010. Obtaining biodiesel from spanish used frying oil: Issues in meeting the EN 14214 biodiesel standard. *Biomass and Bioenergy* **34** (3): 312-318.
- Bhatti, H. N., Hanif, M. A., Qasim, M. y Ata ur, R. (2008). Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*. **87** (13): 2961-2966.
- Bondioli, P., Gasparoli, A., Della Bella, L., Tagliabue, S., y Toso, G. 2003. Biodiesel stability under commercial storage conditions over one year. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **105** (12): 735-741.
- Boocock, D. B., Konar, S., Mao, V., Lee, C. y Buligan, S. 1998. Fast formation of high-purity methyl esters from vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (9): 1167-1172.
- Boocock, D. G. B. 2003. Single-phase process for production of fatty acid methyl esters from mixtures of triglycerides and fatty acids. U.S. Patent No. 6,642,399.
- Borgdorf, R. y Warwel, S. 1999. Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis- and trans-9-octadecenoic acid. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **51** (4): 480-485.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. y Menge, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. **343** (6260): 767-770.
- Brockhoff, H. 1968. Substrate specificity of pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* **159** (2): 296-303.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S. A. y Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. **351** (6326): 491-494.
- Calero, J., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., Posadillo, A., Berbel, J. y Verdugo-Escamilla, C. 2015. An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **42**: 1437-1452.
- Canakci, M. y Van Gerpen, J. 1999. Biodiesel production via acid catalysis. *Trans. ASAE.* **42** (5): 1203.

- Canesin, E. A., de Oliveira, C. C., Matsushita, M., Dias, L. F., Pedrão, M. R., y de Souza, N. E. 2014. Characterization of residual oils for biodiesel production. *Electron. J. Biotechnol.* **17**(1): 39-45.
- Canet, A., Dolors Benaiges, M. y Valero, F. 2014. Biodiesel Synthesis in a Solvent-Free System by Recombinant *Rhizopus oryzae* Lipase. Study of the Catalytic Reaction Progress. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91** (9): 1499-1506.
- Cao, P., Tremblay, A. Y., Dubé, M. A., y Morse, K. 2006. Effect of Membrane Pore Size on the Performance of a Membrane Reactor for Biodiesel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **46** (1): 52-58.
- Carrasco-López, C., Godoy, C., de las Rivas, B., Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Guisán, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Martinez-Ripoll, M. y Hermoso, J. A. 2009. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J. Biol. Chem.* **284** (7): 4365-4372.
- Chapus, C. y Semeriva, M. 1976. Mechanism of pancreatic lipase action. 2. Catalytic properties of modified lipases. *Biochemistry.* **15** (23): 4988-4991.
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P. y Wang, X. 2009. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Convers. Manage.* **50** (3): 668-673.
- Cheng, L. H., Cheng, Y. F., Yen, S. Y., y Chen, J. 2009. Ultrafiltration of triglyceride from biodiesel using the phase diagram of oil-FAME-MeOH. *J. Membr. Sci.* **330** (1): 156-165.
- Chhetri, A. B., Watts, K. C., y Islam, M. R. 2008. Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production. *Energies.* **1** (1): 3-18.
- Contesini, F. J., Lopes, D., Macedo, B. G. A., Nascimento, M. d. G. y Carvalho, P. d. O. 2010. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **67** (3): 163-171.
- Corma, A., Iborra, S., Miquel, S. y Primo, J. 1998. Catalysts for the Production of Fine Chemicals: Production of Food Emulsifiers, Monoglycerides, by Glycerolysis of Fats with Solid Base Catalysts. *J. Catal.* **173** (2): 315-321.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreji, A. N. y Gupta, A. K. 1994. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **116** (8): 3180-3186.

- Dabdoub, M. J., Bronzel, J. L. y Rampin, M. A. 2009. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Quím. Nova.* **32**: 776-792.
- Darnoko, D. y Cheryan, M. 2000. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77** (12): 1263-1267.
- Demirbas, A. 2006. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energ. Convers. Manage.* **47** (15): 2271-2282.
- DeOliveira, E., Quirino, R. L., Suarez, P. A., y Prado, A. G. 2006. Heats of combustion of biofuels obtained by pyrolysis and by transesterification and of biofuel/diesel blends. *Thermochimica Acta.* **450** (1): 87-90.
- Di Serio, M., Tesser, R., Pengmei, L. y Santacesaria, E. 2007. Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. *Energy Fuels.* **22** (1): 207-217.
- Dias, J. M., Alvim-Ferraz, M.C y Almeida, M.F. 2008. Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality. *Fuel.* **87** (17): 3572-3578.
- Dias, J. M., Alvim-Ferraz, M.C. y Almeida, M.F. 2009. Production of biodiesel from acid waste lard. *Bioresour. Technol.* **100** (24): 6355-6361.
- Dossin, T. F., Reyniers, M. F., Berger, R. J., y Marin, G. B. 2006. Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production. *Appl. Catal., B.* **67** (1): 136-148.
- Du, W., Xu, Y. y Liu, D. 2003. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol. Appl. Bio.* **38** (2): 103-106.
- Ehsan, M. y Chowdhury, M. T. H. 2015. Production of Biodiesel Using Alkaline Based Catalysts From Waste Cooking Oil: A Case Study. *Procedia Eng.* **105**: 638-645.
- Encinar, J. M., Gonzalez, J. F., y Rodríguez-Reinares, A. 2005. Biodiesel from Used Frying Oil. Variables Affecting the Yields and Characteristics of the Biodiesel. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44** (15): 5491-5499.
- Felizardo, P., Correia, M. J. N., Raposo, I., Mendes, J. F., Berkemeier, R., y Bordado, J. M. 2006. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage.* **26** (5): 487-494.

- Ferella, F., Di Celso, G. M., De Michelis, I., Stanisci, V., y Vegliò, F. 2010. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*. **89** (1): 36-42.
- Fernandez-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G. y Guisán, J. M. 1998. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids*. **93** (1–2): 185-197.
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M y Guisan, J. M. 2008. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem*. **43** (10): 1061-1067.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., y Norddahl, B. 2009. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng*. **102** (5): 1298-1315.
- Freedman, B. E. H. P., Pryde, E. H., y Mounts, T. L. 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61** (10): 1638-1643.
- Freedman, B., Butterfield, R. y Pryde, E. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil 1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (10): 1375-1380.
- Fukuda, H., Kondo, A., y Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng*. **92** (5): 405-416.
- Gandhi, N. N. 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**(6): 621-634.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. y Rodrigues, R. C. 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* **353** (16): 2885-2904.
- Gerpen, J. V. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.* **86** (10): 1097-1107.
- Ghanem, A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. **63**(8): 1721-1754.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C. y Irimie, F. D. 2012. Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renew. Energy*. **39** (1): 10-16.
- Gryglewicz, S. 2000. Alkaline-earth metal compounds as alcoholysis catalysts for ester oils synthesis. *Appl. Catal., A*. **192** (1): 23-28.

- Guncheva, M. y Zhiryakova, D. 2011. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **68** (1): 1-21.
- Gunvachai, K., Hassan, M. G., Shama, G., & Hellgardt, K. 2007. A New Solubility Model to Describe Biodiesel Formation Kinetics. *Process Saf. Environ. Prot.* **85** (5): 383-389.
- Gupta, R., Gupta, N. y Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**(6): 763-781.
- Haas, M., Michalski, P., Runyon, S., Nunez, A. y Scott, K. 2003. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80** (1): 97-102.
- Haas, M. J., McAloon, A. J., Yee, W. C., y Foglia, T. A. 2006. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour. Technol.* **97** (4): 671-678.
- Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Tamadani, N., Kuratani, N., Noda, H., Fukuda, H. y Kondo, A. 2011. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **102** (22): 10419-10424.
- Hameed, B. H., Lai, L. F., y Chin, L. H. 2009. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. *Fuel Process. Technol.* **90** (4): 606-610.
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H. y Harrison, S. T. L. 2008. A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *J. Clean. Prod.* **16** (13): 1368-1378.
- Hari Krishna, S. y Karanth, N. G. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catal. Rev.* **44** (4): 499-591.
- Hasan, F., Shah, A. A. y Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2): 235-251.
- Hattori, H., Shima, M., y Kabashima, H. 2000. Alcoholysis of ester and epoxide catalyzed by solid bases. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **130**: 3507-3512.
- Houde, A., Kademi, A. y Leblanc, D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol.* **118** (1): 155-170.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., y Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy.* **87** (1): 38-46.

- Ibeto, C., Ofoefule, A. y Ezeugwu, H. 2011. Fuel quality assessment of biodiesel produced from groundnut oil (*Arachis hypogea*) and its blend with petroleum diesel. *American Journal of Food Technology*. **6** (9): 798-803.
- Jaeger, K.-E. y Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (4): 390-397.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. y Reetz, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* **53** (1): 315-351.
- Kapoor, M. y Gupta, M. N. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* **47** (4): 555-569.
- Karaosmanoğlu, F., Cıgızoğlu, K. B., Tüter, M. y Ertekin, S. 1996. Investigation of the Refining Step of Biodiesel Production. *Energy Fuels*. **10** (4): 890-895.
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* **86** (10): 1059-1070.
- Kouzu, M., Kasuno, T., Tajika, M., Sugimoto, Y., Yamanaka, S. y Hidaka, J. 2008. Calcium oxide as a solid base catalyst for transesterification of soybean oil and its application to biodiesel production. *Fuel*. **87** (12): 2798-2806.
- Kulkarni, M. G. y Dalai, A. K. 2006. Waste Cooking Oil An Economical Source for Biodiesel: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **45** (9): 2901-2913.
- Kuo, S. J. y Parkin, K. L. 1993. Substrate preferences for lipase-mediated acyl-exchange reactions with butteroil are concentration-dependent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70** (4): 393-399.
- Leca, M., Tcacenco, L., Micutz, M., y Staicu, T. 2010. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. *Rom. Biotech. Lett.* **15** (5), 5618-5630.
- Leoneti, A. B., Aragao-Leoneti, V., y De Oliveira, S. V. W. B. 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renew. Energy*. **45**, 138-145.
- Leung, D. Y. C., y Guo, Y. 2006. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Process. Technol.* **87**(10): 883-890.

- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L. y 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** (1): 58-62.
- Loh, S. K., Chew, S. M., y Choo, Y. M. 2006. Oxidative stability and storage behavior of fatty acid methyl esters derived from used palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83** (11): 947-952.
- Long, K., Ghazali, H. M., Ariff, A., Man, Y. C. y Bucke, C. 1998. Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus Flavus* Link. *Biotechnol. Lett.* **20** (4): 369-372.
- Lotero, E., Liu, Y., Lopez, D. E., Suwannakarn, K., Bruce, D. A., y Goodwin, J. G. 2005. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44** (14): 5353-5363.
- Lu, J., Nie, K., Xie, F., Wang, F. y Tan, T. 2007. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. *Process Biochem.* **42** (9): 1367-1370.
- Ma, F. y Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* **70** (1): 1-15.
- Mao, V., Konar, S. y Boocock, D. B. 2004. The pseudo-single-phase, base-catalyzed transmethylation of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81** (8): 803-808.
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., y Errazu, A. F. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **11** (6): 1300-1311.
- Maskan, M. y Bağcı, H. 2003. Effect of different adsorbents on purification of used sunflower seed oil utilized for frying. *Eur. Food Res. Technol.* **217** (3): 215-218.
- Meher, L. C., Sagar, D. V., y Naik, S. N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **10** (3): 248-268.
- Meyer, U. y Hoelderich, W. F. 1999. Transesterification of methyl benzoate and dimethyl terephthalate with ethylene glycol over basic zeolites. *Appl. Catal., A.* **178** (2): 159-166.
- Miao, X. y Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **97** (6): 841-846.
- Mittelbach, M. 1996. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel. *Bioresour. Technol.* **56** (1): 7-11.

- Montero, G., Stoytcheva, M., Coronado, M., García, C., Cerezo, J., Toscano, L., Vázquez, A.M. y León, J. A. 2015. An Overview of Biodiesel Production in Mexico. *Biofuels - Status and Perspective*. K. Biernat. Rijeka, InTech: Ch. 19.
- Moreira, A. B. R., Perez, V. H., Zanin, G. M. y de Castro, H. F. 2007. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica-PVA Composite. *Energy Fuels*. **21** (6): 3689-3694.
- Morgenstern, M., Cline, J., Meyer, S. y Cataldo, S. 2006. Determination of the Kinetics of Biodiesel Production Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR). *Energy Fuels*. **20** (4): 1350-1353.
- Moser, B. 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. **45** (3): 229-266.
- Nelson, L. A., Foglia, T. A. y Marmer, W. N. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73** (9): 1191-1195.
- Neto, P. R. C., Rossi, L. F., Zagonel, G. F., y Ramos, L. P. 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Quím. Nova*. **23** (4): 531-537.
- Noureddini, H., Gao, X. y Philkana, R. S. 2005. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.* **96**(7): 769-777.
- Ognjanovic, N., Bezbradica, D. y 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** (21): 5146-5154.
- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M. y Fernández-Lafuente, R. 2003. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*. **4** (1): 1-6.
- Palomo, J. M., Ortiz, C., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. 2004. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J. Chromatogr. A*. **1038** (1): 267-273.
- Palomo, J. M., Ortiz, C., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Guisán, J. M. y Fernández-Lafuente, R. 2005. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microb. Technol.* **36** (4): 447-454.

Phan, A. N., y Phan, T. M . 2008. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel*. **87** (17): 3490-3496.

Poppe, J. K., Garcia-Galan, C., Matte, C. R., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C. y Ayub, M. A. Z. 2013. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **94**: 51-56.

Poppe, J. K., Matte, C. R., Peralba, M. D. C. R., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C., y Ayub, M. A. Z. 2015. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Appl. Catal., A*. **490**: 50-56.

Predojević, Z. J. 2008. The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel*. **87** (17): 3522-3528.

Ramadhass, A. S., Jayaraj, S., & Muraleedharan, C. 2005. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*. **84** (4): 335-340.

Rangheard, M. S., Langrand, G., Triantaphylides, C. y Baratti, J. 1989. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. *Biochim. Biophys. Acta - Lipid Lipid Metab.* **1004** (1): 20-28.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. y Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **147-148**: 237-250.

Ribeiro, B. D., de Castro, A. M., Coelho, M. A. y Freire, D. M. 2011. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res.* **2011**: 615803.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L. y Molina-Grima, E. 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.* **27**(4): 398-408.

Rodrigues, R. C., Volpato, G., Wada, K. y Ayub, M. A. Z. 2008. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85** (10): 925-930.

Rodrigues, R. C. y Ayub, M. A. Z. 2011. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochem.* **46** (3): 682-688.

- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R. y Fernandez-Lafuente, R. 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **42** (15): 6290-6307.
- Rodrigues, J., Canet, A., Rivera, I., Osorio, N. M., Sandoval, G., Valero, F., y Ferreira-Dias, S. 2016. Biodiesel production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases. *Bioresour. Technol.* **213**: 88-95.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. y Locatelli, S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* **98** (3): 648-653.
- Saleh, J., Tremblay, A. Y., y Dubé, M. A. 2010. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. *Fuel.* **89** (9): 2260-2266.
- Schmid, R. D. y Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37** (12): 1608-1633.
- Shah, S. y Gupta, M. N. 2007. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochem.* **42** (3): 409-414.
- Sharma, S. y Kanwar, S. S. 2014. Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci. World J.* **2014**: 1-15.
- Sharma, Y. C., Singh B. y Upadhyay S. N. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel.* **87** (12): 2355-2373.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. y Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **17** (3): 133-142.
- Silva, J. A., Macedo, G. P., Rodrigues, D. S., Giordano, R. L. C. y Gonçalves, L. R. B. 2012. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem. Eng. J.* **60**: 16-24.
- Soriano, N. U., Venditti, R., y Argyropoulos, D. S. 2009. Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel.* **88** (3): 560-565.
- Soumanou, M. M. y Bornscheuer, U. T. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* **33** (1): 97-103.

Tacias-Pascacio, V.G., Rosales Quintero, A., y Torrestiana-Sánchez, B. 2016. Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **32** (3), 303-313.

Tacias-Pascacio, V. G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortiz, J. J. y Fernandez-Lafuente, R. 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* **6** (102): 100281-100294.

Tacias-Pascacio, V. G., Virgen-Ortíz, J. J., Jiménez-Pérez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A. y Fernandez-Lafuente, R. 2017. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel.* **200**: 1-10

Talukder, M. M. R., Wu, J. C., Van Nguyen, T. B., Fen, N. M. y Melissa, Y. L. S. 2009. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **60** (3): 106-112.

Tang, H., Wang, A., Salley, S. O., y Ng, K. S. 2008. The Effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85** (4): 373-382.

Tiwari, A. K., Kumar, A., y Raheman, H. 2007. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. *Biomass Bioenergy.* **31** (8), 569-575.

Tomasevic, A. V., y Siler-Marinkovic, S. S. 2003. Methanolysis of used frying oil. *Fuel Process. Technol.* **81** (1): 1-6.

Tongboriboon, K., Cheirsilp, B. y H-Kittikun, A. 2010. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **67**(1): 52-59.

Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. y Jones, T. A. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2** (4): 293-308.

Utlu, Z. y Koçak, M. S. 2008. The effect of biodiesel fuel obtained from waste frying oil on direct injection diesel engine performance and exhaust emissions. *Renew. Energy.* **33** (8): 1936-1941.

Varanda, M. G., Pinto, G., y Martins, F. 2011. Life cycle analysis of biodiesel production. *Fuel Process. Technol.* **92** (5): 1087-1094.

Vasudevan, P. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production—current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35** (5): 421-430.

Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M. , Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Ferreira-Dias, S., Bautista, F. y Romero, A. A. 2010. A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresour. Technol.* **101** (17): 6657-6662.

Virgen-Ortíz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., Hirata, D. B., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., y Fernandez-Lafuente, R. 2017. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.*, **96**, 30-35.

Wang, Y., Ou, S., Liu, P., y Zhang, Z. 2007. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. *Energ. Convers. Manage.* **48** (1): 184-188.

Wilson, L., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J. M. y Fernández-Lafuente, R. 2006. Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* **38** (7): 975-980.

Wu, W. H., Foglia, T. A., Marmer, W. N., Dunn, R. O., Goering, C. E., y Briggs, T. E. 1998. Low-temperature property and engine performance evaluation of ethyl and isopropyl esters of tallow and grease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (9): 1173-1178.

Wyse-Mason, R. R., y Beckles, D. M. 2012. An investigation of restaurant waste oil characteristics for biodiesel production in Trinidad and Tobago. *Energy Sustain. Dev.* **16** (4): 515-519.

Xu, Wei Du, Jing Zeng y Dehua Liu, Y. 2004. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. *Biocatal. Biotransformation.* **22** (1): 45-48.

Yousef, T., Al-Zuhair, S. y Al-Atabi, M. 2005. Performance of diesel engine using an emulsion of biodiesel-conventional diesel fuel. *J. Mech. Eng.* **56**: 137-142.

Zhang, Y., Dube, M. A., McLean, D. D., y Kates, M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresour. Technol.* **90** (3): 229-240.

Çetinkaya, M. y Karaosmanoğlu, F. 2004. Optimization of Base-Catalyzed Transesterification Reaction of Used Cooking Oil. *Energy Fuels*. **18** (6): 1888-1895.