



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA CATALÍTICO HÍBRIDO
(BIOLÓGICO – INORGÁNICO) PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIODIÉSEL A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS DE SEGUNDA
GENERACIÓN**

Por:

Edwin Rojo Gutiérrez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edwin Rojo Gutiérrez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Ramiro Baeza Jiménez
Director de tesis



Dra. Reyna Natividad Rangel
Integrante del comité de tesis



Dra. Rubí Romero Romero
Integrante del comité de tesis



Dr. José Juan Buenrostro Figueroa
Integrante del comité de tesis



Dr. David Roberto Sepúlveda Ahumada
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Desarrollo de un Sistema Catalítico Híbrido (Biológico-Inorgánico) para la Producción de Biodiésel a partir de Materias Primas de Segunda Generación” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edwin Rojo Gutiérrez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado la oportunidad de pertenecer al programa de doctorado impartido por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

Al CIAD por proveerme de todo lo necesario para fomentar mi desarrollo como estudiante e investigador, y poder hacer uso de todos los recursos, equipos e instalaciones que mi proyecto demandó. Agradezco a todas las personas que forman parte de la institución, ya que hicieron de mi estancia en el CIAD una gran experiencia. Por su gran amabilidad y permitirme formar parte de la gran familia que son.

A mi comité de tesis, quienes me guiaron y aconsejaron durante mi proyecto de tesis para crear un proyecto bien estructurado y profesional el cual estuviera a la altura de un doctorado. Agradezco directamente a las Dras. Reyna Natividad Rangel y Rubí Romero Romero por recibirme en una estancia académica con gran hospitalidad, el cual se realizó en una etapa crítica del desarrollo del proyecto donde siempre se trabajó en equipo y con base a su experiencia me apoyaron constantemente brindándome todo su tiempo y conocimientos que les era posible para crear un trabajo de calidad. Al Dr. David Roberto Sepúlveda Ahumada por su amistad duradera, por siempre alimentar de sobremanera mi análisis crítico y brindarme las bases y las herramientas que me preparen como el futuro investigador que soy; asimismo por todos esos consejos que benefician tanto mi vida profesional como personal. Doy especial mérito y agradecimiento al Dr. José Juan Buenrostro Figueroa debido a que, al formar parte del Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología, pudimos trabajar de la mano en donde siempre me brindó todo su apoyo y conocimiento, me enseñó y fungió como un elemento clave para guiarme a través de mi proyecto de tesis doctoral y obstáculos que se presentaron, además de la gran amistad que se generó.

Agradezco a la técnica M.C. Hilda Karina Sáenz Hidalgo, quien contribuyó a impulsar el desarrollo de este proyecto de tesis en sus primeras etapas, y apoyó arduamente a lo largo de la culminación del mismo. Por el gran equipo que se creó y nos permitió realizar un trabajo de calidad, en el que

siempre nos relacionamos con afecto y empatía como reflejo de la amistad que se concibió. De igual forma agradezco al técnico de laboratorio M.C. Emilio Ochoa, quien a pesar de que llegó a la institución en una etapa avanzada de mi proyecto, su colaboración permitió la culminación del presente trabajo en tiempo y forma. Siempre brindó un trato sumamente servicial, un excelente apoyo en cualquier ámbito, y una valiosa amistad.

Por último, pero no menos importante, de manera muy especial y sincera a mi director de tesis el Dr. Ramiro Baeza Jiménez. En primera instancia por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su apoyo incondicional dentro y fuera del ámbito académico, así como su confianza en mis capacidades para desarrollar este trabajo. Por su habilidad para guiar mis ideas e impulsar mi capacidad de razonamiento, el cual ha sido un aporte invaluable para mi formación como investigador, así como en mi vida personal. Por su tolerancia, orientación y *expertise*, los cuales han sido clave para el buen trabajo que hemos podido realizar. Por facilitarme siempre los medios suficientes para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo del presente trabajo doctoral. Y claro está por esa gran amistad que se forjó y fortaleció a lo largo del tiempo de conocernos. Muchas gracias Doctor.

DEDICATORIA

A mi esposa

Por transformar mi vida tan radicalmente, otorgarme esa seguridad en mi mismo y acogerme con felicidad todos los días. Por ser un pilar en mi vida al brindarme todo tu apoyo y amor incondicional. Por siempre permitirme e impulsarme a cumplir más metas en mi vida. Por compartir tu vida con la mía, nunca dejarme caer y brindarme el mayor tesoro que tenemos. Por enseñarme el verdadero significado de “amor eterno”.

A mi hijo

A quien estamos ansiosos de conocer y tenerlo entre brazos para darle todo el amor y cariño que se merece. Por ser nuestro mayor tesoro y motivación para dar lo mejor de nosotros cada día por el resto de nuestras vidas. Por cada momento que vas a regalarnos de felicidad. Por tener la bendición de ser tus padres.

A mis padres

Quienes de igual manera siempre me han otorgado todo su apoyo incondicional y se esforzaron día con día por darme lo mejor, alentándome siempre por conseguir mis sueños y metas sin objeciones. Por darme las bases para ser quien soy ahora. Por regalarme una parte de sus vidas para que yo hiciera la mía.

A mi hermano

A quien quiero incondicionalmente y siempre está ahí cuando lo necesito.

A mi Tía Blanca y Tío José

Por siempre apoyarnos en tiempos difíciles para salir adelante, tratándonos como a dos hijos más.

A mis abuelitas

Quienes partieron en un año difícil, pero dejaron tantas vivencias y recuerdos que no me queda mas que agradecer la oportunidad de haber convivido y ser nieto de dos personas tan maravillosas. Me aportaron tanto en la vida que... aunque a pesar de que las extrañamos arduamente y sopesemos mucho su partida, me llena más la alegría de lo mucho que las disfrute. Las quiero por siempre.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Materias Primas	18
1.1.1. Materias Primas de Primera Generación (MP1G).	18
1.1.2. Materias Primas de Segunda Generación (MP2G).	19
1.1.3. Materias Primas de Tercera Generación (MP3G).	21
1.1.4. Materias Primas de Cuarta Generación (MP4G).	25
1.2. Catalizadores	28
1.2.1. Catalizadores Homogéneos.....	28
1.2.1.1. Catalizadores Homogéneos Básicos.....	29
1.2.1.2. Catalizadores Homogéneos Ácidos.....	29
1.2.2. Catalizadores Heterogéneos.....	32
1.2.2.1. Catalizadores Heterogéneos Básicos.....	33
1.2.2.2. Catalizadores Heterogéneos Ácidos.....	33
1.2.2.3. Catalizadores Enzimáticos Inmovilizados.....	34
1.3. Tecnología y Configuración del Reactor.....	36
1.3.1. Reactor de Tanque Agitado (RTA).....	36
1.3.2. Reactor de Lecho Empacado (RLE)	37
1.3.3. Reactores de Lecho Fluidizado (RLF).....	38
1.3.4. Reactores de Membrana (RM).....	39
1.3.5. Reactores Asistidos por Ultrasonido (RAU)	39
1.3.6. Reactores Asistidos por Microondas (RAM).....	40
2. JUSTIFICACIÓN	44
3. HIPÓTESIS	45
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo General.....	46
4.2. Objetivos Específicos	46
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1. Biocatalizadores.....	47
5.2. Aceites	47
5.3. Monolitos.....	47
5.4. Reactivos	48
5.5. Extracción y Caracterización del Aceite de Semilla de Algodón (CSO)	48

CONTENIDO (continuación)

5.5.1. Prensado.....	49
5.5.2. Método de Soxhlet.....	50
5.5.3. Ultrasonido.....	50
5.5.4. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	51
5.5.5. Derivatización Total Selectiva.....	52
5.5.6. Análisis del Perfil de Ácidos Grasos.....	53
5.6. Obtención de Biodiésel a Partir de la Enzima Comercial.....	53
5.6.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Discontinuo.....	53
5.6.2. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Continuo.....	54
5.6.3. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	54
5.6.4. Análisis Cromatográfico.....	55
5.7. Preparación y Caracterización del Catalizador Híbrido (Biológico – Inorgánico).....	55
5.7.1. Inmovilización de CALB en Monolitos.....	55
5.7.2. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	56
5.7.3. Cálculo del Porcentaje de Inmovilización.....	56
5.7.4. Ensayo de Actividad Lipasa.....	57
5.8. Obtención de Biodiésel a Partir del Catalizador Híbrido.....	57
5.8.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Discontinuo.....	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
6.1. Primera Etapa (2018 – 2019): Obtención y Caracterización de las Materias Primas.....	59
6.1.1. Aceite de Fritura (WCO).....	59
6.1.2. Aceite de Semilla de Algodón.....	60
6.1.2.1. Contenido lipídico.....	60
6.1.2.2. Optimización del proceso de extracción.....	61
6.1.2.3. Perfil de ácidos grasos.....	65
6.2. Segunda Etapa (2019 – 2020): Obtención de Biodiésel a Partir de WCO y CSO con la Enzima Novozym 435®.....	66
6.2.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación.....	67
6.3. Tercera Etapa (2020): Desarrollo del Catalizador Híbrido.....	75
6.4. Cuarta Etapa (2021): Obtención de Biodiésel a Partir de WCO y CSO Utilizando el Catalizador Híbrido.....	79
7. CONCLUSIONES.....	84
8. RECOMENDACIONES.....	86
9. REFERENCIAS.....	87
10. ANEXOS.....	94
10.1. Curva Estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA).....	94
10.2. Curva Estándar de p-nitrofenol (p-NF) Utilizada en el Método de p-nitrofenol Palmitato (p-NFP).....	95

LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción de biodiésel (ésteres monoalquílicos de ácidos grasos) mediante la reacción de transesterificación con metanol (FAME) o etanol (FAEE).....	16
2. Mecanismo de la reacción de transesterificación para la obtención de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (biodiésel).	17
3. Parámetros tecnológicos y operativos involucrados en la síntesis de biodiésel. Elaboración propia.	23
4. Mecanismo de CALB para la producción de biodiesel a partir de triglicéridos.....	32
5. Gráficos de la optimización de las variables independientes durante el proceso de extracción de CSO.	62
6. Efecto de la carga enzimática en la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo.....	67
7. Efecto de la carga enzimática sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE).....	68
8. Efecto de la temperatura sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo.....	69
9. Efecto de la temperatura sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE).....	70
10. Efecto de la relación molar etanol:aceite sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo.	71
11. Efecto de la relación molar (etanol:aceite) sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE).	72
12. Reacción de transesterificación bajo las mejores condiciones de reacción encontradas para la enzima comercial Novozym 435 [®] con WCO (10% enzima, 40°C, relación molar 6:1 y 200 rpm).	73
13. Efecto del tiempo sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). Condiciones de reacción: 10% N435 [®] , 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (p < 0.005).....	74
14. Reacción de transesterificación bajo las mejores condiciones de reacción encontradas para la enzima comercial Novozym 435 [®] con CSO (10% enzima, 40°C, relación molar 6:1 y 200 rpm).	75
15. Cinética de inmovilización por adsorción física. Condiciones de inmovilización: 40°C, buffer de fosfatos Na (pH 6, 0.1 M) y relación 1:1 (CALB:Buffer).....	78
16. Reacciones de transesterificación catalizadas por el catalizador híbrido a partir de (a) WCO y (b) CSO, bajo las siguientes condiciones: 10% catalizador, 40°C, relación molar 6:1 y 200 rpm.....	80

LISTADO DE FIGURAS (continuación)

Figura	Pagina
17. Efecto del tiempo sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO, utilizando el catalizador híbrido. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40°C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).	81
18. Efecto de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) en presencia del catalizador híbrido. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40°C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).	81
19. Efecto de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) en presencia del catalizador comercial. Condiciones de reacción: 10% N435®, 40°C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).	82
20. Efecto del catalizador sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40°C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).	82
21. Efecto global de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40°C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).	83
22. Curva de calibración de BSA.	95
23. Curva de calibración de <i>p</i> -NF.....	96

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Diferentes sistemas de reacción evaluados para la síntesis de biodiésel a partir de aceite de fritura (WCO).	42
2. Diferentes sistemas de reacción evaluados para la síntesis de biodiésel a partir de aceite de semilla de algodón (CSO).	43
3. Factores evaluados durante el proceso de extracción de CSO bajo un diseño Box-Behnken 3^k	49
4. Diseño Box-Behnken aplicado en la extracción de CSO.	52
5. Rendimientos de extracción de CSO por tres diferentes métodos.	60
6. Coeficientes de regresión y valores P de los factores del modelo de segundo orden. ..	64
7. Perfil de ácidos grasos del CSO.	65
8. Efecto de las variables evaluadas durante el proceso de inmovilización de CALB en monolitos.	76
9. Resultados de curvas patrón de BSA.	94
10. Diluciones para la curva estándar de p-NF	95
11. Resultados curva patrón p-NF.	96

ABREVIATURAS

A1G	Aceites de primera generación
A2G	Aceites de segunda generación
A3G	Aceites de tercera generación
AG	Ácidos grasos
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGL	Ácidos grasos libres
AGS	Ácidos grasos saturados
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
CALB	Lipasa B de Candida antarctica
CSO	Aceite de semilla de algodón
EI	Enzima inmovilizada
EL	Enzima libre
FAEE	Éster etílico de ácidos grasos
FAME	Éster metílico de ácidos grasos
MP1G	Materias primas de primera generación
MP2G	Materias primas de segunda generación
MP3G	Materias primas de tercera generación
MP4G	Materias primas de cuarta generación
p-NF	p-nitrofenol
p-NFP	p-nitrofenol palmitato
RAM	Reactor asistido por microondas
RAU	Reactor asistido por ultrasonido
RLE	Reactor de lecho empacado
RLF	Reactor de lecho fluidizado
RM	Reactor de membrana
RTA	Reactor de tanque agitado
RTAC	Reactor de tanque agitado continuo
RTAD	Reactor de tanque agitado discontinuo
WAF	Grasas animales de desecho
WCO	Aceite de cocina utilizado

RESUMEN

La energía es un factor crítico para el estilo de nuestras vidas, el crecimiento económico e industrial alrededor del mundo. Sin embargo, hoy en día la energía sigue siendo dependiente de los combustibles fósiles, los cuales ocasionan grandes problemáticas tanto ambientales como económicas. Los biocombustibles como el biodiésel tienen el potencial de abordar la crisis energética y reemplazar gradualmente los combustibles no renovables. La producción de biodiésel enzimática ha captado una gran atención debido a su alta eficiencia, bajo consumo energético y protección ambiental. Sin embargo, el costo elevado de las enzimas, la complicada miscibilidad de los sustratos (alcohol, aceite), su inestabilidad, entre otros, han limitado el aprovechamiento de su potencial en la industria de manera sustentable. Para abordar estos problemas, se desarrolló un biocatalizador novedoso al utilizar monolitos de α -alúmina como soporte para la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) y así, emplear un nuevo proceso enzimático. La inmovilización enzimática se llevó a cabo por adsorción física, donde a 5 mL de mezcla (CALB:buffer, 1:1 v/v) se le adicionaron 0.5 mg de monolito pre-tratado, para posteriormente mezclarse a 200 rpm y 40°C durante 8 h. La máxima cantidad de lipasa adsorbida (35%) se logró obtener empleando un buffer de fosfatos de sodio (pH 6). El catalizador híbrido (orgánico-inorgánico) obtenido se utilizó para la transesterificación de aceite de semilla de algodón (CSO) y fritura (WCO) con etanol para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). La máxima producción de FAEE de 95.8 y 96.3% (WCO y CSO, respectivamente) se obtuvieron bajo las mejores condiciones de reacción encontradas: relación molar etanol:aceite de 6:1, 40°C de temperatura, 10% de carga enzimática (peso total de sustratos) y un tiempo de 7 h. La eficiencia catalítica del catalizador híbrido se comparó con reacciones catalizadas por CALB en su forma comercialmente disponible conocida como Novozym 435[®] (CALB inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa). Los resultados mostraron que el catalizador híbrido es tan eficiente como el comercial al no encontrarse diferencias significativas en la producción de FAEE bajo las mismas condiciones de reacción. El gran desempeño demostrado por el catalizador se le atribuyó a la estructura porosa única que conforma al monolito, así como la estabilidad mecánica y térmica inherente de la alúmina. Por lo tanto, el monolito mostró un gran potencial como soporte enzimático para el desarrollo de un nuevo y novedoso biocatalizador.

Palabras claves: catalizador, lipasa, monolito, biodiésel

ABSTRACT

Energy is a critical factor in our lifestyle, as well as in economic and industrial growth around the world. Nowadays, energy is still dependent on fossil fuels, leading to major environmental and economic problems. Biofuels, as biodiesel, have the potential to address the energy crisis and gradually replace non-renewable fuels. The enzymatic biodiesel production has attracted great attention due to its high efficiency, mild conditions, and environmental protection; even when the high cost of the enzymes, low miscibility of the substrates (alcohol – oil), their instability, among others, have limited the industrial use of their potential in a sustainable way. Therefore, in this thesis a novel biocatalyst was developed by using α -alumina monoliths as support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica* (CALB), to obtain biodiesel. Enzymatic immobilization was carried out by physical adsorption, where 0.5 mg of pre-treated monolith was added to a 5 mL of mixture (CALB: buffer, 1:1 v/v), which was further stirred at 200 rpm and 40°C, during 8 h. The highest immobilisation yield, 35%, was achieved using sodium phosphate buffer (pH 6). The hybrid catalyst (organic-inorganic) obtained was evaluated for the transesterification of cottonseed (CSO) and frying (WCO) oils with ethanol for the production of fatty acid ethyl esters (FAEE). The maximum FAEE productions were 95.8 and 96.3% (WCO and CSO, respectively), and they were reached under the best reaction conditions found: 6:1 (ethanol:oil) substrates ratio, 40°C, 10% enzyme loading (from the total weight of substrates) and 7 h. The catalytic efficiency of the hybrid catalyst was compared to reactions catalysed by CALB in its commercially available form, Novozym 435®. The results showed that our hybrid catalyst is as efficient as the commercial one, since any significant differences were observed in FAEE production under the same reaction conditions. The great performance demonstrated by our catalyst was attributed to the unique porous structure that makes up the monolith, as well as the inherent mechanical and thermal stability of alumina. Finally, the monolith exhibited great potential as an enzyme support for the development of a new and novel biocatalyst.

Key words: catalyst, lipase, monolith, biodiesel

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la ASTM (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales), el biodiésel se define como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga, derivados de aceites vegetales o grasas animales (ASTM, 2018).

El proceso convencional para la obtención de biodiésel es mediante una reacción de transesterificación, que consiste en una mezcla de triglicéridos (de origen vegetal o animal), un alcohol de cadena corta (metanol o etanol principalmente), y un catalizador (homogéneo o heterogéneo). En la Figura 1 se muestra esta reacción de transesterificación, en la que se obtienen ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol como productos finales.

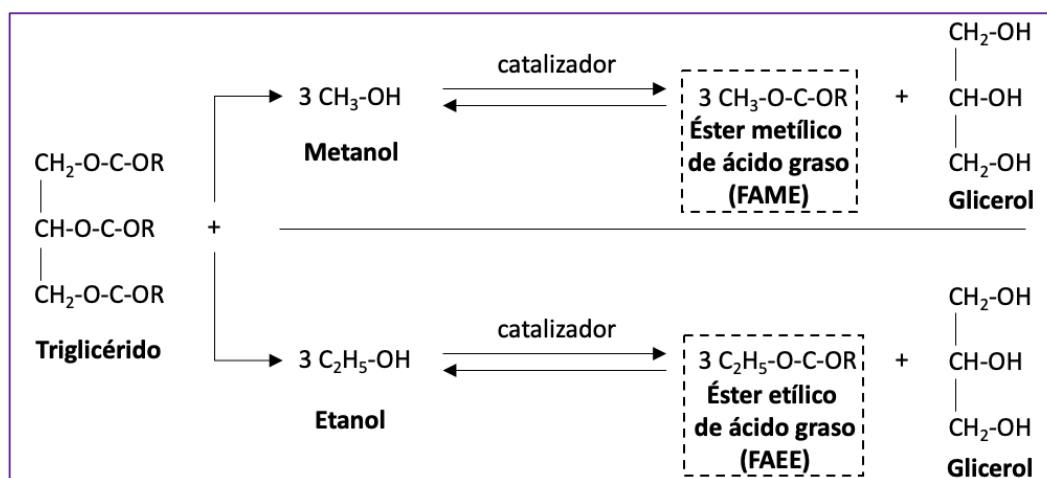


Figura 1. Producción de biodiésel (ésteres monoalquílicos de ácidos grasos) mediante la reacción de transesterificación con metanol (FAME) o etanol (FAEE).

Es importante destacar que durante la reacción de transesterificación disminuye la viscosidad de la materia prima. Esto es muy conveniente ya que se reduce el daño en los motores de combustión interna. Por lo tanto, el biodiésel presenta propiedades fisicoquímicas adecuadas para alimentar dichos motores. El mecanismo de la reacción de transesterificación se presenta en la Figura 2.

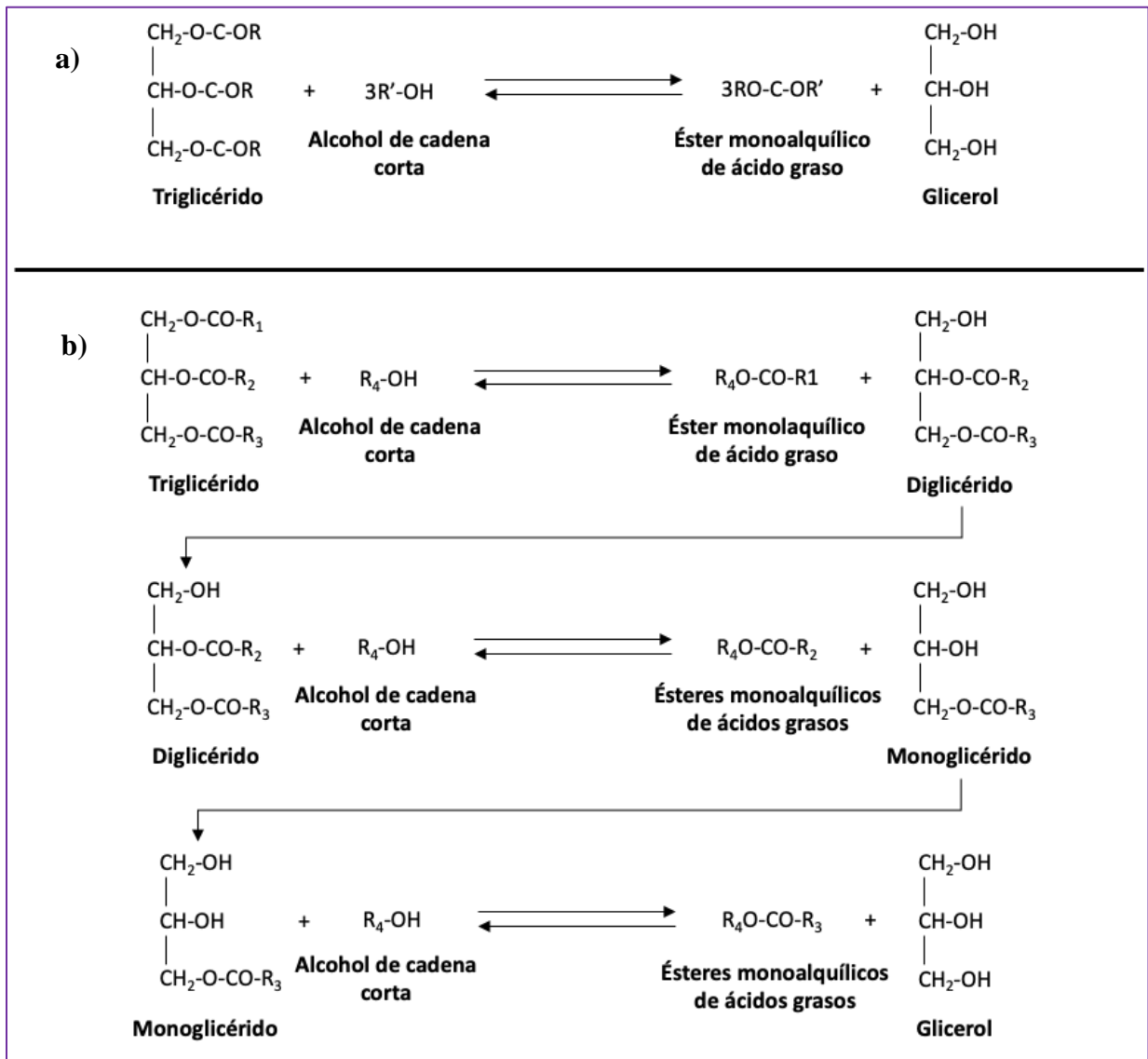


Figura 2. Mecanismo de la reacción de transesterificación para la obtención de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (biodiésel). a) Reacción de transesterificación general: R son las cadenas de carbono de los ésteres de ácidos grasos y R 'son los alcoholes. b) Reacción de transesterificación detallada: R₁, R₂ y R₃, son las cadenas de carbono de los ésteres de ácidos grasos y R₄ las de los alcoholes.

Haciendo una revisión de la literatura técnica, es posible encontrar diferentes estudios referidos al desarrollo de procesos tecnológica y económicamente factibles para producir biodiésel a nivel industrial. Sin embargo, es posible encontrar también limitantes que de manera significativa no han permitido la completa rentabilidad y sustentabilidad de la síntesis de biodiésel. Dichas limitaciones son: materias primas, catalizadores y configuración de reactores (Marchetti, 2012), y a continuación, se describen.

1.1. Materias Primas

Antes de permitirse la comercialización del biodiésel, éste debe cumplir con los estándares internacionales (legislaciones), los cuales establecen en general que el biodiésel debe presentar propiedades fisicoquímicas similares o mejores a las del diésel de petróleo, por ejemplo: contenido de azufre, viscosidad, punto de inflamación, punto de enturbiamiento, punto de fluidez, índice de cetano, capacidad calorífica, y ácido y carbono residual. Estas propiedades son fuertemente influenciadas por la materia prima empleada durante el proceso de obtención de biodiésel.

Otro aspecto importante a considerar es el costo propio de la materia prima, ya que es determinante para el costo total de producción. En algunos estudios se menciona que el costo de la materia prima representa alrededor del 60-88% del costo total de producción (Gui *et al.*, 2008; Fan, 2012; Yan *et al.*, 2014; Sajjadi *et al.*, 2016). Por lo tanto, hay una búsqueda constante para emplear aceites de bajo costo en la obtención de biodiésel (Diaz-Felix *et al.*, 2009). De acuerdo con su origen, las diferentes materias primas se clasifican en cuatro generaciones (ver Figura 3), y a continuación se describen.

1.1.1. Materias Primas de Primera Generación (MP1G).

Esta generación está constituida por los aceites comestibles más comercializados, siendo los primeros aceites empleados para la obtención de biodiésel. Estas materias primas abarcan hasta un 95% del mercado de la producción mundial de biodiésel, donde el aceite de colza es el más utilizado (84%), seguido de los aceites de girasol (13%), palma (1%), soya, entre otros (2%) (Sajjadi *et al.*, 2016). Las MP1G son la principal fuente para satisfacer la demanda debido al alcance actual de su desarrollo tecnológico y amplio conocimiento. Además, todos los aceites comestibles son sometidos a un proceso de refinado para la seguridad alimentaria, por lo que son la generación que presenta la composición química más adecuada para el empleo de catalizadores alcalinos, los cuales son los catalizadores convencionales dentro del proceso de producción industrial de biodiésel. Por lo tanto, la comunidad científica aún desarrolla investigaciones en las que se busca una producción

industrial sustentable de biodiésel a partir de aceites comestibles.

Como se mencionó anteriormente, las MP1G se someten a un cierto procesamiento para ser aptos para su consumo. Es por ello que el biodiésel producido a partir de aceites comestibles cumple fácilmente con los estándares internacionales. Sin embargo, el uso de estos aceites es controversial: ¿se dejará de consumir aceites para alimentar coches? Esto implicaría el sacrificio de la tierra cultivable para la siembra de alimentos, para cultivar un biocombustible cuando alrededor de 821 millones de personas pasan hambre (FAO, 2013). En resumen, el uso de estas materias primas a futuro implicaría una crisis alimentaria, un gran impacto ambiental (deforestación), provocaría una inflación de los precios del petróleo, entre otros. Por tanto, se implementó la búsqueda de materias primas alternas que no compitieran con la cadena alimentaria. Como resultado, surgieron las materias primas de segunda, tercera y actualmente se trabaja en una cuarta generación.

1.1.2. Materias Primas de Segunda Generación (MP2G).

Las denominadas MP2G incluyen aceites no comestibles (ricino, jatrofa), materiales lignocelulósicos, así como residuos agroindustriales (semilla de algodón) y del procesamiento de alimentos (aceite de cocina usado y grasa animal). Todas estas fuentes lipídicas son alternativas potenciales a las MP1G debido a que no son aptas para el consumo humano (Bhuiya, 2014). Otras ventajas relevantes que distinguen a las MP2G son: su capacidad para crecer en terrenos baldíos, cuidado y mantenimiento de cultivo sencillos, y bajos costos de producción, lo cual permite una síntesis de biodiésel más rentable (Gui *et al.*, 2008, Avhad y Marchetti, 2015). Por tanto, este tipo de aceites son eficientes y ecológicos. Lamentablemente, muchas de las MP2G son desaprovechadas como sucede con el aceite de cocina usado (WCO, por sus siglas en inglés). El WCO es un aceite de desecho de muy bajo costo (Al-Hamamre *et al.*, 2014) que comúnmente se desaprovecha al verterse en el sistema de alcantarillado produciendo un gran impacto ambiental. Tomando en cuenta las altas cantidades de WCO generadas por año, su bajo costo y su nula competencia con la cadena alimenticia, se evidencia la relevancia del WCO como materia prima para la obtención de biodiésel.

Sheinbaum-Pardo *et al.* (2013) reportaron que la capacidad energética del WCO puede oscilar entre 7.8 PJ y 17.7 PJ, lo que equivale al 1.5 – 3.3% del diésel de petróleo utilizado para el transporte, y

una disminución de las emisiones de CO₂ entre 1 – 2.7%. Es necesario aplicar un pretratamiento al WCO para que la reacción se desarrolle de manera eficiente durante la producción de biodiésel. Primero, las partículas no deseadas, como las partículas sólidas de alimentos, se separan por filtración. Luego, el agua contenida se elimina mediante calor y tamices moleculares. Por último, se lleva a cabo un proceso de desgomado para evitar que los compuestos distintos a los triglicéridos (es decir, gomas y fosfolípidos) interfieran con los rendimientos de la transesterificación. Este último se aplica comúnmente a todas las MP2G.

Por otro lado, grasa animal (WAF, por sus siglas en inglés) es una de las principales materias primas de los países con mayor producción de biodiésel como Malasia, Indonesia, Argentina, EE. UU., Brasil, España, etc., y suministra el 20% de su producción total de biodiésel (Banković-Ilić *et al.*, 2014). La WAF también exhibe un potencial para la producción de biodiésel debido a las grandes cantidades que se generan durante el procesamiento de la carne de res y de la industria cárnica en general. La WAF representa la masa de algunos animales que no es apta para el consumo humano, la cual varía dependiendo del tipo de ganado, como por ejemplo entre las vacas (49%), cerdos (44%) y aves de corral (37%) (Toscano *et al.*, 2011).

La producción de WAF no puede abastecer y reemplazar completamente al diésel de petróleo por si solo, pero es barato, está disponible en todo el mundo, y puede reducir en gran medida el uso de MP1G. Además, la explotación de la WAF representa un mejor aprovechamiento de la tierra, ya que los mismos campos que se utilizan para la obtención de alimentos, también proporcionarían materia prima para biocombustibles, evitando así que estas se desaprovechasen y terminaran en rellenos sanitarios y convertirse en un foco de contaminación ambiental.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se empleó CSO como una materia prima prometedora en la síntesis de biodiésel. El algodón es uno de los cultivos comerciales de mayor importancia económica alrededor del mundo por su uso industrial. México es el noveno país con mayor producción mundial alcanzando las 376 mil toneladas métricas (2018/19), donde el estado de Chihuahua se destacó al contribuir con aproximadamente el 70% de la producción nacional (Rojo-Gutiérrez *et al.*, 2020a). Sin embargo, de acuerdo con los datos reportados por la SIAP (2017), se registraron 17, 373 toneladas de residuo, el cual incluye a la semilla de algodón (Rojo-Gutiérrez *et al.*, 2020b). Por tanto, nuestra investigación pretende promover el uso de este residuo agroindustrial y darle valor agregado a sus sub-productos.

1.1.3. Materias Primas de Tercera Generación (MP3G).

Esta generación de materias primas está constituida por algas (tanto micro como macro-algas) y algunas especies de bacterias (*Rhodococcus opacus*, *Leptolyngbya* sp.) Al igual que las MP2G, estos aceites no son comestibles, por lo que tampoco se ven limitados por la competencia con los alimentos.

El uso de algas para la obtención de biodiésel presenta una gran oportunidad por su alta productividad de lípidos en comparación con los aceites comestibles (Demirbas, 2009). Asimismo, tampoco compiten con los cultivos alimentarios ni con las tierras cultivables, ya que prácticamente pueden crecer en cualquier lugar, contando con la suficiente cantidad de luz solar (Morand, 2015; Nigam y Singh 2010). Incluso pueden desarrollarse en tierras no cultivables, así como utilizar agua salina como medio de cultivo. A diferencia de las MP1G y MP2G, las algas presentan tanto ciclos de recolección como velocidades de crecimiento más altas (Schenk *et al.*, 2008; Alaswad *et al.*, 2015). Algo importante a destacar sobre las algas, es el hecho de que son capaces de crecer en aguas residuales. Esto significa que por un lado se puede lograr la biorremediación y por otro lado se dispone de un medio de cultivo sin costo (Allen *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). La principal diferencia entre las micro y macro-algas, radica en su contenido de lípidos. Las macroalgas alcanzan un contenido de lípidos <5% (peso seco) y pueden recolectarse fácilmente debido a su mayor tamaño (por ejemplo, algas marinas), mientras que algunas especies de microalgas pueden producir y acumular hidrocarburos hasta en un 30-80% de su peso en seco, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Esto permite la obtención de mayores cantidades de aceite en comparación con la soya, en la misma zona de cultivo (Kong *et al.*, 2007). Dragone *et al.* (2010) mencionan que las microalgas pueden producir de 15 a 300 veces más biodiésel que el cultivo tradicional en base a la superficie. El contenido de aceite en las microalgas puede superar el 80% del peso seco de la biomasa, pero los niveles que se han logrado alcanzar son del 50% (Spolaore *et al.*, 2006). Algunas microalgas pueden duplicar su biomasa en 1 día, pero durante el crecimiento exponencial se ha logrado alcanzar después de 3.5 h (Chisti, 2007). Esta podría ser la razón por la que las microalgas se han estudiado más en comparación con las macroalgas para la síntesis de biodiésel.

En general, la cosecha de algas requiere luz, CO₂, agua, elementos inorgánicos y un estricto control de temperatura, lo cual implica elevados costos de inversión (infraestructura) y producción

(separación y depuración del producto). Por otro lado, la eficiencia de la cosecha de algas se encuentra fuertemente relacionado con la tecnología y configuración del reactor aplicado. Los reactores preferidos son los de tipo burbuja, debido a que la entrada de gas proporciona la turbulencia suficiente para la correcta mezcla de nutrientes y la interacción entre células y luz, sin causar daños por agitación mecánica. En términos de energía, se ha encontrado que la demanda energética para la cosecha de algas utilizadas en la producción de biodiésel, es mayor que la cantidad real de energía obtenida durante la combustión del biodiésel (Petkov *et al.*, 2012). Por lo tanto, la producción industrial de biodiésel a partir de algas aún se encuentra muy limitada y requiere de más estudios (Schürken y Kempers, 2009; Petkov *et al.*, 2012; Ghadiryanafar *et al.*, 2016).

En cuanto a las bacterias, estas células son excelentes mitigadores de CO₂ y son capaces de transformarlo en compuestos de valor agregado como el biodiésel. Las bacterias necesitan un área de cosecha más reducida que las microalgas, pero presentan una menor acumulación promedio de lípidos (20-40% de la masa seca); sin embargo, las bacterias permiten una obtención de mayores cantidades de biodiésel debido a su rápida velocidad de crecimiento y medios de cultivo simples (Meng *et al.*, 2009). De acuerdo con Srinophakun *et al.* (2017), el cultivo de *Arthrobacter* AK19 en glicerol crudo o puro como única fuente de carbono, es una materia prima prometedora para el biodiésel.

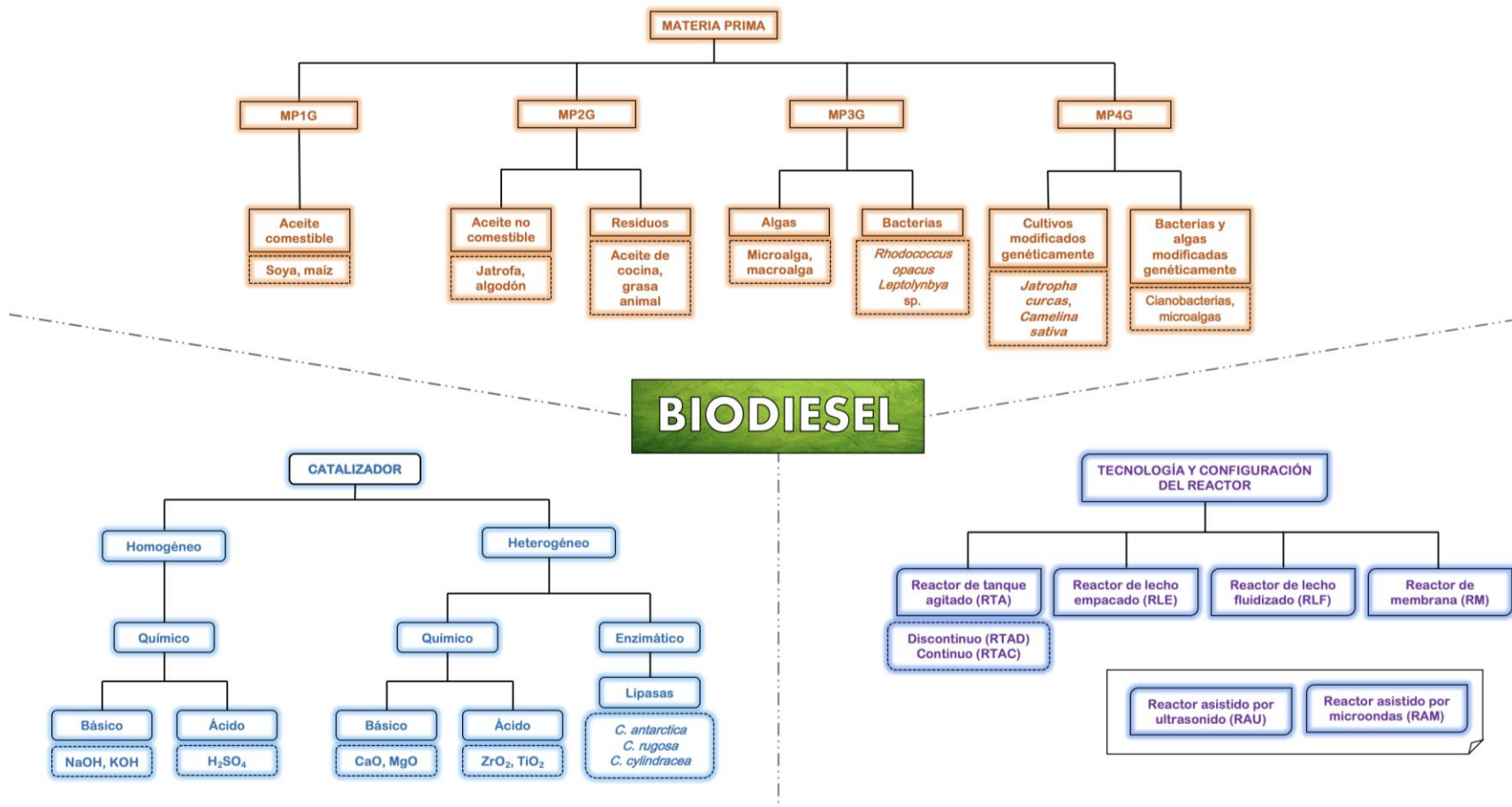


Figura 3. Parámetros tecnológicos y operativos involucrados en la síntesis de biodiesel (Fuente: Elaboración propia).

El perfil de ácidos grasos determinado incluye un contenido elevado de ácidos grasos (AG) insaturados (C18:2), que es comparable con las MP1G. Maheshwari *et al.* (2018) observaron que el *Bacillus sp.* SS105 mostró una alta producción de lípidos, compuesta por un 51% de AG saturados y un 49% insaturados. El perfil de AG incluye principalmente C16:0 (37%) y C18:1 (37.88%), los cuales son importantes para la calidad del biodiésel producido. A su vez, se ha explorado una estrategia biológica para una producción sustentable de biodiésel mediante la simbiosis de bacteria-alga (Wang *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2018). Sin embargo, se requieren más estudios para la producción comercial de biodiésel utilizando microorganismos. Para indicar las diferencias entre las materias primas a emplear, se pueden describir dos factores clave: 1) el rendimiento de aceite y 2) el perfil de AG. El rendimiento depende del cultivo utilizado. En el caso de las microalgas, estas pueden llegar a producir la sobresaliente cantidad de 136, 900 L/ha, mientras que otros cultivos populares como la jatrofa o la soya, tienen una producción estimada de 1, 892 y 446 L/ha, respectivamente (Chisti, 2007; Tahir *et al.*, 2012). En segundo lugar, el perfil de AG también depende de la materia prima. Cabe mencionar que no todos los aceites y grasas vegetales pueden ser adecuados para la síntesis de biodiésel. La estabilidad oxidativa es uno de los parámetros que debe poseer el biodiésel y está directamente influenciado por los residuos de AG saturados (AGS) e insaturados (AGI), ya que afecta directamente la calidad y vida útil del biodiésel. Una composición principal de AGS y monoinsaturados de alto peso molecular, combinada con un bajo contenido de AG poliinsaturados de las materias primas mejora la estabilidad de la oxidación del biodiésel, sin comprometer otros parámetros de calidad como el flujo en frío (Aslam *et al.*, 2018). Tras un análisis de diversos estudios, se encontró que los residuos de AG mayoritarios y presentes en la mayoría de las MP-1G, -2G y -3G, son los ácidos: palmítico (C16:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). No obstante, las MP1G comúnmente presentan relaciones de AGS/AGI más bajas (≤ 0.2), con respecto a las MP2G (≤ 4.0) y MP3G (≤ 1.8) (Yaakob *et al.*, 2013; Pumrojana *et al.*, 2015; Bikker *et al.*, 2016; Sajjadi *et al.*, 2016; Srinophakun *et al.*, 2017).

Los perfiles, y en consecuencia las relaciones AGS/AGI, tienen una explicación bioquímica. Tanto para el WAF como para las algas, se presenta una mayor cantidad de AGS, que están relacionados con la reserva energética en forma de triglicéridos. En cambio, en otros cultivos y en las bacterias los lípidos se ven involucrados principalmente en la fotosíntesis, debido a que este tipo de células utilizan la mayoría de las grasas en la producción de otros metabolitos, mientras que una pequeña cantidad se destina a la estructuración de la membrana celular.

1.1.4. Materias Primas de Cuarta Generación (MP4G).

Las MP4G son las más recientes y comprende a los cultivos (comestibles, no-comestibles) y microorganismos (cianobacterias, microalgas) modificados genéticamente. Aún se encuentran en etapa conceptual o desarrollo prematuro, por lo que probablemente no se implementen de manera gradual en la industria hasta en un periodo de 10 – 20 años (Aro, 2016). Los cultivos modificados genéticamente son de gran relevancia para abordar los problemas de sustentabilidad involucrados en la producción de biodiésel, como sus altos costos, poca disponibilidad, y una composición química indeseada del aceite obtenido. Las propiedades fisicoquímicas de los aceites vegetales podrían mejorarse para obtener una composición específica que provea un biodiésel de alta calidad. A su vez, sus costos podrían disminuirse al aumentar los rendimientos del cultivo (número de plantas por hectárea cultivable) (Wan *et al.*, 2017).

La modificación genética de los cultivos se rige bajo las siguientes estrategias principales: (i) la modificación de los genes clave involucrados en la ruta metabólica de los triglicéridos, así como también los que delimitan el tamaño de la semilla y el grado de crecimiento de la planta, con la finalidad de potenciar su contenido de aceite y madurez necesaria para su productividad comercial; (ii) la supresión de genes involucrados en la biosíntesis de ciertos AG y metabolitos tóxicos (en caso de contenerlas) en búsqueda de una composición de aceite deseada; (iii) fortalecer la tolerancia hacia factores bióticos (pestes y enfermedades) y abióticas (clima, propiedades del suelo) para facilitar su cultivación bajo condiciones inadecuadas en las que normalmente son susceptibles; (iv) disminuir los costos y la huella ambiental derivada del desarrollo de la materia prima (Wan *et al.*, 2017; Jouzani *et al.*, 2018).

Al presentar los cultivos comestibles el mayor desarrollo tecnológico y las bases de investigación más sólidas, no es sorprendente que sean las materias primas con mayores avances dentro del área de la ingeniería genética (Akashi y Nanasato, 2018). Sin embargo, al ser MP1G el conflicto combustible vs comida sigue siendo la principal limitante. Es por ello que los cultivos no comestibles demuestran nuevamente ser una opción más sustentable. Algunos genomas completos de plantas pertenecientes a las MP2G como el ricino (*Ricinus communis*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), el haba de la india (*Milletia pinnata*), jatrofa (*Jatropha curcas*) y el sésamo bastardo (*Camelina sativa*) ya se encuentran identificadas (Chan *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2013; Mudalkar

et al., 2014; Wu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017). Esta información facilitará el descubrimiento y entendimiento de los mecanismos de las rutas y genes que determinan la producción y calidad del aceite de los cultivos. La jatrofa al ser una de las plantas oleaginosas más populares dentro de las MP2G por su gran adaptación a condiciones marginales agronómicas, ya ha sido sometida a estudios en donde se ha logrado incrementar su acumulación de lípidos (Kim *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2018), modificar la composición química del aceite (Qu *et al.*, 2012), obtener una floración temprana (Li *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2018), mayor tolerancia contra factores bióticos y abióticos (Ye *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2013), entre otros.

De manera similar que los cultivos modificados genéticamente, a través de los microorganismos fotosintéticos modificados genéticamente (microalgas y cianobacterias) se busca promover ciertas características que puedan dar solución a las principales limitantes de las MP3G, para lograr una producción más sustentable de biodiésel. Algunos ejemplos son el incrementar la eficiencia fotosintética (mayor rendimiento biomasa), el grado de producción de biomasa, el contenido de aceite de la biomasa, la tolerancia hacia la temperatura (menos costos de energía), y la penetración de la luz para reducir la fotoinhibición (Dismukes *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2017; Tandon and Jin, 2017).

La modificación genética de microalgas y cianobacterias podría acelerar su implementación en la industria del biodiésel al permitir un proceso económicamente factible. Se espera reducir sensiblemente los costos de producción, al convertir la energía solar directamente en biodiésel (biodiésel solar fotobiológico), utilizando agua, luz y CO₂; materias primas inagotables, baratas y ampliamente disponibles (Aro, 2016). De esta manera, el número de etapas de la producción de biodiésel se reducirá significativamente, además que se pretende que el biocombustible sea excretado continuamente por las cianobacterias y microalgas sin la necesidad de emplear técnicas de extracción que eleven los costos. Adicionalmente, al consumirse el CO₂ producido constantemente, este se capturaría y fijaría antes de liberarse al medio ambiente, por lo que las MP4G demuestran el mayor potencial para la mitigación de la emisión de gases (Lü *et al.*, 2011). Gosh *et al.* (2016) y Moravvej *et al.* (2017) reportaron una extensa revisión de una amplia variedad de estudios, donde la modificación genética de cianobacterias y microalgas se realizó de manera satisfactoria. Se explican las diferentes herramientas utilizadas (selección de genes indicadores y marcadores, secuenciación, entre otros) en la manipulación genética para la promoción de su contenido de lípidos y eficiencia fotosintética.

Cabe mencionar que la modificación genética de microalgas ha recibido una especial atención en el desarrollo de biocombustibles debido a que el CO₂ que liberan es menor al que consumen (Abdullah *et al.*, 2019), por lo que contribuyen con el 40% de la reducción atmosférica global de CO₂ (Chew *et al.*, 2018). Avances recientes en la modificación genética de algas han conducido al desarrollo de herramientas de ingeniería genética y biología molecular, los cuales han permitido con el apoyo de herramientas biológicas computacionales, el descubrimiento y modificación de rutas metabólicas, así como la manipulación precisa y eficiente de genomas con el fin de obtener cultivos óptimos para la producción de biocombustibles (Godbole *et al.*, 2021). De acuerdo con lo reportado en la literatura, las principales especies de microalgas sometidas a diferentes técnicas de modificación genética (nucleasa de dedos de zinc, nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) incluyen a las siguientes: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella variabilis*, *Chlorella sorokiniana*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella vulgaris*, *Navicula saprophila*, *Cyclotella cryptica*, *Phaeodactylum triconutum*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Nannochloropsis salina*, *Synechocystis 6803*, *Synechococcus UTEX 2973*, *Nannochloropsis oceanica*, *Tetrateles* sp., entre otros (Godbole *et al.*, 2021; Shokravi *et al.*, 2021). Dichos estudios reportan resultados satisfactorios en el incremento de contenido de lípidos (Tan y Lee, 2017; Xue *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018), biomasa (Kwak *et al.*, 2017; Vikramathithan *et al.*, 2020) y crecimiento (Vikramathithan *et al.*, 2020).

Las MP4G podrían ser las más contundentes para una producción eficiente de biodiésel al diseñar las combinaciones biológicas artificiales de cianobacterias y microalgas, de tal manera que satisfagan los requisitos técnicos y económicos pautados por la creciente demanda energética (Moravvej *et al.*, 2017). Sin embargo, la falta de información genética y biológica de los microorganismos fotosintéticos es una de las principales limitaciones al ser un tópico a principios de desarrollo.

Es importante denotar que la modificación genética, aunque pueda ser el vehículo para lograr la sustentabilidad antes mencionada, también restringe la aplicación de MP4G debido a que existen regulaciones de diversa rigurosidad en diferentes países, así como el tema de la aceptación pública (Abdullah *et al.*, 2019; Mat Aron *et al.*, 2020). Igualmente, es necesario la implementación de arduos estudios para el control de riesgos ambientales y salubres (toxicidad, cambios en el medio ambiente o ecosistemas, etc.) (Gosh *et al.*, 2016; Mat Aron *et al.*, 2020), así como políticas gubernamentales para el manejo de deshecho de residuos (aguas residuales con material genético)

(Abdullah *et al.*, 2019). Más allá del latente peligro que representan para el medio ambiente, la producción insuficiente de biomasa como los altos costos de producción impiden la producción a escala industrial (Leong *et al.*, 2018). Los cultivos modificados genéticamente hasta la fecha solo se han evaluado a nivel laboratorio, por lo que es necesario llevar a cabo ensayos de campo para evaluar su eficiencia, productividad y bioseguridad para su completa adaptación industrial (Jouzani *et al.*, 2018; Akashi y Nanasato, 2018).

1.2. Catalizadores

Entre las diferentes reacciones que se pueden utilizar para la obtención de biodiésel, la transesterificación es la más estudiada con respecto a la formación de microemulsiones o pirólisis. Durante la transesterificación, los triglicéridos interactúan con un alcohol de cadena corta para producir los correspondientes ésteres monoalquílicos y glicerol. Por la naturaleza química de los reactivos empleados, la integración total de los mismos para la obtención de una mezcla homogénea es todo un reto. Es por ello que la adición de un catalizador es un factor determinante para lograr un proceso más eficiente, ya que acelera la interacción entre los sustratos, mejorando los rendimientos obtenidos. En ese sentido, se han evaluado varios tipos de catalizadores, incluidas las enzimas, con el fin de alcanzar las cantidades máximas de biodiésel y se describen a continuación.

1.2.1. Catalizadores Homogéneos

Los catalizadores homogéneos son los más utilizados en la industria del biodiésel. Se emplean de manera sencilla, la transesterificación se lleva a cabo de forma rápida y en condiciones de reacción moderadas. Debido a que estos catalizadores se consumen durante la reacción, no pueden reutilizarse y esto representa un gran inconveniente. Otras desventajas son que la separación del glicerol generalmente es complicada y los pasos de purificación para la recuperación del biodiésel

producen aguas residuales, ya que contienen residuos del catalizador aplicado (Semwal *et al.*, 2011). Además, el proceso de eliminación del catalizador exige un alto consumo de agua. Esto no solo aumenta el costo total de producción, sino que disminuye la sustentabilidad del proceso. A pesar de estas desventajas, los catalizadores homogéneos comúnmente proporcionan altos rendimientos de transesterificación, en períodos de tiempo más cortos, en comparación con los catalizadores heterogéneos (De Lima *et al.*, 2016). Los catalizadores homogéneos empleados en la transesterificación de AG, se clasifican en químicos (básicos y ácidos) y enzimáticos.

1.2.1.1. Catalizadores homogéneos básicos. Son los catalizadores que más aceleran la reacción de transesterificación, llegando a ser hasta 4000 veces más rápida que al utilizar un catalizador ácido (Kulkarni y Dalai, 2006). Las condiciones de reacción son moderadas (baja temperatura y presión atmosférica) (Freedman *et al.*, 1984), son baratos y de fácil adquisición (Loterio *et al.*, 2005). Están conformados por sales inorgánicas como KOH, NaOH, CH₃ONa y CH₃OK. Sin embargo, su uso se limita a MP1G, debido a que los aceites que contienen más del 0.5% (en peso) de ácidos grasos libres (AGL) o un índice de acidez menor a 1 mg KOH/g, provocan una reacción de saponificación (Felizardo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Si el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la saponificación, se produce la desactivación del catalizador y en consecuencia una reducción drástica del rendimiento de biodiésel, además de complicarse los procesos de separación y purificación (Nag, 2008).

Por otra parte, altos contenidos de agua en los aceites producen efectos similares a los ocasionados por los AGL, al activar el proceso de la hidrólisis (Felizardo *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Catalizadores homogéneos ácidos. Ante las limitaciones que presentan los catalizadores básicos frente a materias primas con altos valores de AGL y agua, el grupo de catalizadores ácidos presenta una clara ventaja. Ácidos como el H₂SO₄, H₃PO₄ y HCl se han evaluado y propuesto como alternativa, los cuales pueden llevar a cabo las reacciones de esterificación y transesterificación simultáneamente (Jacobson *et al.*, 2008).

Lo anterior permite desarrollar un proceso más económico que la catálisis básica, ya que ésta última exige que las materias primas con un alto contenido de AGL se sometan a un proceso adicional

(esterificación) para convertir el exceso de ácidos carboxílicos en ésteres, y así evitar la saponificación (Zhang *et al.*, 2003). Aunado a esto, dado que se pueden usar aceites no refinados, es posible disminuir el costo total de producción del biodiésel al ser más baratos (Dehkhoda, 2010). El contenido de agua, por otro lado, sigue representando un problema porque puede causar la desactivación del catalizador (Canakci y Van Gerpen, 1999).

Algunas desventajas de los catalizadores ácidos son un menor rendimiento de biodiésel, tiempos de reacción más largos (≥ 4 h), temperaturas más altas ($\geq 100^\circ\text{C}$), así como relaciones elevadas de alcohol-aceite (Tariq *et al.*, 2012). Adicionalmente, el uso de este grupo de catalizadores implica graves daños por corrosión en los equipos utilizados e impacto ambiental por los residuos generados (Freedman *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2008). Por lo tanto, se necesitan materiales especiales y costosos para poderse realizar estos procesos.

1.2.1.3. Catalizadores enzimáticos (forma libre). Otro grupo de catalizadores versátiles son las enzimas. Estos biocatalizadores juegan un papel importante en la actividad celular y dependiendo su origen exhiben una actividad específica. Dos importantes familias de enzimas son empleadas en la modificación de lípidos: lipasas y fosfolipasas; aisladas principalmente de hongos, bacilos y levaduras (Borrelli y Trono, 2015). Dichas enzimas pueden catalizar reacciones de acidólisis, alcoholisis, esterificación e hidrólisis, como consecuencia de sus elevadas selectividad y especificidad por los sustratos sobre los que actúan, derivando en valores de rendimientos y productividades elevados y una reducida formación de subproductos. A diferencia de los catalizadores heterogéneos convencionales, las enzimas operan bajo condiciones suaves de reacción, lo que contribuye a reducir el consumo de energía y a preservar su actividad catalítica.

Al decir forma libre (EL), nos referimos a que la enzima no se encuentra contenida o unida a algún soporte, por lo que su actividad catalítica es alta y la transferencia de masa es fluida debido a su naturaleza líquida; por lo tanto, se pueden lograr tiempos de reacción más rápidos que en su forma inmovilizada (Amoah *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha reportado también que las EL son propensas a la agregación lo cual reduce sus sitios activos y en consecuencia aumentan significativamente los tiempos de reacción (Iso *et al.*, 2001).

Las lipasas se han empleado principalmente en la síntesis enzimática de biodiésel han sido aisladas y purificadas de *Candida antarctica* (CALB), *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*,

Pseudomonas cepacian, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus alger* y *Rhizodpus delemar* (Guldhe *et al.*, 2015), y han sido aplicadas en forma libre o inmovilizadas. Entre las ventajas a desatacar de estas enzimas podemos mencionar: 1) no se ven afectadas por el contenido de AGL o agua, 2) pueden catalizar simultáneamente las reacciones de transesterificación y esterificación, y 3) el glicerol obtenido presenta una mejor calidad con respecto al obtenido con catalizadores químicos y, 4) no tiene lugar la saponificación (Antczak *et al.*, 2009; Poppe *et al.*, 2015; Norjannah *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante mencionar también existen desventajas en el uso de EL: 1) costos elevados que limitan el escalamiento del proceso, 2) reducción de la actividad catalítica por un efecto inhibitor del alcohol empleado (Norjannah *et al.*, 2016) y, 3) al encontrarse en forma libre no es posible recuperarlas ni reutilizarlas. El uso de catalizadores enzimáticos permite alcanzar altos rendimientos de biodiésel (92-97% aproximadamente) (Nielsen *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018), sin embargo, son susceptibles a altas temperaturas, pH, y a los sustratos (ej. alcoholes) y subproductos (ej. glicerol) involucrados en el proceso de transesterificación, induciendo su inactivación por desnaturalización o efectos de inhibición (Zanette *et al.*, 2014; Norjannah *et al.*, 2016; Pedro *et al.*, 2019). El mecanismo de acción de CALB (ver Figura 4) para catalizar la transesterificación consiste en los siguientes pasos:

- a) Adición nucleofílica para formar el complejo enzima-sustrato, donde el nucleófilo es el oxígeno del grupo O-H en la enzima.
- b) Un protón se transfiere desde el ácido conjugado de la amina al átomo de oxígeno alquilo del sustrato, y se forma un acilglicerol. Si un trlicérido es el sustrato inicial, se forma un diglicérido, mientras que, si el diglicérido es el sustrato, un monoglicérido es lo que se formaría.
- c) El átomo de oxígeno de una molécula de alcohol se añade al átomo de carbono del C = O del intermediario acil-enzima para formar el complejo enzima acilada-alcohol.
- d) El átomo de oxígeno del complejo de la enzima se elimina y un protón se transfiere desde el ácido conjugado de la amina, formándose el éster metílico (o etílico si alcohol empleado es etanol) de ácido graso.

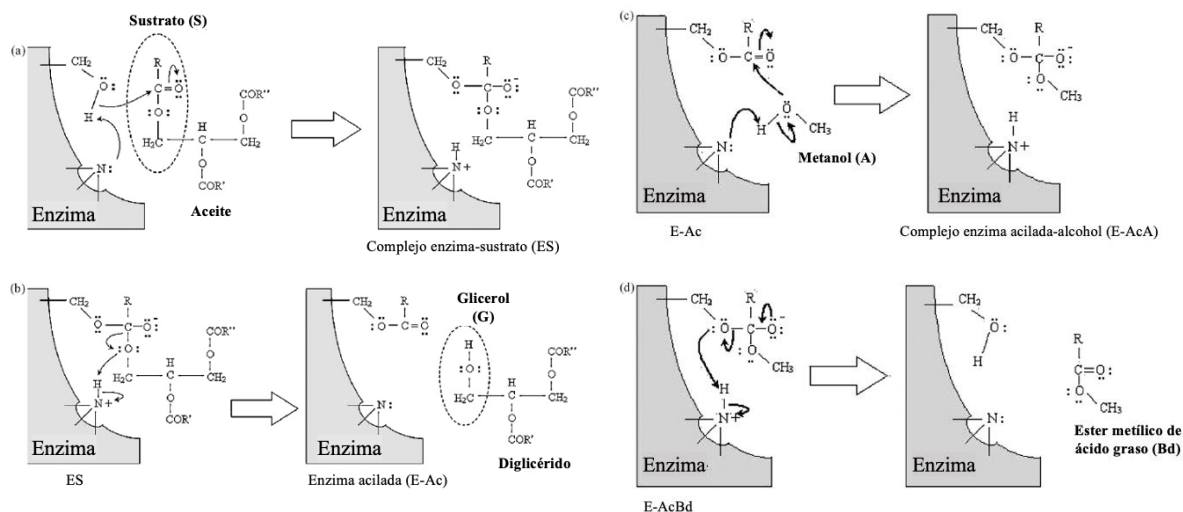


Figura 4. Mecanismo de CALB para la producción de biodiesel a partir de triglicéridos (Alz-Zuhair et al., 2007)

1.2.2. Catalizadores Heterogéneos

A diferencia de los catalizadores homogéneos, la catálisis heterogénea ofrece una recuperación relativamente fácil del catalizador del medio de reacción, así como su reutilización en repetidos de ciclos de reacción (Thanh *et al.*, 2012). Estas propiedades reducen la producción de aguas residuales y el consumo de energía. Otras ventajas destacables son su capacidad de catalizar la reacción de transesterificación independientemente de la presencia de AGL y agua, y de trabajar en flujo continuo (Loterio *et al.*, 2005), mejorando la viabilidad económica de la producción de biodiésel (De Almeida *et al.*, 2008). La catálisis heterogénea además presenta un área específica alta, lo cual mejora la actividad catalítica.

Se pueden obtener catalizadores heterogéneos a partir de fuentes naturales como conchas de moluscos, cáscara de huevo, cenizas, rocas, etc. (Chakraborty *et al.*, 2011), y recursos residuales provenientes de fuentes verdes (Chouhan *et al.*, 2011; Nurfitri *et al.*, 2013). Actualmente, los catalizadores heterogéneos que se utilizan en la producción de biodiésel contienen óxidos alcalinos y alcalinotérreos como CaO, BaO, MgO, ZnO (Patil *et al.*, 2009; Helwani *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011), y sales soportadas sobre materiales con gran área superficial.

Los catalizadores heterogéneos pueden ser aplicados exitosamente para la obtención de biodiésel, por sus fuentes de obtención de bajo costo, amplia disponibilidad, y su alta actividad y reutilización (Sanjay, 2013). El potencial de los catalizadores heterogéneos reside en sus características rentables y ecológicas, así como en su capacidad para regenerarse tras ciclos repetitivos. La principal desventaja observada en los catalizadores heterogéneos es la formación de tres fases (aceite, alcohol y catalizador), disminuyendo la velocidad de reacción debido a las limitaciones de transferencia de masa: formación de una película alrededor del soporte y distribución no uniforme del catalizador en la mezcla de reacción. Para revertir ese efecto se ha estudiado la adición de solventes; sin embargo, los sistemas basados en solventes no son convenientes para las producciones industriales, por ser peligrosos, volátiles y potencialmente tóxicos (Fjerbaek *et al.*, 2009). Adicionalmente, el uso de solventes lleva implícito un costo adicional.

1.2.2.1. Catalizadores heterogéneos básicos. En esta categoría se incluyen los catalizadores que contienen un solo metal, metales mixtos, óxidos metálicos dopados, metales alcalinotérreos, zeolitas, hidrotalcitas y óxidos de metales de transición. El CaO ha recibido mucha atención por su bajo costo, alta disponibilidad y altos rendimientos. Kouzu *et al.* (2008) obtuvieron un 93% de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en 1 h y 98% en 2 h. Otros catalizadores evaluados de base heterogénea que también han demostrado altos rendimientos son el ZnO-La₂O₃ (92.3% de FAME), reportado por Yan *et al.* (2009), y el Na₂O₃Zr (98% FAME a 65°C después de 4 h) empleado por Santiago *et al.* (2014). El MgO, SrO y BaO igualmente son catalizadores de uso común. Sin embargo, los catalizadores heterogéneos básicos todavía están limitados por la composición de la materia prima; particularmente por su contenido de AGL. Además, catalizadores como el MgO requieren temperaturas muy altas (180°C) durante la reacción de transesterificación para su óptimo desempeño (Cantrell *et al.*, 2005; Di Serio *et al.*, 2006), o durante la etapa de purificación como es el caso del óxido de Mg-Al (Di Serio *et al.*, 2006).

1.2.2.2. Catalizadores heterogéneos ácidos. Estos catalizadores han sido ampliamente explorados, ya que son fuertes candidatos para la posible sustitución de catalizadores ácidos homogéneos (Jacobson *et al.*, 2008) y su aplicación con MP2G. Además, los catalizadores ácidos pueden

separarse fácilmente de la mezcla de reacción y las consiguientes etapas de regeneración y reciclado, hasta su desactivación.

Sus rendimientos reportados varían en un intervalo de 26.6 a 100%, pero sus tiempos de reacción son más largos y las temperaturas requeridas son altas (Sani *et al.*, 2014). Estos catalizadores no son específicos por lo que se pueden producir reacciones secundarias (deshidratación del alcohol, formación de éter) que afectan las conversiones y rendimientos de la reacción principal. En consecuencia, esto restringe su aplicación industrial. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para comprender por completo el mecanismo su mecanismo de acción (Sani *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de este tipo de catalizadores son las sílices mesoporosas, ZrO₂, TiO₂, SnO₂, zeolitas, resinas de intercambio iónico sulfónico y catalizadores a base de carbono sulfonado y heteropoliácidos.

Independientemente de la naturaleza química del catalizador, tratar con un catalizador heterogéneo implica optimizar otras variables para maximizar la velocidad de producción de ésteres monoalquílicos. Dichas variables a considerar son el tamaño de partícula, de los poros y la velocidad de agitación.

1.2.2.3. Catalizadores enzimáticos inmovilizados. En la sección 1.2.1.3. se mencionaron a las EL como un catalizador versátil en la modificación enzimática de lípidos, incluida la obtención de biodiésel. En esta sección hablaremos de que al someter dichas enzimas a un proceso de inmovilización (EI) se mejora su rendimiento en términos de actividad, al reutilizarse durante varios ciclos en reactores discontinuos, empacados y continuos (Fan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Datta *et al.*, 2013; Sandoval *et al.*, 2017).

La técnica de inmovilización consiste en soportar la enzima en una matriz sólido el cual es insoluble en el medio de reacción (Jesionowski *et al.*, 2014). Existen diversos métodos para la inmovilización de lipasas: adsorción, unión covalente, atrapamiento, encapsulación y entrelazamiento. La adsorción es la más utilizada debido a las ventajas en su uso industrial como el uso de amilasas inmovilizadas para la hidrólisis del almidón (Jesionowski *et al.*, 2014). Se puede realizar en condiciones moderadas, con una ligera pérdida de actividad enzimática y el proceso de asociación es sencillo y económico. Consiste simplemente en la unión de la lipasa a la superficie del soporte por enlaces débiles, como Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas o de dispersión (Jegannathan *et al.*,

2008). Los derivados de sílice, resinas sintéticas, alginatos de calcio, atapulgitas modificadas, nanoestructuras magnéticas y quitosanos hidrófobos son algunos ejemplos de los soportes utilizados para la inmovilización enzimática (Sandoval *et al.*, 2017; Zdarta *et al.*, 2018).

Entre las ventajas que supone el proceso de inmovilización se encuentran: reutilización sucesiva de la EI potenciando así su costo-beneficio, mejora en la estabilidad de la enzima frente a las condiciones ambientales de reacción y, su fácil recuperación del medio de reacción. Con respecto a las desventajas podemos mencionar que: la inmovilización eleva el costo del catalizador, se puede alterar la especificidad de la enzima y la transferencia de masa se ve afectada debido a la adición de una fase sólida (EI) en un medio líquido (reactivos), lo que conlleva a una reducción de la velocidad de reacción (Aguieiras *et al.*, 2015; Amoah *et al.*, 2016).

Existen una amplia variedad de soportes inorgánicos (sílica, óxidos metálicos, materiales de carbono) y orgánicos (polímeros sintéticos, biopolímeros) para la inmovilización de las lipasas (Zdarta *et al.*, 2018); sin embargo, los monolitos inorgánicos en particular, son un material que, si bien se ha utilizado como soporte para diferentes catalizadores, existen muy pocos estudios de su aplicación en la obtención de biodiésel. La estructura porosa especial conectada en tres dimensiones de los monolitos, brinda una gran área superficial, buena permeabilidad, aumentando el área de transferencia (Ochuma *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2020). Los monolitos de espuma o reticulados se producen en diferentes materiales, donde los más típicos son de Al recubierto con alúmina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). Este soporte tiene un gran potencial debido a su estructura porosa tridimensional, alta porosidad (> 75%) y una estructura porosa tortuosa, que mejora la turbulencia y la transferencia de masa (Ochuma *et al.*, 2007). Por ello, su popularidad dentro de las aplicaciones catalíticas se ha incrementado (Xie *et al.*, 2020).

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se emplearon monolitos reticulados de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ como soportes enzimáticos, los cuales presentan mayor estabilidad que sus versiones en polvo o pellets, aumentando sus posibilidades de reutilización (Alimi *et al.*, 2020). Asimismo, dado los beneficios de su tipo de poros previamente descritos, su alto costo-beneficio, acidez/basicidad superficial, son químicamente inertes y excelente afinidad por las enzimas (Zhou *et al.*, 2019), se cree que tienen un gran potencial como soporte enzimático. Hasta el momento, en lo que a nuestro conocimiento respecta, no se han encontrado estudios donde monolitos de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ hayan sido empleados para la obtención de biodiésel a través de una transesterificación enzimática de aceites o grasas animales; sin embargo, su aplicación en otras áreas ha demostrado una alta eficiencia como la industria

alimenticia (Sujoy and Aparna, 2013; Xie *et al.*, 2022) o purificación de proteínas (Nayak *et al.*, 2019).

1.3. Tecnología y Configuración del Reactor

La selección de la tecnología y configuración del reactor para la producción óptima de biodiésel, debe permitir el control de las condiciones operativas para la reacción de transesterificación química o enzimática. Para este último, Poppe *et al.* (2015) resumieron las principales variables a considerar para seleccionar la configuración del reactor más adecuada utilizando enzimas inmovilizadas. Se han propuesto varias configuraciones de reactores (ver Figura 3): reactores de tanque agitado (RTA), reactores de lecho empacado (RLE), reactores de lecho fluidizado (RLF) y reactores de membrana (RM), los cuales pueden operar de forma continua o discontinua (Sandoval *et al.*, 2017).

1.3.1. Reactor de Tanque Agitado (RTA)

Este es el tipo de reactor de mayor uso y aplicación, ya sea en modo discontinuo (RTAD) o continuo (RTAC), así como acoplado a otros aditamentos (Peterson *et al.*, 2002). El RTAD constituye una configuración versátil y es el reactor más utilizado para el escalamiento de procesos. Empleados a nivel laboratorio, permiten la evaluación y optimización de los principales parámetros. Presenta la configuración más simple dentro de los sistemas de reacción; es fácil de operar y mantener, pero requiere largos tiempos de reacción (Christopher *et al.*, 2014). Como sistema de agitación se utiliza típicamente una hélice que crea una mezcla radial de dos líquidos inmiscibles contenidos en el reactor, aunque los agitadores magnéticos también son populares (Banković-Ilić *et al.*, 2014). La agitación es una variable crítica porque contribuye a la reducción de la resistencia de la transferencia de masa, no solo entre el sustrato y el catalizador, sino también entre los reactivos. Una velocidad de agitación adecuada garantizará la homogeneidad de la mezcla de reacción, en

particular cuando los sustratos utilizados no sean completamente miscibles, como sucede en la síntesis de biodiésel al mezclar un alcohol con un aceite. La agitación también permite la interacción del catalizador con la mezcla de reacción. Por lo tanto, velocidades bajas conducirán a una pobre integración de los reactivos y, en consecuencia, los rendimientos y productividades alcanzados serán menores; sin embargo, altas velocidades tampoco son convenientes, dado que pueden dañar el catalizador (principalmente si está inmovilizado o soportado sobre otro componente) e implican mayores requerimientos de energía.

Algunas de las ventajas de los RTAD son: (a) construcción simple del equipo; (b) bajos costos de mantenimiento y operación; (b) buena dispersión del sustrato; (c) fácil control de la reacción; (d) fácil recopilación de datos del proceso (Poppe *et al.*, 2015), lo que facilita su optimización. En contraste, algunos de los inconvenientes son: (a) tiempos de reacción prolongados; (b) bajo rendimiento; (c) la necesidad de tanques de gran volumen para una producción a gran escala; (d) daño mecánico del catalizador; no obstante, el sistema discontinuo puede revertir la inhibición del catalizador causada por el producto, mediante el aumento del tiempo de reacción o la altura del reactor (Liese y Hilterhaus, 2013).

Con respecto al RTAC, su configuración permite pasos de separación durante el proceso de operación, haciendo posible la remoción de subproductos que puedan afectar el rendimiento del biodiésel (Poppe *et al.*, 2015); el agua producida por la transesterificación se puede eliminar durante la síntesis continua de biodiésel. Cabe mencionar que esta eliminación de agua no puede ser realizada por ningún otro sistema de reactor continuo (Mancini y Bradley, 2016). Se ha demostrado que, en un RTAC, el proceso de transesterificación puede realizarse durante más de 70 días, alcanzando un rendimiento $>70\%$, utilizando *C. antarctica* inmovilizada (Chen y Wu, 2003). Tanto el RTAC como el RTAD se pueden distinguir por su capacidad para aumentar la transferencia de masa durante la transesterificación.

1.3.2. Reactor de Lecho Empacado (RLE)

Estos reactores operando en modo continuo son lo más comúnmente utilizados para catalizadores heterogéneos (Lotti *et al.*, 2015; Kouzu *et al.*, 2018), y los más prometedores para una producción

industrial y sustentable de biodiésel (Zhao *et al.*, 2015). Los RLE están compuestos básicamente por una columna cilíndrica, empacada con las enzimas inmovilizadas u otro catalizador soportado. La fase móvil se bombea a través de la columna, con un flujo óptimo, para realizar la síntesis de biodiésel. El flujo de un RLE es el equivalente a la velocidad de agitación en un RTA. Podría ser la variable operativa más importante, ya que la variación del tiempo de residencia es dependiente del flujo. Un flujo bajo aumentará el tiempo de retención, por lo que se extenderá el tiempo de contacto entre el catalizador y los sustratos, obteniendo un alto rendimiento de biodiésel. Sin embargo, también es un hecho que, al reducir el número de Reynolds, p. ej. el flujo, la resistencia a la transferencia de masa entre el líquido y el catalizador puede aumentar debido a un aumento en el espesor de la capa intermedia líquido-sólido. En general el RLE tiene un mejor rendimiento que los RTA, la tecnología es más económica, la reutilización de la enzima no necesita una separación previa y puede trabajar con una baja relación enzima-sustrato (Lotti *et al.*, 2015).

Un RLE maximiza la superficie de reacción por unidad de volumen, intensificando la productividad del proceso continuo (Balcáó *et al.*, 1996). Shimada *et al.* (2002) obtuvieron una conversión de aceite a biodiésel >98.6% utilizando un RLE continuo durante 180 días. Como desventajas, se puede observar un fenómeno de canalización debido a la inmiscibilidad de los sustratos, pérdidas de presión, dificultades en el control de la temperatura y limitaciones de transferencia de masa.

1.3.3. Reactores de Lecho Fluidizado (RLF)

Una alternativa a las desventajas observadas en los RLE, son los RLF, debido a que presentan una menor caída de presión, un flujo uniforme y una menor formación de canales. Sin embargo, requieren una configuración más compleja y alcanzan menores rendimientos (Pope *et al.*, 2015). Aunque los RLF son un reactor de uso común, existen estudios limitados sobre su uso para la síntesis enzimática de biodiésel (Zhou *et al.*, 2014). Los RLF funcionan de manera similar a los RLE, sin embargo, se diferencian en que la fase móvil (sustrato) se alimenta con un flujo suficiente para levantar las partículas del fondo del lecho. Esto induce la fluidización de la enzima inmovilizada para dispersarse en el reactor (Sandoval *et al.*, 2017). Fidalgo *et al.* (2016) obtuvieron biodiésel a partir de aceite de babasú en un RLE continuo utilizando un biocatalizador. En su mejor

desempeño, obtuvieron un rendimiento promedio del 98.1% en un espacio-tiempo de 8 h. Probablemente, el principal problema de los RLF es la limitación de su escalamiento. El RLF presenta un factor de escalamiento de 10 a 100 veces, mientras que los RLE pueden llegar hasta >50000 veces (Poppe *et al.*, 2015).

1.3.4. Reactores de Membrana (RM)

Mediante los RM es posible alcanzar una gran producción continua, y realizar simultáneamente el proceso de transesterificación y separación de los productos, proporcionando un biodiésel de alta calidad con rendimientos elevados (Badenes *et al.*, 2011; Kiss y Bildea, 2012; Shuit *et al.*, 2012). Confieren una alta transferencia de masa cuando los ésteres monoalquílicos de ácidos grasos atraviesan la membrana. La tecnología de membranas consume menos energía, es más ecológica ya que no son necesarios los tratamientos de aguas residuales, y presenta un escalamiento sencillo (Yusefi *et al.*, 2016). El RM mejora la selectividad de los catalizadores y el área superficial por unidad de volumen. Se pueden encontrar membranas orgánicas e inorgánicas, pero estas últimas son más estables, aunque más costosas. En realidad, los RM son más costosos que los reactores convencionales, complicando la sustentabilidad del sistema a escala industrial (Carvalho *et al.*, 2000).

Luo *et al.* (2017) estudiaron la transesterificación de aceite de soya con una membrana catalítica compuesta (HTCC/Na₂SiO₃/NWF), la cual permitió una conversión >97% empleando un RM. Los factores clave del comportamiento de la membrana son la forma y composición de su estructura y el tamaño de sus poros (Atadashi *et al.*, 2011).

1.3.5. Reactores Asistidos por Ultrasonido (RAU)

Al utilizar este tipo de reactores se mejoran las velocidades de transferencia de masa debido al fenómeno de cavitación generada entre las fases de aceite y alcohol, lo que proporciona una

micromezcla intensiva en el medio de reacción. Dado que el ultrasonido permite una mezcla eficiente, así como altas presiones y temperaturas, los RAU son adecuados para la catálisis heterogénea ya que pueden superar los problemas de transferencia de masa presentes en este tipo de catalizadores (Choudhury *et al.*, 2014; Baskar y Aiswarya, 2016). Malani *et al.* (2018) obtuvieron un 94.71% de rendimiento utilizando un RAU y un catalizador heterogéneo (KI/ZnO), manteniendo una actividad del 54.5% después de 5 ciclos. En general, el ultrasonido puede conducir a un mayor rendimiento de producto, requiriendo una menor relación molar (alcohol:aceite) y concentración de catalizador (Gupta *et al.*, 2015), además de consumir menos energía que la agitación mecánica convencional (Baskar y Aiswarya, 2016).

1.3.6. Reactores Asistidos por Microondas (RAM)

En este tipo de reactores se transfiere la energía de manera más eficiente en comparación con el calentamiento térmico convencional, ya que la energía pasa directamente a los reactivos por irradiación. Esto permite que los reactivos alcancen la temperatura requerida para la transesterificación rápidamente, lo que resulta en procesos acelerados, y con mayores rendimientos y productos de calidad (Qiu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016). Ikenaga *et al.* (2017) obtuvieron biodiésel a partir de aceite de fritura utilizando PbO₂ y MnO₂ como catalizadores a través de un RAM, donde se alcanzó un rendimiento de FAME >89%. Sin embargo, el escalamiento a producciones de alto volumen aún no es factible a causa de no existir el equipo necesario para producciones industriales. Además, las demandas de energía para realizar la transesterificación con tecnología asistida por microondas pueden no ser sustentables para la producción industrial (Kim *et al.*, 2016).

Para llevar a cabo el presente trabajo, se planteó el uso de las MP2G ante las ventajas que pueden ofrecer, seleccionándose el WCO y el CSO para la obtención enzimática de biodiésel, con el apoyo de un catalizador novedoso desarrollado a partir de la inmovilización de CALB en monolitos, el cual pueda incrementar la sustentabilidad del proceso. Los Cuadros 1 y 2 resumen algunos estudios realizados para la síntesis de biodiésel a partir de WCO y CSO utilizando diferentes tecnologías y configuraciones de reactores. Se puede observar que algunos de los ensayos alcanzaron la

regulación internacional relacionada con el contenido de ésteres grasos mediante el uso de RAU (Subhedar y Gogate, 2016), RTAD (Zheng *et al.*, 2006; Chourasia *et al.*, 2015; Gardy *et al.*, 2018) y RLE (Melero *et al.*, 2013). Entre esos estudios, se evaluaron diferentes condiciones de reacción. En el caso del RAU se utilizaron condiciones moderadas, el tiempo de reacción es muy corto y dado estas observaciones es muy posible que la enzima se puede reutilizar; sin embargo, el uso de dicha tecnología a nivel industrial es costosa. Con respecto al RTAD, debe considerarse que el estudio realizado con H_2SO_4 es un reactivo peligroso que genera residuos tóxicos, e implica aún más riesgo implementarlo en una producción industrial. Entre los catalizadores heterogéneos aplicados, el trabajo realizado por Gardy *et al.* (2018) parece prometedor debido al corto tiempo de reacción, la baja carga del catalizador y el rendimiento alcanzado. Finalmente, los parámetros operativos para el RLE pueden ser un inconveniente para la producción industrial de biodiésel.

Cuadro 1. Diferentes sistemas de reacción evaluados para la síntesis de biodiésel a partir de aceite de fritura (WCO).

Materia prima	Catalizador	Condiciones de reacción		Reactor	Rendimiento	Referencias
CO	Heterogéneo (PbO ₂)	209°C, 30 min y 1.89 MPa	5% mol de catalizador 6.9:1 (metanol:aceite)	RAM	>89%	Ikenaga <i>et al.</i> , 2017
WCO	Heterogéneo (Novozym 435®)	59°C, 4 h, 10% (w/v) carga enzimática	6:1 (carbonato de dimetilo:aceite)	RAM	94%	Panadare and Rathod, 2016
WCO	Heterogéneo (Lipozyme TLIM®)	40°C, 3 h	3% (w/v) carga enzimática 9:1 (acetato de metilo:aceite)	RAU	96.1%	Subhedar and Gogate, 2016
WCO	Heterogéneo (CaDG)	60°C, 30 min	1% catalizador 9:1 (metanol: aceite)	RAU	93.5%	Gupta <i>et al.</i> , 2015
WCO	Heterogéneo (SO ₄ /Fe-Al-TiO ₂)	90°C, 2.5 h	3 wt. % catalizador magnético 10:1 (metanol:aceite)	RTAD	96%	Gardy <i>et al.</i> , 2018
WCO	Homogéneo (H ₂ SO ₄)	80°C, 4 h	245:1:3.8 (metanol:aceite:ácido)	RTAD	99%	Zheng <i>et al.</i> , 2006
WCO	Homogéneo (KOH)	60°C 90 min	1.0 wt% catalizador 7:1 (metanol:aceite)	RTAD	95%	Dhanasekaran and Dharmendirakumar, 2014
WCO	Heterogéneo (CALB-DILBEADS™ 10000)	37°C, 8 h	5% carga enzimática 3:1 (metanol:aceite)	RTAD	99.71%	Chourasia <i>et al.</i> , 2015
WCO	Heterogéneo (Novozym 435®)	40°C, 3 h 4:1 (metanol:aceite)	1:1 (<i>t</i> -butanol:aceite) Altura (lecho empacado): 10.53 cm Flujo: 0.57 mL min ⁻¹	RLE	79.1%	Halim <i>et al.</i> , 2009
WCO	Heterogéneo (Zr-SBA-15/arcilla de bentonita)	210°C, 7 MPa 50:1 (metanol:aceite) 28 g de catalizador	Tiempo de residencia: 30 min Altura (lecho empacado): 120 cm Diámetro (lecho empacado): 0.9 cm	RLE	96% (>260 h)	Melero <i>et al.</i> , 2013
WCO	Heterogéneo (biocatalizador de células enteras)	35°C, >48 h, 3.74 (metanol:aceite)	10.21 wt. % carga enzimática 16.97 mL min ⁻¹ 8 ciclos	RLF	91.8%	Chen <i>et al.</i> , 2017
WCO	Heterogéneo (KOH/AC)	60°C Tiempo de residencia: 60 min 1:1 (metanol:aceite)	25.5 mL min ⁻¹ Membrana tubular de TiO ₂ /Al ₂ O ₃ encerrada en una carcasa de PVC	RM	80.72%	Ranchod <i>et al.</i> , 2013
WCO	Heterogéneo (KOH/AC)	58.5°C Tiempo de residencia: 60 min 23:1 (metanol:aceite)	18.78 mL min ⁻¹ Membrana micro-porosa 1.24 wt. % carga enzimática	RM	94.03% (biodiésel mol)	Moyo, 2014

WCO: aceite de fritura; CO: aceite de cocina; RAM: reactor asistido por microondas; RAU: reactor asistido por ultrasonido; RTAD: reactor de tanque agitado discontinuo; RLE: reactor de lecho empacado; RLF: reactor de lecho fluidizado; MR: reactor de membrana.

Cuadro 2. Diferentes sistemas de reacción evaluados para la síntesis de biodiésel a partir de aceite de semilla de algodón (CSO).

Materia prima	Catalizador	Condiciones de reacción		Reactor	Rendimiento	Referencias
CSO (refinado)	Pellets de hidróxido de sodio (homogéneo) Nanotubos de carbono de paredes múltiples (heterogéneo)	50 – 70°C 0.5-1.5 (g/L NaOH) 6:1-10:1 (etanol:aceite) 10 mg (heterogéneo)	60-120 min	RTAD	95%	Shankar <i>et al.</i> , 2017
CSO	Lipasa (<i>Pichia guilliermondii</i>) inm. partículas hidrofóbicas magnéticas	38.76°C 31.3% lipasa inm. 10.4% contenido de agua	4.715:1 (metanol:oil) 48 h	RTAD	89.32%	Li and Dong, 2016
CSO	Lipasa (<i>Rhizomocur miehei</i>) inm. partículas de sílica con núcleo de ácido oleico (SiO ₂)	40°C 5 wt. % (aceite) lipasa inm. 12:1 (metanol:aceite)	15:1 (etanol:aceite) 16 h (metanólisis) 24 h (etanólisis) 12 ciclos	RTAD	> 98%	Katiyar and Ali, 2015
CSO	Lipasa pancreática	37°C 0.5% (wt. aceite) 5% contenido de agua (wt. aceite)	15:1 (metanol:aceite) 4 h pH 7	RTAD	75-85%	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2011
CSO	Novozym 435 inm. papel de celulosa	40°C 4 mL solvente orgánico 0.4 mmol aceite vegetal 150 rpm	1.2 mmol carbonato de dimetilo 10% lipasa (wt. aceite) 5 ciclos	RTAD	96.4%	Su <i>et al.</i> , 2007
CSO (refinado)	Novozym 435	50°C 30% (wt. aceite) lipasa 4:1 (metanol:aceite)	7 h Sin solvente	RTAD	91.5%	Köse <i>et al.</i> , 2002
CSO	<i>Candida antarctica</i> inm. columna de lecho fijo termostatzada (18 x 0.6 cm) + vidrio molido (1:1.5 [w:w])	50°C 32.5% t-butanol (vol %) 13.5% metanol 54% aceite	0.017 g enzima (g aceite) ⁻¹ 24 h (lote) Flujo: 9.6 mL h ⁻¹ (g enzima) ⁻¹ > 500 h (sin disminución apreciable)	RLF (Lote/ continuo)	97% (lote) 95% (continuo)	Royon <i>et al.</i> , 2007
CSO	KOH (pellets)	55°C 6:1 (metanol:aceite) 0.6% wt. catalizador	60 min	RTAD	96%	Onukwuli <i>et al.</i> , 2017
CSO virgen	5-Na/ZnO sílice mesoporosa dopada (heterogéneo)	65°C 24:1 (metanol:aceite) 12% wt. catalizador	4 h 5 ciclos	RTAD	> 98%	Malhotra and Ali, 2019

RTAD: reactor de tanque agitado discontinuo; RLF: reactor de lecho fluidizado

2. JUSTIFICACIÓN

La alta demanda por los combustibles fósiles ha conducido a su inminente agotamiento, así como a un importante impacto ambiental. En ese sentido, biocombustibles como el biodiésel, se han convertido en una alternativa ecológica prometedora. Dado que la transesterificación es el método convencional para la obtención de biodiésel, la mejora de parámetros críticos como el uso de materias de segunda generación combinado con una enzima inmovilizada dentro de un monolito, pretende contribuir al enriquecimiento del conocimiento científico y al proponer un proceso sustentable para la obtención de biodiésel.

3. HIPÓTESIS

La transesterificación de aceites de segunda generación será intensificada mediante el empleo de monolitos reticulados como soportes de inmovilización para CALB, al incrementar la eficiencia catalítica y haciendo posible la reutilización de la enzima.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar un sistema catalítico híbrido (biológico-inorgánico), para la producción de biodiésel a partir de materias primas de segunda generación.

4.2 Objetivos Específicos

1. Emplear materias primas de segunda generación para la síntesis de biodiésel: aceites de fritura (WCO) y algodón (CSO).
2. Evaluar diferentes métodos de extracción para la recuperación del CSO y determinación del perfil de ácidos grasos de ambos aceites.
3. Determinar los efectos de la relación molar de sustratos, temperatura y carga de enzima (comercial), en la síntesis de biodiésel en un reactor discontinuo.
4. Inmovilizar CALB en monolitos, evaluando los efectos del buffer empleado, pH, relación enzima:buffer y pretratamiento del monolito.
5. Determinar la eficiencia de inmovilización mediante el contenido de proteína y ensayo de actividad lipasa.
6. Contrastar la eficiencia catalítica del inmovilizado obtenido con la enzima comercial en reactores discontinuo y continuo.
7. Caracterizar el biodiésel obtenido de acuerdo con la normativa internacional.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Biocatalizadores

Se utilizaron dos biocatalizadores para el desarrollo de esta tesis doctoral: Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] CALB L, ambas suministradas por Novozymes A/S (Bagsvaerd, DK). Novozym[®] 435 es la lipasa B de *Candida antarctica*, inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa e hidrófoba. Por otro lado, Lipozyme[®] CALB L es la misma enzima en su forma libre.

5.2. Aceites

El aceite de semilla de algodón (CSO) se extrajo de semillas donadas por la “Despepitadora Lázaro Cárdenas”, la cual se encuentra localizada en las siguientes coordenadas: 28.3704, -105.603925. El aceite de fritura (WCO) se obtuvo de la cafetería de la Facultad de Turismo y Gastronomía UAEM (Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca de Lerdo, MX), el cual se sometió a un pretratamiento y posteriormente se almacenó a temperatura ambiente en envase oscuro hasta ser utilizado. El pretratamiento consistió en filtrado para la separación de residuos sólidos, seguido de un proceso térmico en el cual el aceite se secó (Felisa model FE-133D; Felisa[®], Jalisco, MX) durante una noche a 60°C, en presencia de un tamiz molecular.

5.3. Monolitos

Los monolitos empleados como soporte para la inmovilización enzimática están constituidos de α -alúmina (10-15 poros por pulgada), son reticulados y se adquirieron en ASK CHEMICALS HI-TECH LLC (NY, USA). Previo a ser usados, los monolitos se sometieron a un proceso de

hidroxilación para su funcionalización, que consistía en ponerlos en contacto con una solución piraña (H_2O_2 al 30% y H_2SO_4 al 96%, 1:3 v/v) a 40°C durante 30 min. Posteriormente, los monolitos funcionalizados se lavaron con agua destilada y secaron para ser almacenados en frascos ámbar hasta su uso.

5.4. Reactivos

Los reactivos hexano ($\geq 95\%$), cloroformo ($\geq 99.8\%$), metanol ($\geq 99.9\%$), se emplearon como solventes orgánicos en el proceso de extracción y se adquirieron de J.T. Baker (Nueva Jersey, US), así como el HCl ($\geq 96\%$) utilizado en la derivatización total selectiva, el H_2SO_4 ($\geq 96\%$) y peróxido de hidrógeno ($\geq 35\%$) empleados en la funcionalización de los monolitos. Para las reacciones de transesterificación se utilizó etanol ($\geq 99.9\%$) como donador de acilos, adquirido también de J.T. Baker (Nueva Jersey, US). Para la determinación de la composición de ácidos grasos de ambos aceites, así como para el seguimiento de las reacciones de transesterificación, se utilizó como estándar la mezcla de ácidos grasos Supelco 37 FAME Mix (Bellefonte, US).

Todos los reactivos empleados son de grado analítico, mientras que los solventes empleados para las determinaciones cromatográficas (CG) de grado HPLC, suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, US).

5.5. Extracción y Caracterización del Aceite de Semilla de Algodón (CSO)

Las semillas de algodón requirieron de un acondicionamiento previo al proceso de extracción de aceite. Las semillas se limpiaron y separaron del resto de los residuos, para posteriormente aplicarles un tratamiento térmico a baño maría durante 5 min y 60°C (Heating Bath, B-100; BUCHI, Flawil, CH) con el propósito de facilitar el descascarado. Posteriormente, las semillas se secaron durante una noche en una incubadora (model FE-133D; Felisa[®], Jalisco, MX). Por último,

las semillas se molieron en un molino IKA all basic mill (IKAWorks, Inc., Wilmington, NC) hasta obtener un polvo ($\leq 500 \mu\text{m}$).

Para llevar a cabo la extracción del CSO, se evaluó la eficiencia de tres técnicas de extracción: extracción por Soxhlet (ES), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción mecánica (EM). También se investigaron los efectos de diferentes temperaturas, disolventes orgánicos, tiempos de extracción y relaciones solvente:semilla (s:s), bajo las condiciones experimentales mostradas en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Factores evaluados durante el proceso de extracción de CSO bajo un diseño Box-Behnken 3^k .

Variables	ES			EAU		
	Niveles			Niveles		
	-1	0	+1	-1	0	+1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	45	60	30	45	60
SO	CHCl ₃ - CH ₃ OH (1:2)	Folch *	Hexano	CHCl ₃ - CH ₃ OH (1:2)	Folch *	Hexano
Tiempo (min)	20	40	60	20	40	60
s:s (mL/g)	10:0.5	10:1.0	10:1.5	10:0.5	10:1.0	10:1.5

* CHCl₃-CH₃OH (2:1); s:m = relación solvente:semilla; SO: solvente orgánico

El contenido de lípidos obtenido a través de las tres técnicas de extracción se estimó por diferencia de peso. Adicionalmente, se calculó el rendimiento de extracción (RE) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{peso aceite}}{\text{peso muestra}} \times 100 \quad (1)$$

5.5.1. Prensado

Para la extracción de CSO por el método EM, se colocaron las semillas de algodón en la tolva de llenado de la prensa extractora, provista de mecanismo manual. Dicha prensa se calentó

previamente a una temperatura entre 120 – 125°C para facilitar el proceso de extracción. El CSO extraído por la presión mecánica se recuperó en un vaso de precipitado localizado por debajo del orificio de salida del cilindro principal de la prensa, el cual posteriormente se almacenó en un vial ámbar en refrigeración (~4°C) hasta llevarse a cabo los ensayos experimentales correspondientes.

5.5.2. Método de Soxhlet

Con respecto a la extracción de CSO por el método ES, las semillas se introdujeron en el extractor homónimo, cargado previamente con solvente orgánico (SO) y bajo agitación magnética (200 rpm; Hot Plate, LMS-1003, Daihan Labtech; Gyeonggi-do, KR), de acuerdo con las condiciones mostradas en el Cuadro 3. Las mezclas obtenidas al término del proceso de extracción se filtraron a través de un papel filtro #1 (125 mm ø; Whatman, Maidstone, UK) y después se calentaron a 60°C en una placa de calentamiento para la eliminación del SO remanente.

5.5.3. Ultrasonido

Por último, la extracción de CSO por el método EAU, implicó la sonicación de viales ámbar que contenían las muestras de semilla de algodón y diferentes SO (ver Cuadro 3), en un equipo VWR modelo 150D (VWR International, West Chester, PA) a 50-60 Hz. Las mezclas obtenidas al término del proceso de extracción se filtraron a través de un papel filtro #1 (125 mm ø; Whatman, Maidstone, UK) y después se calentaron a 60°C en una placa de calentamiento para la eliminación del SO remanente.

5.5.4. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se empleó un diseño Box-Behnken 3^k para determinar el efecto de la temperatura, SO, tiempo de extracción, y la relación s:s. sobre el rendimiento de extracción de aceite (variable de respuesta). El Cuadro 3 muestra los diferentes niveles de las variables de estudio, arrojando un total de 27 corridas experimentales completamente al azar, y tres puntos centrales (ver Cuadro 4).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizó un modelo cuadrático (Ecuación 2) para la predicción de la variable dependiente de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

donde: y es la variable de respuesta (rendimiento de extracción, RE), β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} representan los coeficientes de regresión de los efectos combinados, lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente; x_i y x_j representan las variables independientes.

Para un ajuste de segundo orden, los datos experimentales se analizaron estadísticamente con el programa MINITAB[®]18 (Minitab Inc., State College, PA). Las diferencias entre los valores medios de los tratamientos se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey utilizando el programa SAS edición universitaria (SAS Institute Inc., Cary, NC) a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Cuadro 4. Diseño Box-Behnken aplicado en la extracción de CSO.

Corrida	x_1	x_2	x_3	x_4	y_1
1	30	Folch	40	10:1.0	29.17 ± 2.08 ^c
2	60	Folch	40	10:1.0	30.01 ± 1.41 ^{bc}
3	30	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	40	10:1.0	21.80 ± 0.84 ^{fgh}
4	60	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	40	10:1.0	21.68 ± 1.49 ^{fgh}
5	45	Hexano	20	10:0.5	17.22 ± 1.20 ^{ghij}
6	45	Hexano	60	10:0.5	23.63 ± 1.81 ^{def}
7	45	Hexano	20	10:1.5	14.23 ± 0.56 ^j
8	45	Hexano	60	10:1.5	17.94 ± 1.32 ^{ghij}
9	45	Hexano	40	10:1.0	18.76 ± 0.87 ^{ghij}
10	30	Hexano	40	10:0.5	22.11 ± 2.37 ^{efgh}
11	60	Hexano	40	10:0.5	21.76 ± 2.14 ^{fgh}
12	30	Hexano	40	10:1.5	16.46 ± 0.48 ^{ij}
13	60	Hexano	40	10:1.5	17.20 ± 0.71 ^{hij}
14	45	Folch	20	10:1.0	27.19 ± 1.88 ^{cde}
15	45	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	20	10:1.0	22.3 ± 1.14 ^{efg}
16	45	Folch	60	10:1.0	38.25 ± 0.52 ^a
17	45	Hexano	60	10:1.0	21.81 ± 0.50 ^{fgh}
18	45	Hexano	40	10:1.0	19.12 ± 1.72 ^{fghij}
19	30	Hexano	20	10:1.0	17.84 ± 1.18 ^{ghij}
20	60	Hexano	20	10:1.0	8.72 ± 1.03 ^k
21	30	Hexano	60	10:1.0	21.60 ± 2.35 ^{fgh}
22	60	Hexano	60	10:1.0	20.11 ± 2.27 ^{fghi}
23	45	Folch	40	10:0.5	34.63 ± 1.00 ^{ab}
24	45	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	40	10:0.5	30.04 ± 2.60 ^{bc}
25	45	Folch	40	10:1.5	29.38 ± 1.64 ^c
26	45	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:2)	40	10:1.5	17.13 ± 0.46 ^{hij}
27	45	Hexano	40	10:1.0	19.65 ± 2.00 ^{fghi}

x_1 : temperatura (°C), x_2 : solvente orgánico, x_3 : tiempo de extracción (min), x_4 : relación solvente:muestra (mL/g); y_1 : rendimiento de extracción (%). Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

5.5.5. Derivatización Total Selectiva

La derivatización total selectiva del CSO y WCO se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de Miranda *et al.* (2013). 200 µL de aceite se mezclaron con 1 mL de 0.2 N HCl-CH₃OH; la mezcla se calentó a 60°C durante 4 h. A continuación, se adicionaron 200 µL de agua destilada y 2 mL de hexano. Posteriormente, la mezcla se agitó por 10 s en un vórtex (Mixer Mini Vortex, Sw 945306,

VWR International; Tultitlán de Mariano Escobedo, MX) y se dejó reposar para la separación de fases. Finalmente, se recuperó la fase orgánica que contiene los esteres etílicos y se almacenó a temperatura de congelación (~ -18°C) hasta su análisis cromatográfico.

5.5.6. Análisis del Perfil de Ácidos Grasos

El perfil de ácidos grasos se determinó por medio de cromatografía de gases, de acuerdo con el protocolo de Miranda *et al.* (2013). Para ello, 2 µL del extracto se inyectaron en un cromatógrafo de gases HP modelo 6890 acoplado a un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar polar HP-INNOWAX (30 m X 0.32 mm X 0.25 µm). Las temperaturas del inyector y del FID se fijaron en 250°C. La temperatura del horno se mantuvo a 50°C durante 2 min y luego se elevó a 220°C a una velocidad de 30°C/min, manteniéndose durante 25 min. Posteriormente, la temperatura se elevó a 255°C y se mantuvo durante 7 min. Los AG se identificaron comparando sus tiempos de retención con los observados en el estándar Supelco 37 FAME Mix.

5.6. Obtención de Biodiésel a Partir de la Enzima Comercial

Este estudio se llevó a cabo utilizando WCO y CSO como materias primas, así como etanol y la enzima comercial Novozym[®] 435. La eficiencia de producción de FAEE alcanzada con estos experimentos sirvió como comparativo para la eficiencia obtenida por nuestro catalizador híbrido.

5.6.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Discontinuo

Para el desarrollo de las reacciones de transesterificación enzimática, se utilizó el WCO en primera instancia para evaluar el efecto de los parámetros de reacción sobre el rendimiento de FAEE, los

cuales eran: temperatura (30, 40 y 50°C), relación molar de sustratos (1:3, 1:6, y 1:9, aceite:etanol) y carga enzimática (5, 10 y 20 %, con respecto a la mezcla total de sustratos). La mezcla de sustratos (5 g) se introdujo en reactores de vidrio de 25 mL con tapón de rosca agitados constantemente a 200 rpm (Roto Mix, Type 50800, Barnstead Thermolyne; Minesota, US). El seguimiento de la reacción se llevó a cabo con la toma de muestras a diferentes tiempos (0, 2.5, 5, 7, 12 y 24 h), mismas que se analizaron cromatográficamente como se describe en la sección 8.5.6. Una vez encontradas las mejores condiciones de reacción, se replicaron utilizando CSO como materia prima.

5.6.2. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Continuo

Para la obtención de biodiésel en un reactor continuo, se empleó un reactor de lecho empacado de 2.06 mL (7.17 mm de \varnothing interno, 51 mm de altura) concéntrico y enchaquetado con agua de calentamiento para el control de temperatura. Dichas reacciones se llevaron a cabo bajo las mejores condiciones de temperatura y relación molar de sustratos, obtenidas de las reacciones de transesterificación en el reactor discontinuo. La mezcla de sustratos se introdujo en un depósito de vidrio de 25 mL sometido a agitación constante (200 rpm) y a una temperatura equivalente a la establecida en el reactor. La mezcla se inyectó al reactor (1.61 mL/h) a través de un capilar (<8 mm de \varnothing interno, 100 mm de longitud) utilizando una bomba peristáltica (Econo Pump, Modelo EP-1, Bio-Rad Laboratories; California, US). La mezcla tuvo un tiempo de residencia de 25.5 min. Tanto WCO como CSO se emplearon en este proceso continuo y se tomaron diferentes muestras para el seguimiento de producción de FAEE por triplicado.

5.6.3. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un diseño factorial 3x3x3, siendo los factores a evaluar: la carga enzimática con respecto a la mezcla total de sustratos (5, 10 y 20 %), la temperatura (30, 40 y 50°C) y la relación

molar (1:3, 1:6, y 1:9; aceite:etanol). Las diferencias entre los valores de las medias se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y una prueba de Tukey utilizando el programa SAS (SAS Institute Inc., US), a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$).

5.6.4. Análisis Cromatográfico

Este análisis se realizó en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones de análisis descritas en la sección 8.5.6.

5.7. Preparación y Caracterización del Catalizador Híbrido (Biológico – Inorgánico)

Para el desarrollo de este catalizador se utilizó la lipasa Lipozyme CALB-L y monolitos α -alúmina como matriz de soporte. Los monolitos se activaron previamente al proceso de inmovilizado con una solución piraña. Los monolitos se adicionaron a una mezcla de $H_2O_2:H_2SO_4$ (1:3, v/v). La mezcla se mantuvo en agitación constante (200 rpm) a 40°C durante 30 min. Al término de este tiempo, se recuperaron los monolitos de la mezcla y se aplicaron varios lavados con agua destilada. Finalmente se secaron por 16 h a 50°C y se almacenaron en frascos ámbar hasta su uso.

5.7.1. Inmovilización de CALB en Monolitos

El proceso de inmovilización se llevó a cabo por adsorción física en monolitos reticulados de α -alúmina. La suspensión comercial de Lipozyme CALB-L se mezcló en diferentes relaciones enzima:buffer (1:0, 1:1, 2:1, v/v), soluciones buffer (fosfatos de sodio, Tris-HCl; 0.1 M) y valores de pH (6 – 8). Posteriormente, se adicionaron 0.5 g de monolito funcionalizado en 5 mL de las

diferentes mezclas obtenidas y se agitaron a 200 rpm a diferentes temperaturas (30, 40 y 50°C) durante 8 h.

5.7.2. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un diseño factorial 4x3x3 para evaluar el efecto del pH (fosfatos de sodio pH 6, 7, 8 y Tris-HCl pH 8), la relación enzima:buffer (1:0, 1:1 y 2:1, v/v) y la temperatura (30, 40 y 50°C) sobre la producción de FAEE. Las diferencias entre los valores de las medias se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y una prueba de Tukey utilizando el programa SAS (SAS Institute Inc., US), a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$).

5.7.3. Cálculo del Porcentaje de Inmovilización

Para determinar el grado de inmovilización, se tomó una muestra de la suspensión enzimática (enzima + buffer) antes de iniciar al proceso de inmovilización (t_0) y al término del mismo (t_f). Las muestras se analizaron siguiendo el protocolo reportado por Bradford (1976), con ligeras modificaciones. Se mezclaron 5 μL de muestra con 250 μL del reactivo de Bradford, se agitó y se dejó reaccionar durante 30 min en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific; Vantaa, FI). El contenido de proteína se obtuvo por medio de una regresión lineal de una curva estándar de albúmina de suero bovina, construida en un rango de concentración de 0 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El porcentaje de inmovilización se estimó de acuerdo con la Ecuación 3.

$$\% \text{ de inmovilización: } 100 - \left(\frac{A_{t_f}}{A_{t_0}} \times 100 \right) \quad (3)$$

donde A_f es la absorbancia de la muestra tomada de la suspensión enzimática después del proceso de la inmovilización; A_{t0} es la absorbancia de la muestra tomada de la suspensión enzimática antes de iniciar el proceso de la inmovilización.

5.7.4. Ensayo de Actividad Lipasa

Para evaluar la actividad catalítica de nuestro catalizador híbrido, se estandarizó el ensayo correspondiente a la actividad lipasa, siguiendo el protocolo descrito por Yagiz *et al.* (2007), que consiste en la medición de μmol liberados de *p*-nitrofenol (*p*-NF) a partir de *p*-nitrofenil palmitato (*p*NFP). La mezcla para la reacción enzimática contenía 75 μL de una solución de *p*-nitrofenil palmitato (20 mM), 5 μL de muestra, y 2.92 mL de buffer 0.1 M Tris-HCl a pH 8.5. La mezcla se incubó a 45°C a baño maría por 10 min y después se dejó enfriar ($\sim -18^\circ\text{C}$) por 8 min. Una vez pausada la reacción, se tomaron 250 μL de muestra para su análisis de absorbancia en un lector de microplaca a 410 nm. La actividad enzimática se obtuvo por medio de una regresión lineal, utilizando una curva estándar de *p*NF construida en un rango de concentración de 0 a 100 μM . Una unidad de actividad lipasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*NF en un minuto a 45°C.

5.8. Obtención de Biodiésel a Partir del Catalizador Híbrido

Después de haber caracterizado nuestro catalizador híbrido en términos de su contenido de proteína y actividad lipasa, se procedió a evaluar su eficiencia catalítica en la obtención de biodiésel, como a continuación se describe.

5.8.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación en un Reactor Discontinuo

El desarrollo de estas reacciones de transesterificación enzimáticas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 8.6.1, a excepción del catalizador, ya que, para esta etapa de la tesis, la enzima estaba contenida en nuestro catalizador híbrido en lugar del inmovilizado comercial.

Con respecto al seguimiento de esta nueva serie de reacciones de transesterificación, éste también se llevó a cabo como se describió en la sección 5.5.6.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presenta un resumen global de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral. Primeramente, se obtuvo y caracterizó la materia prima para conocer el peso molecular tanto del aceite de fritura (WCO) como del aceite de semilla de algodón (CSO), ya que es un dato necesario para establecer las relaciones molares de sustratos y garantizar una eficiente obtención de biodiésel. Posteriormente, se procedió con la obtención enzimática de biodiésel a partir de WCO empleando el catalizador comercial (Novozym 435[®]) para la determinación de las mejores condiciones de reacción y ser posteriormente evaluadas con CSO como materia prima. Los diferentes contenidos de FAEE obtenidos por ambas materias primas y ambos catalizadores (comercial e híbrido), sirvieron para comparar la eficiencia catalítica de nuestro inmovilizado.

6.1. Primera Etapa (2018 – 2019): Obtención y Caracterización de las Materias Primas

6.1.1. Aceite de Fritura (WCO)

Después de haber sido obtenido y pretratado, se procedió a determinar el perfil de ácidos grasos del WCO. Los principales residuos de AG identificados son: C18:2 (55.91%), C16:0 (20.91%) y C18:1 (16.54%). Este perfil concuerda con lo reportado por Orozco-Hernández *et al.* (2016) con la diferencia de que en su trabajo encontraron pequeñas cantidades de ácido esteárico y ácido linolénico (0.87 y 6.28% en peso, respectivamente). No obstante, estas variaciones se pueden atribuir al origen vegetal del WCO, así como las modificaciones que sufre su composición por el reúso a altas temperaturas.

El perfil de AG del WCO analizado se constituye por un 91.04% de ácidos grasos insaturados (AGI), mientras que los ácidos grasos saturados (AGS) representaron un 8.95%, lo que da como resultado una relación AGS/AGI de 0.1. De acuerdo con este perfil de ácidos grasos, el WCO puede utilizarse para la obtención de biodiésel, lo cual es prometedor por que se trata de una materia prima de muy bajo costo, aunado a que al tratarse de un residuo doméstico puede evitarse su vertido

a los sistemas de drenaje, minimizando así el impacto ambiental que genera (Sahar *et al.*, 2018). El peso molecular calculado para esta MP2G es de 878.39 g/mol.

6.1.2. Aceite de Semilla de Algodón

La segunda materia prima utilizada en esta tesis doctoral es CSO. Al ser el algodón un importante producto en la región en la que se encuentra la Unidad Delicias era más que necesario dar una aplicación práctica a este residuo agroindustrial y ofrecer alternativas de valorización.

6.1.2.1. Contenido lipídico. Para recuperar la mayor cantidad de lípidos contenidos en la semilla de algodón, se evaluaron tres técnicas de extracción, sin embargo, es importante mencionar que, en primera instancia, se siguió la Norma Oficial Mexicana NMX-F-089-S-1978, obteniéndose un contenido de 28.68%. Cuando se evaluaron las técnicas de ES, EM y EAU, se pudo incrementar la recuperación de lípidos hasta un RE de 38.25% (ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimientos de extracción de CSO por tres diferentes métodos.

Método de extracción	SO	RE (%)
NMX-F-089-S-1978	Hexano	28.68 ^{cd}
ES	Hexano	23.18±1.95 ^d
	Folch	20.19±1.42 ^e
	CHCl ₃ -CH ₃ OH (1:2)	28.18±2.18 ^{cd}
EM	-	9.79±0.71 ^f
	Hexano	23.63±1.81 ^d
EAU	Folch*	38.25±0.52 ^a
	CHCl ₃ -CH ₃ OH (1:2)	30.04±2.60 ^{bc}

ES: Extracción por Soxhlet, EM: extracción mecánica, EAU: extracción asistida por ultrasonido; SO: solvente orgánico, RE: rendimiento de extracción. Los datos mostrados son los valores de las medias ± la desviación estándar (n = 6). Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

Dicho RE resultó ser el más alto tanto para los ensayos empleando EAU, como para los tres métodos de extracción evaluados. Mediante EAU se pudo extraer hasta 4 y 1.4 veces más lípidos

en comparación a los métodos EM y ES, respectivamente. El Cuadro 4 (sección 8.5.4) muestra todos los RE obtenidos a través de sus respectivas corridas experimentales. Dentro de ellas, las corridas 16 y 20 son las que más destacan. Las condiciones de extracción ensayadas en la corrida 16 permitieron alcanzar el RE más alto, mientras que el más bajo (8.72%) se obtuvo bajo las condiciones de la corrida 20. Cabe mencionar que el Cuadro 4 muestra el efecto significativo del SO sobre los RE obtenidos. Este efecto se puede apreciar al comparar los RE entre las corridas 16 (38.25%) y 17 (21.81%), donde la única condición de extracción diferente es el SO empleado. En el caso de las corridas 1 (29.17) y 2 (30.01), el SO permitió obtener RE sin diferencia significativa; sin embargo, si estos se comparan al obtenido en la corrida 16, se puede asumir que tanto la temperatura como el tiempo de extracción también influyen sobre el RE. Por otro lado, dentro de las corridas 14, 23 y 25, las variables que demostraron un efecto son el tiempo de extracción y la relación solvente:semilla. Con base a los resultados obtenidos, la mezcla Folch mostró ser el SO más eficiente para la extracción del CSO, seguido por el $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:2) y hexano. La eficiencia de los SO se puede atribuir a sus diferentes polaridades y viscosidades (Tian *et al.*, 2013). La mezcla $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ puede interactuar con componentes alifáticos o polares como los fosfolípidos, mejorando el RE (Kozłowska *et al.*, 2016).

Por último, se encontró que bajas relaciones solvente:semilla incrementan el RE. Esto se puede observar en las corridas 24 y 26, donde con una relación 10:0.5 (mL/g) se logró duplicar el RE en comparación a una relación 10:1.5 (mL/g). Esto se puede atribuir al hecho de que entre mayor sea la cantidad de semilla de algodón sujeta a la extracción de aceite, se requiere una mayor cantidad de SO para mejorar el proceso. Un comportamiento similar se puede observar entre las corridas 6 y 8, como también entre las corridas 23 y 25.

6.1.2.2. Optimización del proceso de extracción. El efecto de las variables independientes se describió en la sección anterior y se muestran en la Figura 5. De acuerdo con los datos, un aumento en la temperatura (Figura 5a) favorece el incremento del RE; sin embargo, en nuestros resultados se encontró que la temperatura de 45°C favorecía más la extracción que una temperatura mayor (60°C). Observaciones similares se encontraron en la literatura técnica. Wong *et al.* (2019) reportaron un incremento en la extracción de aceite de avellana cuando se incrementó la temperatura de 28 a 38 °C, pero al aumentarse de 38 a 48°C el RE disminuyó. De acuerdo con

nuestra optimización, la temperatura idónea para la extracción del CSO es 51°C, la cual es ligeramente mayor al valor de 45°C, la temperatura utilizada en la corrida 16. Es posible que, a temperaturas más elevadas, las burbujas creadas por las fuerzas de cavitación colapsen con una menor intensidad, disminuyendo su efecto disruptivo sobre la matriz de la muestra; ya sea por el incremento en la presión de vapor, desarrollándose una presión similar entre el interior y exterior de la burbuja, o por una disminución en la tensión superficial, afectándose la formación de burbujas (Goula, 2013). Algunos estudios indican que temperaturas elevadas conllevan a una mayor cantidad de extracción de aceite. Samaram *et al.* (2015), mencionó que se alcanzaron RE de semillas de papaya y avellanas superiores, cuando la temperatura se incrementó de 20 a 62.5°C. Zhang *et al.* (2009) citaron que, al incrementar la temperatura y tiempo de extracción, se mejoró la extracción de aceite del polvo de almendra por EAU, obteniendo un 81.89% de aceite después de 55 min y 51°C. Por otro lado, Goula (2013) y Li *et al.* (2015) reportaron en sus trabajos una pequeña reducción en sus RE, cuando las temperaturas excedieron los 20 y 40°C, respectivamente. Con respecto al SO, el solvente Folch resultó ser la mejor opción para el proceso de extracción (Corrida 16, Figura 5b), ya que con este SO se alcanzó el RE más alto, lo cual puede atribuirse a las polaridades y viscosidades de los solventes presentes en dicha mezcla. Con respecto al tiempo de extracción, tiempos más largos conducen a RE más elevados (Figura 5c).

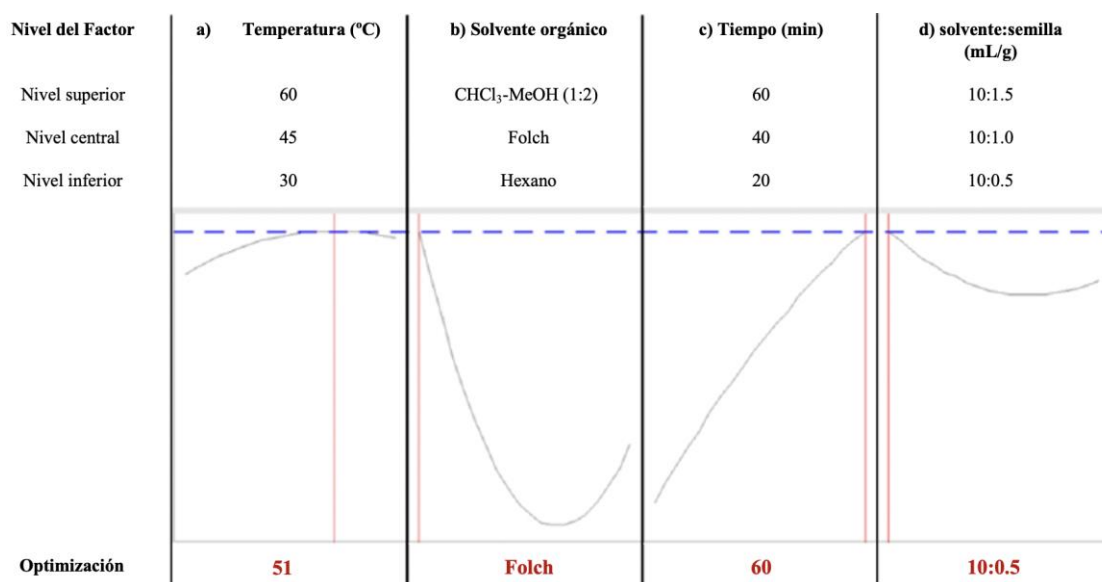


Figura 5. Gráficos de la optimización de las variables independientes durante el proceso de extracción de CSO.

En nuestros resultados, se puede observar que después de 60 min se alcanzó el RE más alto, tal como demuestra la optimización. Esto concuerda con Wong *et al.* (2019), quienes optimizaron la extracción de aceite de avellana a través de EAU, utilizando etanol como SO por 90 min (38°C y 90% de amplitud de ultrasonido). Esto puede ser debido a que tiempos más largos permiten al aceite contenido en la muestra difundirse en el SO (de Mello *et al.*, 2017). Las tres variables del proceso de extracción descritas previamente se ven afectados por la relación solvente:semilla (Figura 1d). Chanioti y Tzia (2017) reportaron que al incrementar la relación los RE del aceite incrementaron de igual manera. Al emplearse grandes cantidades de SO en baja cantidad en peso de muestra intensifica la capacidad del solvente de extraer el aceite de la matriz de la muestra, ya que se produce una mejor difusión y, por lo tanto, un gradiente de concentración dentro de la muestra, mejorando la transferencia de las moléculas del aceite hacia el medio líquido (Samaram *et al.*, 2015). Este efecto se observó también en el presente estudio, debido a que se obtuvieron RE más altos cuando se adicionó mayor cantidad de solvente con respecto a la cantidad de muestra. Cabe mencionar que, cuando el proceso se optimizó, la relación 10:0.05 se definió como la mejor. De acuerdo con la optimización (ver Cuadro 6), los términos lineal y cuadráticos del SO (X_2 y X_{22} , respectivamente), y el término lineal de la relación solvente:semilla (X_4) ejercieron el mayor efecto sobre RE ($p < 0.001$), seguido por el término lineal del tiempo de extracción (X_3) ($p < 0.005$). Por otro lado, los términos de interacción del SO y tiempo de extracción (X_2X_3), así como también los de SO y la relación solvente:semilla son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Cuadro 6. Coeficientes de regresión y valores P de los factores del modelo de segundo orden.

Factor	Coefficiente	Valor P
Intercepto	17.99	0
X_1	-0.943	0.152
X_2	-4.278	0
X_3	2.511	0.002
X_4	-3.646	0
$X_1 \cdot X_1$	-1.128	0.246
$X_2 \cdot X_2$	9.15	0
$X_3 \cdot X_3$	-1.199	0.219
$X_4 \cdot X_4$	1.898	0.062
$X_1 \cdot X_2$	-0.51	0.641
$X_1 \cdot X_3$	1.91	0.098
$X_1 \cdot X_4$	0.53	0.625
$X_2 \cdot X_3$	-3.62	0.005
$X_1 \cdot X_4$	-2.43	0.042
$X_3 \cdot X_4$	-0.32	0.771

X_1 : temperatura (°C), X_2 : solvente orgánico, X_3 : tiempo de extracción (min), X_4 : relación solvente:semilla (mL/g).

Al cancelar los factores no significativos, el modelo matemático obtenido expresado en términos del RE (y_1) se muestra en la Ecuación (4):

$$y_1 = 17.99 - 4.278X_2 + 9.150X_2^2 + 2.511X_3 - 3.646X_4 - 3.620X_2X_3 - 2.43X_2X_4 \quad (4)$$

donde X_2 es el SO, X_3 el tiempo de extracción, y X_4 la relación: solvente:semilla.

El coeficiente de regresión (R^2) es 0.9556, lo cual indica un buen ajuste debido a que el 95.56% de la variabilidad total de la variable de respuesta podría explicarse por medio del modelo matemático. De la Ecuación (4), las condiciones óptimas para la extracción del aceite de semilla de algodón son: 51°C, Folch como SO, 60 min, y una relación solvente:semilla de 10:0.05 mL/g; con un rendimiento teórico del 39.97%.

Cuando dichas condiciones se evaluaron, se alcanzó un RE experimental de $37.97 \pm 0.73\%$. Este rendimiento era muy cercano al RE alcanzado bajo la corrida 16. Las diferencias en los valores de

rendimiento entre el RE teórico y experimental son debido a las diferentes temperaturas (51 y 45°C, respectivamente) y relaciones solvente:semilla (10:0.5 y 10:1, respectivamente) empleadas.

6.1.2.3. Perfil de ácidos grasos. Una vez que la extracción del aceite se optimizó, se procedió con la caracterización del perfil de AG del CSO (ver Cuadro 7). Los principales residuos de AG son; C18:2 (55.91%), C16:0 (20.91%) y C18:1 (16.54%).

Cuadro 7. Perfil de ácidos grasos del CSO.

AG		% peso
C8:0	Ac. Caprílico	0.74
C10:0	Ac. Cáprico	2.43
C14:0	Ac. Mirístico	0.88
C16:0	Ac. Palmítico	20.91
C18:0	Ac. Esteárico	2.59
C18:1	Ac. Oléico	16.54
C18:2	Ac. Linoléico	55.91
Acidos grasos saturados	Ácidos grasos saturados	24.96
Acidos grasos insaturados	Ácidos grasos insaturados	72.45
AGS/AGI	Relación AGS/AGI	0.4

Este perfil concuerda con la composición mencionada por Thompson *et al.* (2019) sobre dichos residuos: 50-60%, 22-26% y 16-20%, respectivamente. El perfil de AG del CSO analizado se constituye por un 72.45% de AGI, mientras que los AGS representaron un 24.96%, lo que da como resultado una relación AGS/AGI de 0.35. Es importante destacar que el perfil de AG del CSO revela una composición lipídica de alta calidad, no solo para la obtención de biodiésel sino también para aplicaciones nutricionales como aceite para freír (Arslan *et al.*, 2016), o la producción de oleogel (Pehlivanoglu *et al.*, 2018) y manteca (Imran y Nadeem, 2015), entre otros. El CSO extraído en el presente estudio se utilizó junto con el WCO como materia prima para reacciones de transesterificación, bajo un proceso enzimático novedoso.

Una vez obtenida su composición lipídica, se calculó el peso molecular del CSO: 845.2 g/mol.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa hicieron posible la participación en dos eventos colectivos:

- a) *Ponencia*: “Aprovechamiento de semilla de algodón para la obtención de biodiésel”, presentada en el ciclo de Conferencias llevado a cabo del 26 – 28 de septiembre de 2018 en Saltillo, Coahuila, en el marco del Tercer Simposio de Ingenieros en Biotecnología efectuado en Saltillo, Coahuila, México.
- b) *Cártel*: “Optimisation of ultrasound-assisted extraction of cottonseed oil”, presentado en el e-congress of Food Biotechnology and Engineering. 10 y 11 de diciembre de 2020.

Por otro lado, es de gran relevancia destacar que los resultados descritos en la sección 9.1.2, permitieron la publicación tanto de un artículo científico como de un capítulo de libro:

- a) *Artículo*: **E. Rojo-Gutiérrez**, J.J. Buenrostro-Figueroa, R. Natividad, R. Romero, D.R. Sepúlveda, R. Baeza-Jiménez. 2020. Effect of different extraction methods on cottonseed oil yield. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 19(Sup. 1), 385-394.
- b) *Capítulo*: **E. Rojo-Gutiérrez**, J.J. Buenrostro-Figueroa, L.X. López Martínez, D.R. Sepúlveda, R. Baeza-Jiménez. 2020. “Biotechnological potential of cottonseed, a by-product of cotton production” en *Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume II: Non-Biological Approaches*. Springer Nature Switzerland AG. Pp 63-82. ISBN: 978-3-030-39207-9.

6.2. Segunda Etapa (2019 – 2020): Obtención de Biodiésel a Partir de WCO y CSO con la Enzima Novozym 435®

Una vez obtenidos y caracterizados los aceites a emplear como materias primas (MP2G), se procedió a la obtención de biodiésel mediante reacciones de transesterificación catalizadas por la enzima comercial Novozym 435®, con la correspondiente evaluación de diferentes parámetros de reacción: carga de enzima, temperatura y relación molar de sustratos, en un reactor discontinuo.

6.2.1. Reacciones Enzimáticas de Transesterificación

Esta primera serie de reacciones de transesterificación (a partir de WCO) se llevaron a cabo para encontrar las mejores condiciones que conducían al más alto contenido de FAEE, para posteriormente evaluarlas con CSO y eventualmente con el catalizador híbrido.

Iniciamos esta segunda etapa de la tesis, explorando el efecto de la carga de enzima en tres diferentes concentraciones: 5, 10 y 20%, con respecto a la mezcla total de sustratos. En otras investigaciones se han utilizado cargas enzimáticas similares (Novozym 435[®]) para la producción de biodiésel, como las de Amini *et al.* (2017), Nguyen *et al.* (2018), y Moreira *et al.*, (2020), quienes usaron rangos de 6 – 8% (peso/peso), 10 al 20% (peso/peso), y 2 – 10% (peso de aceite), respectivamente. Por otro lado, Du *et al.* (2004) emplearon una carga de 30% (peso/peso).

Como era de esperarse, conforme la carga enzimática aumentó, la concentración de FAEE también incrementó. A las 24 h de reacción se alcanzaron los mayores contenidos de FAEE: 92.27, 86.75 y 66.13%, para las cargas enzimáticas de 20, 10, y 5%, respectivamente (ver Figura 6).

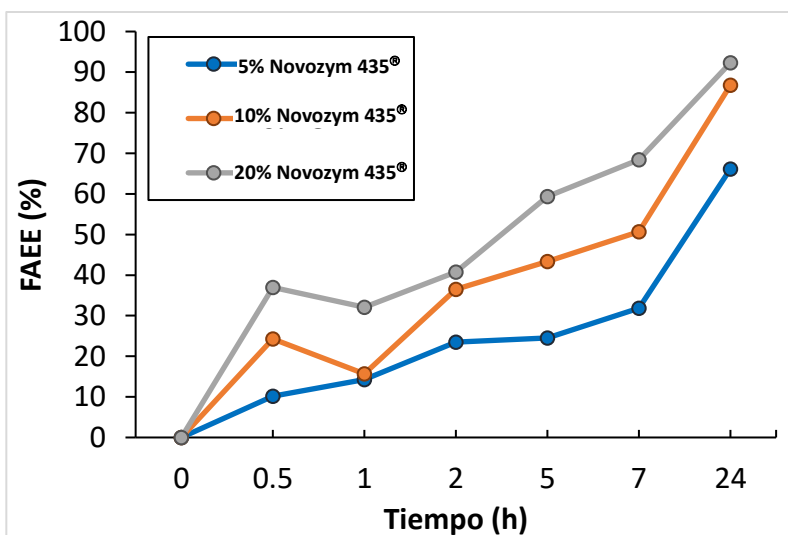


Figura 6. Efecto de la carga enzimática en la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo a una temperatura de 30 °C, 200 rpm y una relación molar 6:1 (etanol:aceite), y se analizaron por triplicado

Además, los valores obtenidos a través de las tres concentraciones enzimáticas empleadas presentaron rendimientos de FAEE estadísticamente diferentes ($p < 0.005$), como lo muestra la Figura 7.

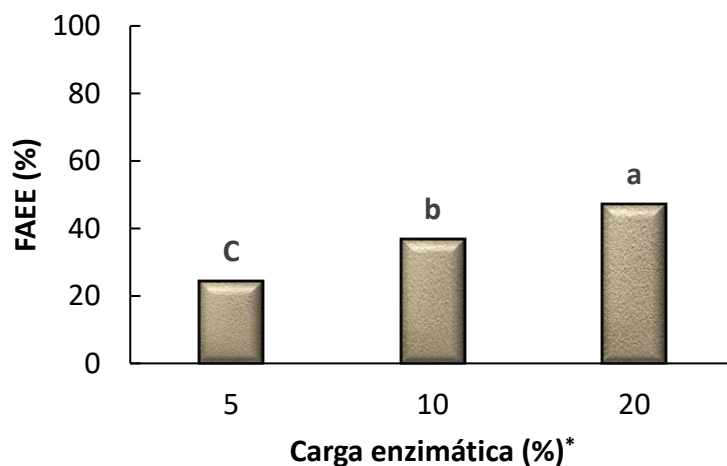


Figura 7. Efecto de la carga enzimática sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). * % del peso total de la mezcla de sustratos. Condiciones de reacción: 30 °C, 200 rpm, relación molar 6:1 (etanol:aceite). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Al aumentar la concentración enzimática en el medio de reacción, se incrementa el número de centros activos disponibles para interactuar con los sustratos del medio de reacción. En consecuencia, la eficiencia de transesterificación incrementa (Tupufia *et al.*, 2013). Es por ello que, mayores cantidades de biocatalizador permiten alcanzar la máxima conversión de FAEE en un tiempo más corto. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2017) y Encinar *et al.* (2018), quienes al aumentar la concentración de Novozym 435® (1.25-10% peso/peso y 40-80 U/g, respectivamente) para la obtención de biodiésel a partir de WCO y aceite de girasol, respectivamente, observaron un incremento en el grado de reacción.

No obstante, se debe tomar en cuenta que el precio del biocatalizador es considerable, y puede ser un factor determinante en la sustentabilidad del proceso de obtención de biodiésel. Por tanto, considerando el obtener un proceso eficiente el cual considere el costo-beneficio, se definió una carga enzimática del 10% como base para el desarrollo del resto de los ensayos experimentales; aunque sea evidente una diferencia significativa en la producción de FAEE entre un 20 y 10% de

carga enzimática, duplicar el costo del biocatalizador por incrementar un 10% la eficiencia catalítica en el caso de la comparación de medias y un 6% en la cinética a 24 h, puede ir en contra de la viabilidad económica del proceso.

Una vez definida la carga enzimática, se prosiguió con la evaluación del efecto de la temperatura (30, 40 y 50 °C). Así como la carga enzimática, la temperatura es de suma importancia para la reacción de transesterificación, ya que por un lado su incremento coadyuva a la actividad catalítica y por otro favorece la miscibilidad de los sustratos.

El aumento de la temperatura disminuye la viscosidad de la mezcla de sustratos, fomentando la transferencia de masa al incrementarse la difusión de los sustratos (Choi *et al.*, 2018). Sin embargo, es importante considerar que altas temperaturas pueden afectar la estructura de la lipasa induciendo su desnaturalización al ser una proteína (Xu *et al.*, 2000). Debido a que la actividad del biocatalizador es dependiente de la temperatura, el efecto de la misma se evaluó en un rango de 30 – 50°C, ya que se conoce que las lipasas muestran una conversión >90% de FAEE dentro de ese rango (Von der Haar *et al.*, 2014). En la Figura 8 se puede observar el efecto de la temperatura sobre la producción de FAEE, la cual aumenta a medida que se incrementa la temperatura.

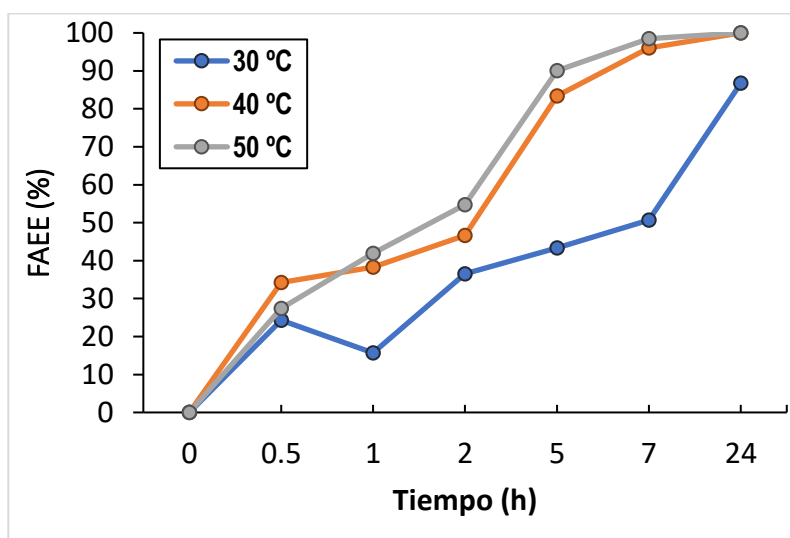


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo utilizando una carga enzimática del 10%, a 200 rpm y una relación molar 6:1 (etanol:aceite), y se analizaron por triplicado.

Se logró alcanzar un 100% de conversión a las 24 h de reacción empleando una temperatura de 40 y 50 °C, mientras que a 30°C la máxima conversión alcanzada es de tan solo 86.75%. Los resultados mostraron que una diferencia de 10°C entre los valores utilizados impactó significativamente en la producción de FAEE, obteniendo el mejor rendimiento con una temperatura de 50°C (ver Figura 9).

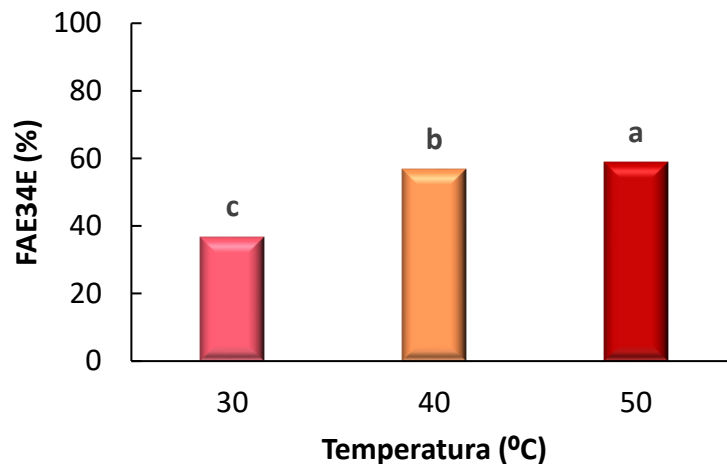


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). Condiciones de reacción: 10% N435®, 200 rpm, relación molar 6:1 (etanol:aceite). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Cabe mencionar que es importante el desarrollo de un proceso eficiente que minimice a su vez la demanda energética. En ese contexto, dentro de la comparación de medias, a pesar de que la producción de FAEE a 50 °C (58.8%) es significativamente diferente a la obtenida a 40 °C (56.8%), el costo energético invertido a cambio de mejorar un 2% el proceso podría perjudicar su sustentabilidad, cuando en la cinética de transesterificación ambas temperaturas alcanzaron el 100% de conversión después de 24 h. Dicho esto, se seleccionó la temperatura de 40 °C como base para llevar a cabo las reacciones de transesterificación siguientes.

Cabe mencionar que nuestros resultados demostraron ser similares a los obtenidos por Ismail *et al.* (2017), quienes evaluaron un rango de temperatura de 20-50 °C. Tras la optimización de su proceso, la temperatura óptima de reacción encontrada para la conversión de WCO a biodiésel catalizada por Novozym 435® era 46.23 °C.

Por último, se evaluó el efecto de la relación molar de sustratos, etanol:aceite, el cual es otro parámetro importante en términos del balance de materia, afectando directamente el rendimiento y

el avance de la reacción de transesterificación (Jacobson *et al.*, 2008). Por la estequiometría de esta reacción, son necesarios 3 moles de alcohol por cada mol de aceite presente en el medio (Amini *et al.*, 2017), por lo que la reacción de transesterificación se incrementa cuando se adiciona un exceso de alcohol. Debido a la naturaleza reversible de la reacción de transesterificación, es común que se utilicen relaciones mayores a 3:1 para favorecer la formación del producto y evitar así que los ésteres obtenidos se disocien en reactantes (Banerjee y Chakraborty, 2009). Sin embargo, las moléculas de alcohol al ser polares pueden interactuar y ligarse directamente con las enzimas, inhibiendo competitivamente la lipasa a través de un mecanismo Bi Bi Ping-Pong, que consta de dos etapas que ocurren de manera simultánea. Durante la primera etapa ocurre una hidrólisis, en la que la enzima reacciona con el primer sustrato (triglicérido, diglicérido) para formar un complejo acil-enzima y liberando un AGL y agua (el primer producto). En la segunda etapa ocurre una etanolólisis, en el cual el complejo acil-enzima reacciona con el segundo sustrato (el alcohol), liberando el éster correspondiente como segundo producto. Este segundo sustrato es muy afín a la enzima, en particular los alcoholes de cadena corta tienden a ser más reactivos y en consecuencia su interacción con la enzima se favorece, sin embargo, el exceso de concentración de estos es lo que conlleva a la inhibición.

En este proyecto, se emplearon como relaciones molares 3:1, 6:1 y 9:1 (etanol:aceite). La Figura 10 muestra la producción de FAEE con base en dichas relaciones molares.

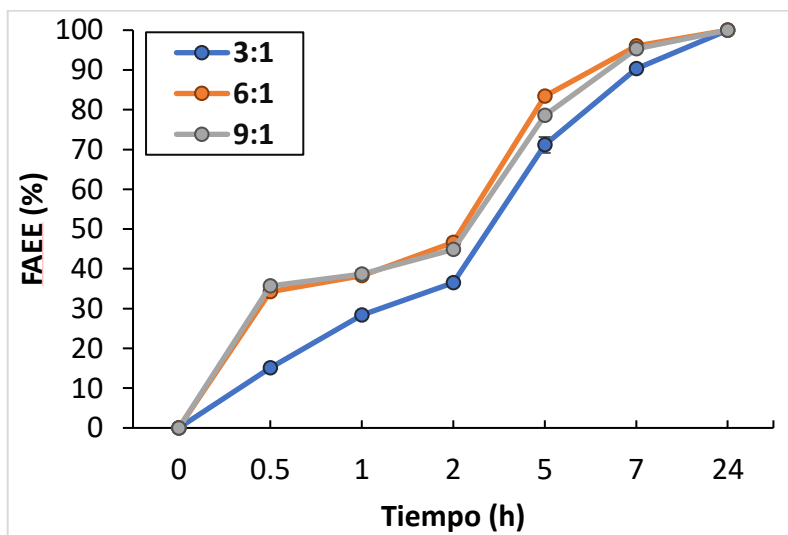


Figura 10. Efecto de la relación molar etanol:aceite sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con respecto al tiempo. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo utilizando una carga enzimática del 10%, N435®, 40 °C y 200 rpm, y se analizaron por triplicado.

Es posible apreciar que el contenido de FAEE es muy similar para las relaciones 9:1 y 6:1. Sin embargo, para la relación 3:1 se requirió mayor tiempo para obtener resultados cercanos a los obtenidos cuando se duplicaron o triplicaron los moles de etanol por cada mol de aceite. No obstante, se logró alcanzar un 100% de FAEE a las 24 h de reacción con las tres relaciones molares empleadas.

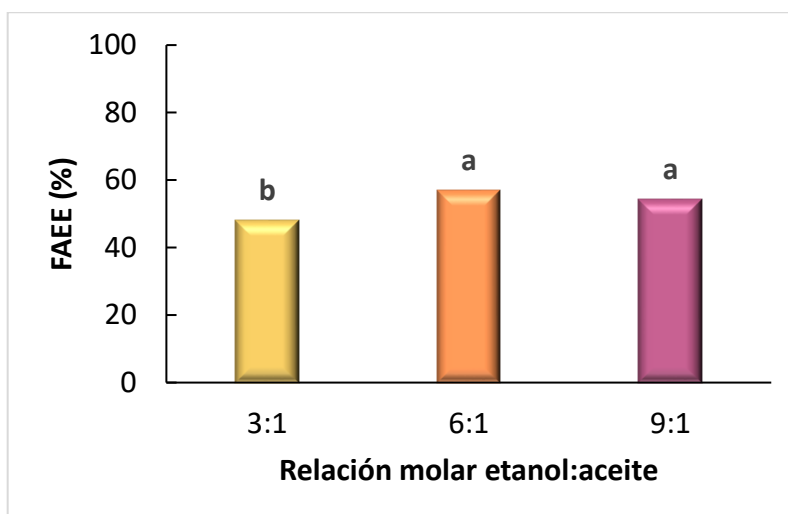


Figura 11. Efecto de la relación molar (etanol:aceite) sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). Condiciones de reacción: 10% N435[®], 40 °C, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

La Figura 11 muestra que al aumentar la relación estequiométrica mínima requerida (3:1), aumenta significativamente la producción de FAEE. Por otro lado, no se observó ningún efecto significativo al aumentarse la relación molar de 6:1 a 9:1. Esto nos indica que emplear una relación 6:1 nos da el mismo rendimiento que empleando un mayor exceso de etanol (9:1), y que además no hubo indicativos de que el exceso de etanol empleado estuviera comprometiendo la actividad catalítica de la lipasa, ya que no se presentó una disminución significativa en la producción de FAEE, lo cual estaría relacionado con la desnaturalización de la enzima por un exceso de etanol (Rachmadona *et al.*, 2020). Por lo tanto, se seleccionó la relación molar 6:1 como parte de las mejores condiciones de reacción. Este resultado concuerda con la relación molar típicamente utilizada (6:1) en la producción industrial de biodiésel a partir de WCO (Raheem *et al.*, 2020).

Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción (10% Novozym 435[®], 40 °C, relación 6:1, 200 rpm), se emplearon para llevar a cabo reacciones de transesterificación y determinar si se alcanza el contenido de FAEE estipulado en la normativa internacional (UNE-EN 14103). Los resultados obtenidos mostraron que a partir de las 7 h de reacción se tiene un contenido de FAEE > 96% (Figura 12), por lo tanto, se cumple con la norma.

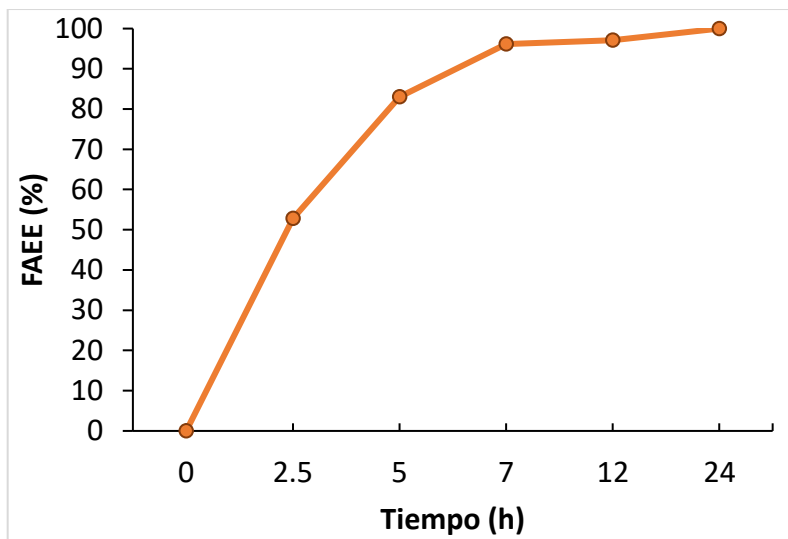


Figura 12. Reacción de transesterificación bajo las mejores condiciones de reacción encontradas para la enzima comercial Novozym 435[®] con WCO (10% enzima, 40°C, relación molar 6:1 y 200 rpm).

Algo importante a destacar, es que a medida que incrementa el tiempo de reacción, el % de FAEE aumenta significativamente hasta las 7 h (Figura 13). A partir de las 7 h de reacción, aumentar el tiempo de reacción no produce ningún efecto significativo en el contenido de FAEE. Por lo tanto, se seleccionó un tiempo de 7 horas como referencia para todos los ensayos experimentales posteriores.

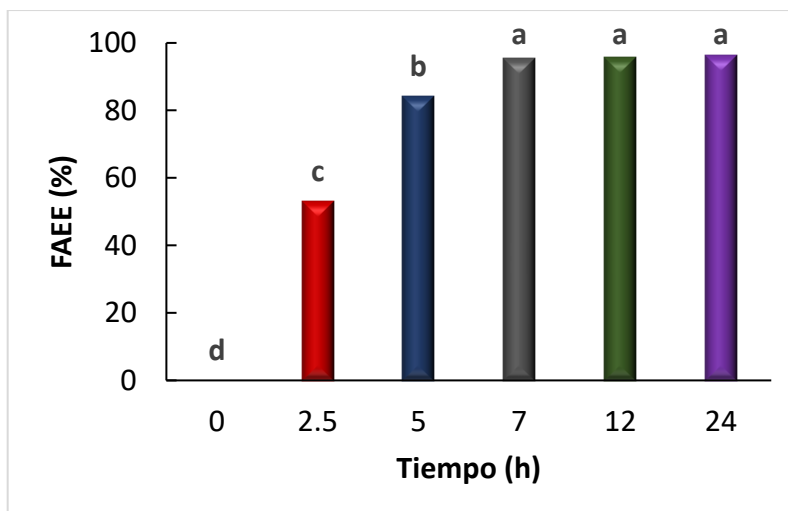


Figura 13. Efecto del tiempo sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). Condiciones de reacción: 10% N435®, 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Luego de la determinación de las mejores condiciones de reacción, se replicó un ensayo experimental bajo las mismas condiciones, pero a partir de CSO (ver Figura 14). Se pudo obtener un contenido de FAEE de 94.56% después de 7 h de reacción. Este resultado es similar al reportado por Tian *et al.* (2009), quienes pudieron alcanzar un rendimiento de FAEE del 96% con Novozym 435®, bajo las siguientes condiciones: 50 °C, carga enzimática de 12.5% (peso aceite), 24 h y 160 rpm. Sin embargo, en su trabajo emplearon carbonato de dimetilo como donador de acilo y *t*-butanol como solvente, el cual junto con la temperatura mitiga la limitación de transferencia de masa al disminuir las viscosidades de los sustratos. Por otro lado, comparado con estudios donde la transesterificación enzimática se llevó a cabo en medios libres de solventes, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Köse *et al.* (2002). En su estudio, se evaluó la transesterificación de CSO refinado y alcoholes primarios y secundarios, en presencia de la enzima Novozym 435®. Las mejores condiciones de reacción encontradas tras el análisis de resultados eran las siguientes: 50 °C, 7 h, relación molar 4:1 (metanol:aceite), y 30% de carga enzimática (peso aceite). Bajo estas condiciones, obtuvieron un rendimiento máximo de 92% de FAEE, el cual es ligeramente menor al obtenido en nuestros resultados. Aunque la relación molar que utilizaron es menor a la de nosotros (6:1), la carga enzimática adicionada es mucho mayor.

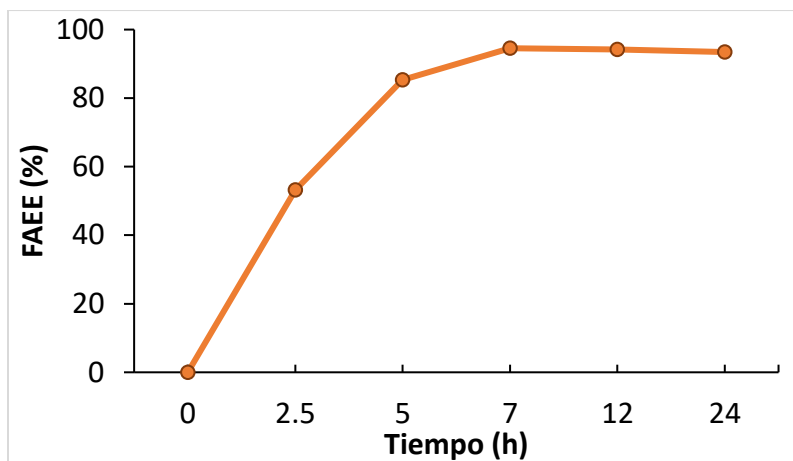


Figura 14. Reacción de transesterificación bajo las mejores condiciones de reacción encontradas para la enzima comercial Novozym 435® con CSO (10% enzima, 40 °C, relación molar 6:1 y 200 rpm).

6.3. Tercera Etapa (2020): Desarrollo del Catalizador Híbrido

El rendimiento de adsorción de la enzima depende de diversos factores. Dentro de los principales se destacan las propiedades de la superficie del soporte, el pH, su naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, la fuerza iónica de la solución (buffer), la temperatura, así como la estructura y estabilidad de la enzima misma a inmovilizar (Furtado y Cantera, 2002; Duarte-Silva *et al.*, 2014). Por esta razón, en la presente investigación se evaluaron los parámetros de temperatura (30, 40 y 50 °C), relación enzima:buffer (1:0, 1:1, 2:1), pH (6, 7, 8) y buffer (fosfatos de sodio, Tris-HCl) empleados en la técnica de inmovilización por adsorción física. Por otro lado, la alúmina al ser un óxido básico, interactúa típicamente con las lipasas a través de grupos hidroxilos encontrados en su superficie, mediante enlaces débiles (Zdarta *et al.*, 2018). Estos enlaces incluyen fuerzas electroestáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Con base en esto, se llevó a cabo el proceso de hidroxilación (solución piraña) previo al proceso de inmovilizado, con el propósito de fomentar el número de grupos hidroxilo disponibles en su superficie, y, en consecuencia, el porcentaje de inmovilización.

En primera instancia, se evaluó la variación del peso del monolito tras someterse al proceso de inmovilización, donde se registró un incremento promedio de 0.03405 ± 0.003 g. Este aumento de peso se atribuyó al hecho de que a medida que la lipasa CALB se une a la matriz del monolito, su

peso incrementa. En el Cuadro 8 se resumen los resultados más relevantes de los ensayos experimentales de la inmovilización enzimática, donde se exploraron los efectos de varias temperaturas, valores de pH y buffers. Al analizar el cuadro se puede observar que a través del buffer de fosfatos de sodio a pH 6, se logró un porcentaje de inmovilización del 36.93%, mientras que con el buffer Tris-HCl (pH 8) era de 20.36%. De acuerdo con la literatura, las interacciones hidrofóbicas no se ven afectadas con los cambios de pH en el medio de adsorción (Brígida *et al.*, 2007). Por lo que esta diferencia en los valores de inmovilización de proteína podría estar relacionada con las interacciones electroestáticas. A diferencia de las hidrofóbicas, estas dependiendo del punto isoeléctrico tanto de la enzima como el soporte, si se ven afectadas con la variación de pH, ejerciendo un gran impacto en la capacidad de unión entre la lipasa y su portador (Gitlesen *et al.*, 1997).

Cuadro 8. Efecto de las variables evaluadas durante el proceso de inmovilización de CALB en monolitos.

Ensayos experimentales (condiciones de reacción)	Muestras	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Dif ($t_i - t_f$) ($\mu\text{g/mL}$)	Inmovilización de proteína (%)
Mezcla: 5 mL (1:1, CALB:Buffer, v/v) Buffer: Fosfatos de Na (0.1 M, pH 6)	M1 t_i	1615.58	596.67	36.93
	M1 t_f	1018.92	-	
Mezcla: 5 mL (1:1, CALB:Buffer, v/v) Buffer: Tris-HCl (0.1 M, pH 8 0)	M2 t_i	1493.92	304.17	20.36
	M2 t_f	1189.75	-	
Mezcla: 5 mL (2:1, CALB:Buffer, v/v) Buffer: Fosfatos de Na (0.1 M, pH 6)	M3 t_i	1562.25	392.50	8.8
	M3 t_f	1424.75	-	
Mezcla: 2.5 mL (CALB) Buffer: Fosfatos de Na (0.1 M, pH 6)	M4 t_i	1389.75	10.00	0.72
	M4 t_f	1379.75	-	

Se conoce que el punto isoeléctrico de la alúmina es a pH 8 (Eberhardt, 2004), mientras que el de CALB es a pH 6 (Kirk y Christensen, 2002). Por lo tanto, en una solución de pH = 6, el monolito se encuentra polarizado positivamente. Esto a su vez podría causar la polarización de la enzima (aniónica) debido a la fuerza de cargas ejercida por el soporte. De esta manera se pueden fomentar las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno, permitiendo así la unión de CALB al monolito. Por otro lado, al llevar a cabo el proceso de inmovilización a un pH de 8, la enzima cargada

negativamente sería quien ejercería la polarización del soporte, el cual a ese pH la totalidad de sus cargas es neutra. Por tanto, se asumió que al existir una mayor masa de soporte que de enzima en la suspensión de inmovilización, es más probable que la carga positiva del monolito polarice a la de la lipasa para que se desarrollen las interacciones previamente mencionadas. Así mismo, se observó que la variación en la relación enzima:buffer repercutió en el grado de inmovilización de CALB. Al duplicar el volumen de la enzima respecto al buffer, el porcentaje de inmovilización cayó abruptamente a $\approx 9\%$, y cuando este estuvo ausente, la retención de CALB en el monolito era prácticamente nula (0.72%). Estos comportamientos podrían atribuirse al hecho de que, al existir un volumen nulo o tan pequeño de buffer en comparación a la existente de enzima, las polarizaciones de la enzima y el soporte no se efectúan, y en consecuencia la cantidad de interacciones electroestáticas disminuyen. Con base en estos resultados, se decidió utilizar buffer de fosfatos pH 6 (0.1 M) en una relación 1:1 (CALB:buffer).

Con las observaciones anteriormente expuestas y en aras de incrementar el porcentaje de inmovilización, se procedió a realizar una cinética de inmovilización durante 48 h, monitoreando el avance de la misma cada 8 h. La Figura 15 muestra los comportamientos observados tanto para el contenido de proteína como para el porcentaje de inmovilización.

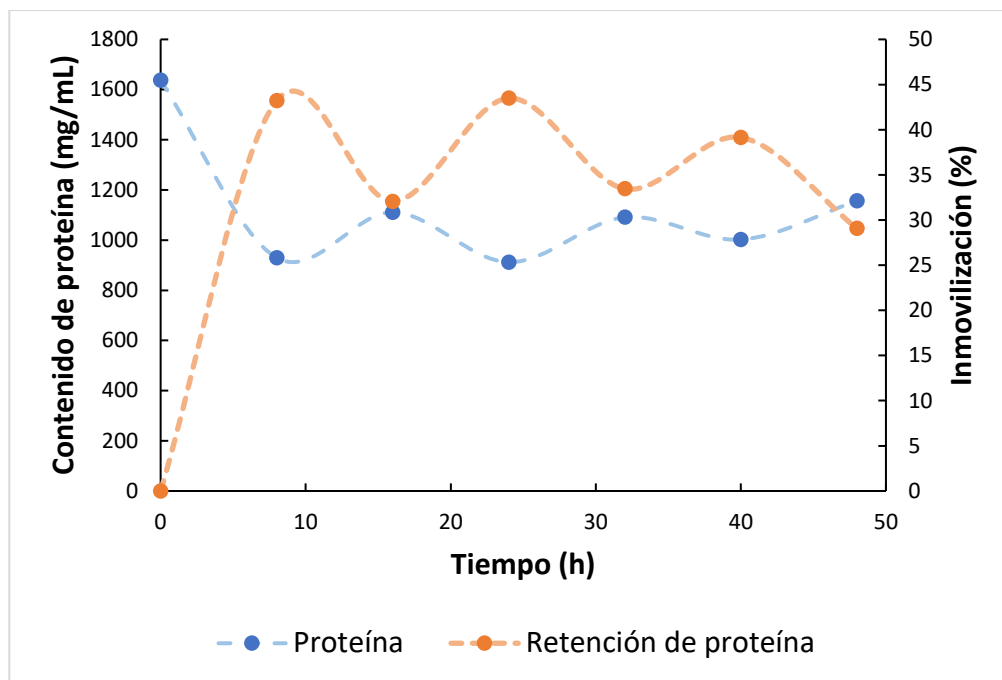


Figura 15. Cinética de inmovilización por adsorción física. Condiciones de inmovilización: 40 °C, buffer de fosfatos Na (pH 6, 0.1 M) y relación 1:1 (CALB:Buffer).

En la Figura 15 es posible apreciar que el porcentaje de inmovilización oscila durante toda la cinética. Esto puede deberse a que la enzima libre interactúa con los monolitos mediante los enlaces descritos previamente y es cuando se observan incrementos en el porcentaje de inmovilización. Sin embargo, al continuar el catalizador sometido a la agitación, las fuerzas de corte producidas por esta podrían conducir a la separación de la enzima de su soporte, disminuyendo consecuentemente la retención de proteínas.

Contrario a lo que se esperaba, los resultados mostraron que un tiempo de 8 h de inmovilización lograron los mismos valores de retención que los obtenidos a las 24 h (43%). Los resultados también mostraron que a las 8 y 24 h se dieron los puntos máximos de inmovilización de CALB. Por tanto, a partir de este ensayo todas las corridas de inmovilización física se llevaron a cabo por un tiempo de 8 h. Para determinar la eficiencia catalítica de nuestro inmovilizado híbrido, se calculó el porcentaje de inmovilización y posteriormente se evaluó si presentaba actividad lipasa. Para este último ensayo se empleó *p*-nitrofenil palmitato como sustrato para la obtención de *p*-NF. Los valores obtenidos en estas determinaciones mostraron como porcentaje máximo de inmovilización $35.59 \pm 5.4\%$ y una actividad (específica) lipasa de $1, 128.91 \pm 1.56$ U/g. La ficha técnica de

Lipozyme® CALB L refiere una actividad de 5, 000 U/g, mientras que para Novozym® 435 se indican 10, 000 unidades de laurato de propilo/g.

Es importante mencionar que aún cuando el porcentaje de inmovilización es bajo, se trata de un proceso novedoso. De acuerdo con la revisión de literatura, no se encontraron estudios donde se haya inmovilizado alguna lipasa en este tipo de monolito para la síntesis de biodiésel. Sin embargo, el proceso de inmovilización propuesto en el presente estudio puede mejorarse, y en consecuencia incrementarse, mediante el uso de otro tipo de pretratamientos para el monolito que permitan mayores fuerzas iónicas, por que aún cuando la estructura del monolito en términos de volumen y tamaño de poro es relevante, el tamaño de la partícula a inmovilizar, CALB, es considerable. De igual manera, podrían explorarse interacciones covalentes para que la unión de CALB en el monolito sea más fuerte y se eviten desprendimientos como los observados durante la cinética de inmovilización (ver Figura 15).

6.4. Cuarta Etapa (2021): Obtención de Biodiésel a Partir de WCO y CSO Utilizando el Catalizador Híbrido

Se llevaron a cabo reacciones de transesterificación (bajo las mejores condiciones de reacción) de ambos aceites en presencia del catalizador híbrido para a través de la producción de FAEE, poder evaluar y contrastar su eficiencia catalítica con respecto al catalizador comercial. Para esto último, se tomó como base un tiempo de 7 h de reacción, recordando que la transesterificación catalizada con la enzima comercial logró su máximo contenido de FAEE en ese tiempo, el catalizador híbrido, demostró poder alcanzar un contenido de FAEE de 95.8% y 96.3% a partir de WCO y CSO, respectivamente (ver Figura 16). Estos contenidos resultaron ser muy similares a los alcanzados con el catalizador comercial. La producción de FAEE a partir de CSO es ligeramente mayor que con la enzima comercial (94.6%), mientras que a partir de WCO es ligeramente menor (96.1%). Sin embargo, es importante a destacar que, con el catalizador híbrido, se logró alcanzar el punto de equilibrio a partir de las 5 h de reacción (95.8% y 94.4% a partir de WCO y CSO, respectivamente), dos horas antes que el catalizador comercial.

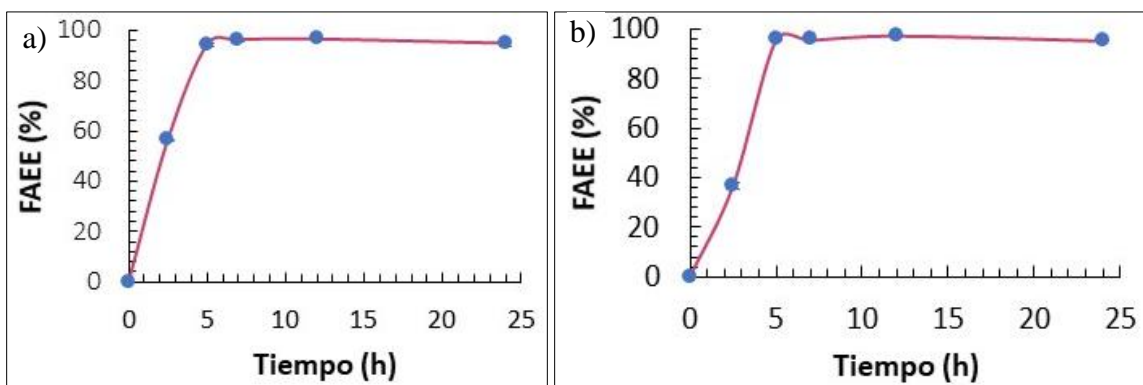


Figura 16. Reacciones de transesterificación catalizadas por el catalizador híbrido a partir de (a) WCO y (b) CSO, bajo las siguientes condiciones: 10% catalizador, 40 °C, relación molar 6:1 y 200 rpm.

Los resultados de la Figura 17 muestran que al igual como sucede con la enzima comercial, a medida que se prolonga el tiempo de reacción, se alcanza un contenido significativamente mayor de FAEE. Con base en dichos resultados, se confirmó que a partir de las 5 h de reacción la cantidad de FAEE obtenida no varía significativamente, con excepción de las 12 h; sin embargo, entre las 7 y 12 h de reacción, el contenido de FAEE no es estadísticamente diferente.

El hecho de que la reacción llegue a un punto de equilibrio en menor tiempo puede indicarnos que la transesterificación se está llevando a cabo de manera más rápida. Esto podría explicarse tomando en cuenta que la estructura tridimensional del monolito está conformada por una interconexión de macro-, meso- y microporos tridimensionales. Este tipo de estructuras han demostrado que la difusión de los sustratos mejora, así como también el área específica del monolito, traduciéndose en una mejor eficiencia catalítica (Li *et al.*, 2019).

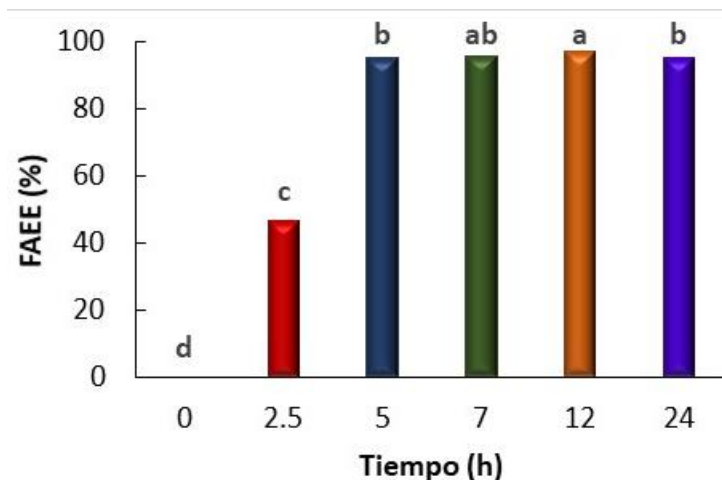


Figura 17. Efecto del tiempo sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO, utilizando el catalizador híbrido. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Con respecto a la materia prima, el catalizador híbrido mostró una mayor eficiencia (en términos de contenido de FAEE como se puede observarse en la Figura 18) cuando se obtuvo biodiésel a partir del CSO (Figura 18), contrario a lo observado al emplearse el catalizador comercial (Figura 19).

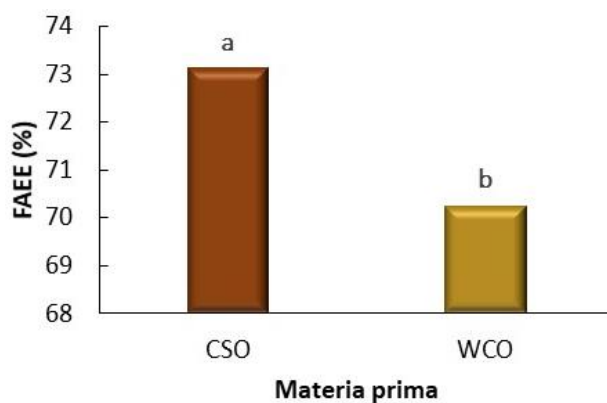


Figura 18. Efecto de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) en presencia del catalizador híbrido. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

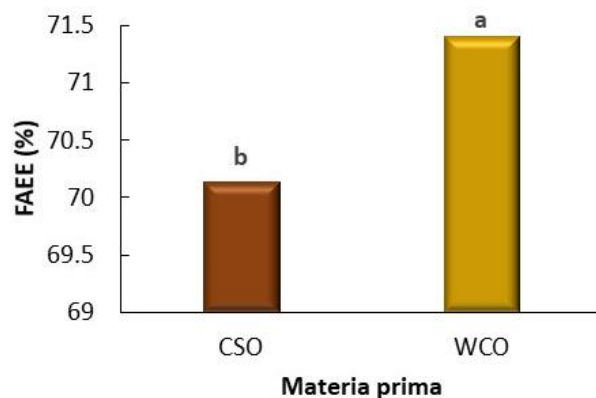


Figura 19. Efecto de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) en presencia del catalizador comercial. Condiciones de reacción: 10% N435[®], 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Es importante destacar que la eficiencia catalítica del catalizador comercial no presentó alguna diferencia estadística en comparación a la demostrada por el catalizador híbrido (Figura 20), aún y cuando la actividad de enzima por gramo de soporte registrada entre ambos catalizadores es diferente. Esto pudiera atribuirse a los siguientes criterios: (1) La estructura del monolito resulta benéfica para la difusión de las moléculas de sustrato y el contacto con las moléculas de CALB y (2) la lipasa modelo inmovilizada tanto en el catalizador comercial como en el híbrido, es la misma, la cuál ha sido ampliamente reportada como una de las enzimas comerciales más estables y eficientes.

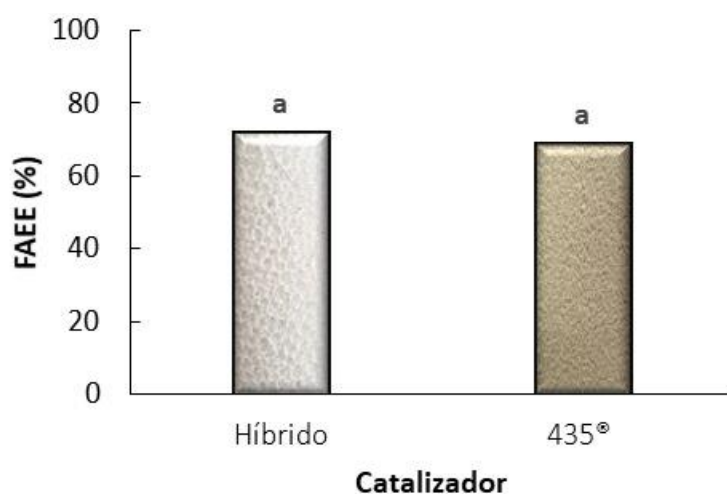


Figura 20. Efecto del catalizador sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

En lo que al análisis del efecto de la materia prima se refiere, no se observó ningún efecto significativo en la producción de FAEE para ninguno de los catalizadores (Figura 21), es decir, ambos catalizadores tienen la capacidad y potencial de convertir los ácidos grasos presentes en las dos materias primas en sus correspondientes ésteres etílicos.

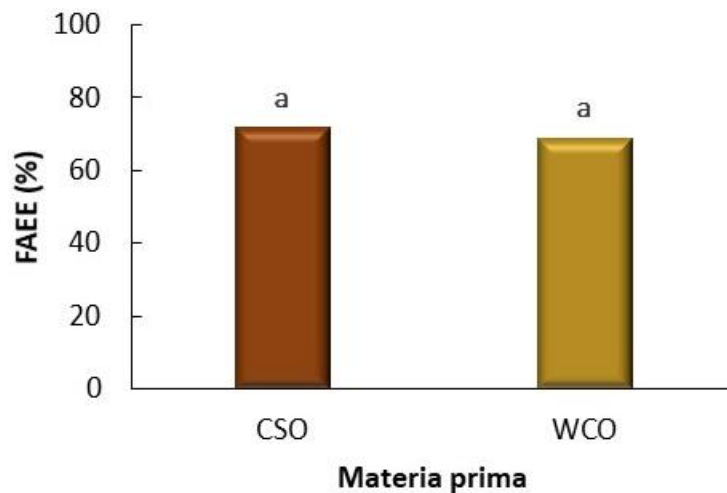


Figura 21. Efecto global de la materia prima sobre la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) a partir de CSO y WCO. Condiciones de reacción: 10% catalizador, 40 °C, relación molar 6:1, 200 rpm. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$).

Los resultados obtenidos durante esta última etapa se presentaron como ponencia: “Desarrollo de un catalizador híbrido (lipasa/monolito) para la producción de biodiésel a partir de materias primas de segunda generación”, en el Congreso Internacional de Desarrollo Sustentable y Energías Renovables, celebrado del 4 – 6 de noviembre de 2021 en Orizaba, Veracruz, México. Así mismo, se está terminando de escribir el artículo científico correspondiente.

Como pudo notarse en esta sección de Resultados y Discusión, se cumplió con el objetivo general planteado, así como con los diferentes objetivos específicos propuestos, al haber podido inmovilizar a CALB en los monolitos y evaluar su eficiencia catalítica en diferentes reacciones de transesterificación para la obtención de biodiésel.

7. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se estandarizaron y adaptaron diferentes protocolos analíticos, métodos de extracción y se evaluaron diferentes parámetros de reacción, permitiendo un mejor entendimiento del comportamiento catalítico de las enzimas y de su susceptibilidad al medio de reacción. Por ello, se tienen las siguientes conclusiones:

- a) Es posible revalorizar la semilla de algodón como una fuente alternativa de aceite para la síntesis de biodiésel, así como proporcionar al aceite de fritura, un residuo doméstico, una importante aplicación comercial.
- b) El rendimiento de extracción para la recuperación de CSO, no sólo es afectado por el método empleado para recuperar el aceite, sino también por las condiciones de extracción evaluadas. En este último sentido, el SO empleado es la variable más significativa.
- c) Las MP2G evaluadas como materias primas demostraron su potencial en la síntesis de biodiésel, permitiendo alcanzar contenidos de FAEE de 96.1 y 94.6 %, para WCO y CSO, respectivamente. Las mejores condiciones para esas reacciones de transesterificación son: 10% de carga de Novozym 435[®], 40°C, para una relación molar 6:1 (etanol:aceite), 200 rpm (orbital) de agitación, y 7 h de reacción.
- d) El máximo porcentaje de inmovilización alcanzado es de $35.59 \pm 5.4\%$ en los monolitos de α -alúmina. La actividad (específica) lipasa determinada para nuestro catalizador híbrido es $1, 128.91 \pm 1.56$ U/g. Las condiciones de inmovilización que hicieron posible este logro son: buffer de fosfatos de Na (pH 6, 0.1 M), una relación 1:1 CALB:buffer (v/v), 200 rpm de agitación, a 40 °C durante 8 h.
- e) La eficiencia de nuestro catalizador híbrido en las reacciones de transesterificación quedó demostrada al alcanzar contenidos de FAEE de 95.8 y 96.3%, para WCO y CSO, respectivamente, bajo las mejores condiciones evaluadas para el catalizador comercial. Lo anterior no sólo demuestra el potencial de nuestro inmovilizado híbrido, sino que además estos contenidos de FAEE se alcanzaron a las 5 h de reacción, mientras que para el inmovilizado comercial son necesarias 7 h.
- f) El catalizador híbrido desarrollado mostró la misma eficiencia ($\approx 96\%$) catalítica que la enzima comercial, Novozym 435[®], este puede atribuirse a la estructura porosa única que

- conforma al monolito, así como la estabilidad mecánica y térmica inherente de la alúmina.
- g) El monolito de α -alúmina mostró un gran potencial como soporte enzimático para el desarrollo de un nuevo y novedoso biocatalizador, capaz de catalizar la síntesis de biodiésel a partir de MP2G, cumpliendo con la normativa internacional.

8. RECOMENDACIONES

Aún cuando esta tesis doctoral se desarrolló exitosamente, es posible hacer mejoras y por ello se hacen las siguientes conclusiones:

- a) Se puede llevar a cabo una optimización tanto para las reacciones de transesterificación como para el método de inmovilización para conocer los valores óptimos de cada proceso.
- b) Si bien el método de inmovilización por adsorción física es el comúnmente utilizado por la industria por su eficiencia y bajo costo, una metodología de inmovilización covalente (química) pudiera brindar un rendimiento mayor de inmovilización de la enzima en el monolito, debido a que los enlaces de interacción son fuertes.
- c) Se requieren más estudios para tener un conocimiento más amplio del desempeño del catalizador híbrido y tener un análisis contundente de su eficiencia general en comparación a la comercial. Estos estudios pueden incluir sus mecanismos y cinéticas de desactivación, su caracterización morfológica y estructural, su estabilidad térmica, su comportamiento bajo diferentes solventes en el proceso de transesterificación, su eficiencia catalítica bajo una configuración de reactor continua, entre otros.

9. REFERENCIAS

- Abdullah B., Muhammad S.A.F., Shokravi Z., Ismail S., Kassim K.A., Mahmood A.N. and Aziz Md M.A. 2019. Fourth generation biofuel: a review on risks and mitigation strategies. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 107:37–50.
- Akashi K. and Nanasato Y. 2018. Recent Progress in the Genetic Engineering of Biofuel Crops. *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming* 327–339.
- Alimi O.A., Akinnawo C.A. and Meijboom R. 2020. Monolith catalyst design by 3D printing: A reusable support for modern palladium catalyzed cross-coupling reactions. *New Journal of Chemistry* 44:18867-18878.
- Amini Z., Ong H.C., Harrison M.D., Kusumo F., Mazaheri H. and Ilham, Z. 2017. Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. *Energy Convers. Manag.* 132:82–90.
- Aro E.M. 2016. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio* 45:24–31.
- Arslan F.N., Sapçı A.N., Duru F. and Kara, H. 2016. A study on monitoring of frying performance and oxidative stability of cottonseed and palm oil blends in comparison with original oils. *International Journal of Food Properties* 20:704-717.
- Banerjee A. and Chakraborty R. 2009. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production - a review. *Resour. Conserv. Recycl.* 53 (9):490–497.
- Biofuels and the Environment: The First Triennial Report to Congress (2011 Final Report); EPA United States Environmental Protection Agency. Washington (DC): 2011. EPA/600/R-10/183F.
- Brígida A.I.S., Pinheiro Á.D.T., Ferreira A.L.O. and Gonçalves L.R.B. 2007. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Biotechnology for Fuels and Chemicals* 293–307.
- Chanioti S. and Tzia C. 2017. Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 79:178-189.
- Choi N., No D.S., Kim H., Kim B.H., Kwak J., Lee J.S. and Kim, I.H. 2018. *In situ* lipase-catalyzed transesterification in rice bran for synthesis of fatty acid methyl ester. *Industrial Crops and Products* 120:140–146.
- Dávila-Hernández G., Sánchez-Pardo M.E., Gutiérrez-López G.F., Necochea-Mondragon de Mello B.T.F., dos Santos Garcia V.A. and da Silva C. 2017. Ultrasound-assisted extraction of oil from chia (*Salvia hispânica* L.) seeds: Optimization extraction and fatty acid profile. *Journal of Food Process Engineering* 40:1-8.
- Dismukes C.G., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G.M. and Posewitz M.C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 19:235–40.

- Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J. (2004). Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J Mol Catal B Enzym*, 30, 125–9. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.04.004>.
- Duarte-Silva, R., Villa-García, M .A., Rendueles, M., Díaz, M. (2014). Structural, textural and protein adsorption properties of kaolinite and surface modified kaolinite adsorbents. *Appl. Clay Sci.* 90:73–80.
- Eberhardt A. 2004. Immobilization of catalase from *Aspergillus niger* on inorganic and biopolymeric supports for H₂O₂ decomposition. *Applied Catalysis B: Environmental* 47(3):153–163.
- Encinar J.M., González J.F., Sánchez N. and Nogales-Delgado S. 2018. Sunflower oil transesterification with methanol using immobilized lipase enzymes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42:157-166.
- Fjerbaek L., Christensen K.V. and Norddahl, B. 2009. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* 102:1298–1315.
- Furtado S. and Cantera A.M.B. 2002. Biocatalyst-adsorbant systems: A viable alternative to proteolytic processes in solution. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 32(3):217-237.
- Gitlesen, T., Bauer, M., Adlercreutz, P. (1997). *ABiochimica Et Biophysica Acta*, 1345, 188-196.
- Godbole V., Pal M.K. and Gautam P. 2021. A critical perspective on the scope of interdisciplinary approaches used in fourth-generation biofuel production. *Algal Research* 58:102436.
- Goula, A. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil - Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering* 117(4):492-498.
- Dávila-Hernández G., Sánchez-Pardo M.E., López-Gutiérrez G.F., Necochea-Mondragón H. and Ortiz-Moreno, A. 2019. Effect of microwave pretreatment on bioactive compounds extraction from xocnostle (*Opuntia joconostle*) by-products. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 18:191-204.
- Hajjari M., Tabatabaei M., Aghbashlo M. and Ghanavati H. 2017. A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2,:445–464.
- Hernández-Centeno F., Hernández-González M., López-De la Peña H.Y., López-Trujillo R., Zamudio-Flores P.B., Ochoa-Reyes E., Tirado-Gallegos J.M. and Martínez-Vázquez D.G. 2020. Changes in oxidative stability, composition and physical characteristics of oil from a non-conventional source before and after processing. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19:1389-1400.
- Imran M. and Nadeem M. 2015. Triacylglycerol composition, physico-chemical characteristics and oxidative stability of interesterified canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Lipids in Health and Disease* 14:138.
- Ismail A.R., El-Henawy S.B., Betiha M.A., Abu Amr S.S., Sh. El-Gendy, N., Azab, M.S. and Sedky, N.M. 2017. Optimization of batch Novozym435-catalyzed transesterification of waste cooking oil with methanol for biodiesel production in a solvent-free medium. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(9):911–925.

- Vikramathithan J., Hwangbo K., Lim J.M., Lim K.M., Kang D.Y. Y. and Jeong il P.Y.W.J. 2020. Overexpression of *Chlamydomonas reinhardtii* LCIA (CrLCIA) gene increases growth of *Nannochloropsis salina* CCMP1776. *Algal Res.* 46:101807
- Xue J., S., Balamurugan S.D.W. Li Y.H., Zeng, L.H., Wang L., Yang W.D. and Li H.Y. 2017. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply, *Metab. Eng.* 41:212-221,
- Jacobson K., Gopinath R., Meher L.C. and Dalai, A.K. 2008. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. *Appl. Catal. B Environ.* 85 (1–2):86–91.
- Jha B., Mishra A., Jha A. and Joshi M. 2013. Developing transgenic *Jatropha* using the SbNHX1 gene from an extreme halophyte for cultivation in saline wasteland. *PLoS One* 8(8):e71136.
- Tan K.W.M. and Lee Y.K. 2017. Expression of the heterologous *Dunaliella tertiolecta* fatty acyl-ACP thioesterase leads to increased lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* 247:60-67.
- Kim M.J., Yang S.W., Mao H.-Z., Veena S.P., Yin J.L. and Chua N.H. 2014. Gene silencing of sugardependent 1 (JcSDP1), encoding a patatin-domain triacylglycerol lipase, enhances seed oil accumulation in *Jatropha curcas*. *Biotechnol Biofuels* 7(1):36.
- Kirk, O. and Christensen, M.W. 2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development*, 6(4):446–451.
- Köse O., Tüter M. and Aksoy H.A. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology* 83(2):125–129.
- Kozłowska M., Gruczyńska E., Scibisz I. and Rudzińska, M. 2016. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chemistry* 213:450-456.
- Kumar, D., Das, T., Giri, B.S., Rene E.R. and Verma, B. 2019. Biodiesel production from hybrid non-edible oil using bio-support beads immobilized with lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Fuel*, 255:115801.
- Leong W.-H., Lim J.-W., Lam M.-K., Uemura Y. and Ho Y.-C. 2018. Third generation biofuels: a nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renew Sustain Energy Rev*, 91:950–61.
- Li C., Luo L., Fu Q., Niu L. and Xu Z.-F. 2014. Isolation and functional characterization of JcFT, a FLOWERING LOCUS T (FT) homologous gene from the biofuel plant *Jatropha curcas*. *BMC Plant Biol* 14(1):125.
- Li H.Z., Zhang Z.J., Hou T.Y., Li X.J. and Chen, T. 2015. Optimization of ultrasound-assisted hexane extraction of perilla oil using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 76:18-24.
- Li Z., Wang H., Zhao W., Xu X., Jin Q., Qi J., Yu R. and Wang D. 2019. Enhanced catalytic activity of Au-CeO₂/Al₂O₃ monolith for low-temperature CO oxidation. *Catalysis Communications*, 129:105729.
- Lü J., Sheahan C. and Fu P. 2011. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy & Environmental Science*, 4(7):2451.

- Kwak M., Park W.-K., Shin S.-E., Koh H.-G., Lee B., Jeong B. and Chang Y.K. 2017. Improvement of biomass and lipid yield under stress conditions by using diploid strains of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Algal Res.* 26:180-189.
- Mat Aron N.S., Khoo K.S., Chew K.W., Show P.L., Chen W. and Nguyen, T.H.P. 2020. Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *Int J Energy Res.* 1-17.
- Miao R., Wegelius A., Durall C., Liang F., Khanna N. and Lindblad, P. 2017. Engineering Cyanobacteria for Biofuel Production. *Modern Topics in the phototrophic Prokaryotes*, 351-393.
- Moravvej Z., Makarem M.A. and Rahimpour M.R. 2019. The fourth generation of biofuel. *Second and Third Generation of Feedstocks* 557–597.
- Moreira K.S., Moura Júnior L.S., Monteiro R.R.C., de Oliveira A.L.B., Valle C.P., Freire T.M., Fachine P.B.A., de Souza M.C.M., Fernandez-Lorente G., *et al.* 2020. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya* sp.) via RSM. *Catalysts*, 10(4):414.
- Nayak N., Huertas R., Crespo J.G. and Portugal, C.A.M. 2019. Surface modification of alumina monolithic columns with 3-aminopropyltetraethoxysilane (APTES) for protein attachment. *Separation and Purification Technology* 229:115674.
- Nguyen H.C., Liang S.-H., Chen S.-S., Su C.-H., Lin J.-H. and Chien, C.-C. 2018. Enzymatic production of biodiesel from insect fat using methyl acetate as an acyl acceptor: Optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management* 158:168–175.
- Ochuma I.J., Osibo O.O., Fishwick R.P., Pollington S., Wagland A., Wood J. and Winterbottom J.K. 2007. Three-phase photocatalysis using suspended titania and titania supported on a reticulated foam monolith for water purification. *Catal Today* 128(1-2):100-107.
- Okonkwo S.I. and Okafor, E.C. 2016. Determination of the proximate composition, physicochemical analysis and characterization of fatty acid on the seed and oil of *Gossypium hirsutum*. *International Journal of Chemistry* 8:57-61.
- Orozco-Hernández J.M., Romero M., Natividad R. and Baeza-Jiménez, R. 2016. Improvement strategies for the enzymatic production of biodiesel in the presence of primary alcohols. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3):935-942.
- Pehlivanoglu H., Ozulku G., Yildirim R.M., Demirci M., Toker O.S. and Sagdic, O. 2018. Investigating the usage of unsaturated fatty acid rich and low-calorie oleogels as a shortening mimetic in cake. *Journal of Food Processing and Preservation* 42:e13621.
- Pierobon S.C., Cheng X., Graham P.J., Nguyen B., Karakolis E.G., Sinton D. (2018). Emerging microalgae technology: a review. *Sustainable Energy Fuels*. 2(1):13-38.
- Qu J., Mao H.Z., Chen W., Gao S.Q., Bai Y.N., Sun Y.W., Geng Y.F. and Ye J. 2012. Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid. *Biotechnol Biofuels* 5(1):10.
- Rachmadona N., Amoah J., Quayson E., Hama S., Yoshida A., Kondo A. and Ogino, C. 2020. Lipase-catalyzed ethanolysis for biodiesel production of untreated palm oil mill effluent in water-containing system. *Sustainable Energy & Fuels* 4:1105-1111.

- Raheem I., Mohiddin M.N.B., Tan Y.H., Kansedo J., Mubarak N.M., Abdullah M.O., Ibrahim M.L. 2020. A review on influence of reactor technologies and kinetic studies for biodiesel application. *J. Ind. Eng. Chem.* 91:54–68.
- Rojo-Gutiérrez E., Buenrostro-Figueroa J.J., López-Martínez L.X., Sepúlveda D.R., Baeza-Jiménez R. (2020a) Biotechnological Potential of Cottonseed, a By-Product of Cotton Production. In: Zakaria Z., Aguilar C., Kusumaningtyas R., Binod P. (eds) *Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume II: Non-Biological Approaches. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future.* Springer, Cham.
- Rojo-Gutiérrez E., Buenrostro-Figueroa J., Natividad-Rangel R., Romero-Romero R., Sepulveda D. and Baeza-Jimenez R. 2020b. Effect of different extraction methods on cottonseed oil yield. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19(Sup. 1):385-394.
- Sahar, Sadaf, S., Iqbal, J., Ullah, I., Bhatti, H. N., Nouren, S., -ur-Rehman H., Nisar J. and Iqbal M. 2018. Biodiesel production from waste cooking oil: An efficient technique to convert waste into biodiesel. *Sustainable Cities and Society*, 41:220-226.
- Jouzani G.S., Sharafi R. and Soheilvand S. 2018. Fueling the future; Plant genetic engineering for sustainable biodiesel production. *Biofuel Research Journal* 19:829-845.
- Samaram S., Mirhosseini H., Tan C.P., Ghazali H.M., Bordbar, S. and Serjouie, A. 2015. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry* 172:7-17.
- Sharma A., Kodgire P. and Kachhwaha, S.S. 2019. Biodiesel production from waste cotton-seed cooking oil using microwave-assisted transesterification: Optimization and kinetic modeling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 116:109394
- Sujoy B. and Aparna, A. 2013. Enzymology, Immobilization and Applications of Urease Enzyme. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2 (6):2278–3202.
- Sundén, B. 2019. Introduction and background. *Hydrogen, Batteries and Fuel Cells*, 1–13.
- Tabatabaei M., Aghbashlo M., Dehghani M., Panahi H.K.S., Mollahosseini A., Hosseini M., Soufiyan M.M. 2019. Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 74:239-303.
- Tandon P. and Jin Q. 2017. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renew Sustain Energy Rev*, 80:1089–99.
- Tang M., Bai X., Long-Jian N., Chai X., Mao-Sheng C. and Zeng-Fu X. 2018. miR172 regulates both vegetative and reproductive development in the perennial woody plant *Jatropha curcas*. *Plant Cell Physiol* 59(12):2549–2563.
- Thompson C.N., Hendon B.R., Mishra D., Rie J.M., Lowery C.C., Lambert K.C., Witt T.W., Oswald S.J., *et al.* 2019. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutants with reduced level of palmitic acid (C16:0) in seed lipids. *Euphytica* 215:112.
- Tian X., Zhou B., Li X. 2009. Synthesis of biodiesel from cottonseed oil and dimethyl carbonate catalyzed by immobilized lipase. *Petrochem Technol*, 38:677–81.
- Tian X., Ruan J., Huang J., Fang X., Mao Y., Wang L., Chen X. and Yang C. 2016. Gossypol: phytoalexin of cotton. *Science China Life Sciences* 59:122-129.

- Tupufia S.C., Jeon Y.J., Marquis C., Adesina A.A. and Rogers P.L. 2013. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Process. Technol* 106:721–726.
- Von der Haar D., Stähler A., Wichmann R. and Schweiggert-Weisz U. 2014. Enzymatic esterification of free fatty acids in vegetable oils utilizing different immobilized lipases. *Biotechnology Letters*, 37(1):169–174.
- Lin W.-R., Lai Y.-C., Sung P.-K., Tan S.-I., Chang C.-H., Chen C.-Y., Chang J.-S. and Ng. I.-S. 2018. Enhancing carbon capture and lipid accumulation by genetic carbonic anhydrase in microalgae. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 93:131-141.
- Wan S., Truong-Trieu V.M., Ward T., Whalen J.K. and Altosaar I. 2017. Advances in the use of genetically modified plant biomass for biodiesel generation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(4):749–764.
- Wang, X., Qin, X., Li, D., Yang, B., & Wang, Y. (2017). One-step synthesis of high-yield biodiesel from waste cooking oils by a novel and highly methanol-tolerant immobilized lipase. *Bioresource Technology*, 235, 18–24.
- Wong S.T., Tan M.C. and Geow C.H. 2019. Optimization of ultrasound-assisted ethanol extraction of hazelnut oil. *Journal of Food Processing and Preservation* 43:e14138.
- Yang X.Y., Cheng X.W., Song H.Y., Ma J.H., Pan P.P., Elzatahry A.A., Su J.C. and Deng Y.H. 2018. 3D interconnected mesoporous alumina with loaded hemoglobin as a highly active electrochemical biosensor for H₂O₂, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (11):1800149–1800156.
- Xie J., Zhang Y. and Simpson, B. 2022. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Current Opinion in Food Science* 43:27-35.
- Xie Z.-T., Asoh T.-A., Uetake Y., Sakurai H. and Uyama, H. (2020). Dual roles of cellulose monolith in the continuous-flow generation and support of gold nanoparticles for green catalysis. *Carbohydrate Polymers* 247:116723.
- Xu X., Fomuso L.B. and Akoh C.C. 2000. Synthesis of Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Acidolysis in a Packed Bed Bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(1):3–10.
- Xu X.B., Fomuso L.B., Akoh C.C. 2000. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J. Agric. Food Chem.* 48:3–10.
- Xue J., Balamurugan S., Li D.-W., Liu Y.-H., Zeng H., Wang L. and Yang W.-D. 2017. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply. *Metabolic Engineering*, 41:212–221.
- Ye J., Geng Y., Zhang B., Mao H., Qu J. and Chua N.-H. 2014. The *Jatropha* FT ortholog is a systemic signal regulating growth and flowering time. *Biotechnol Biofuels* 7(1):91.
- Ye J, Wang C, Sun Y, Qu J, Mao H, Chua N-H. 2018. Overexpression of a transcription factor increases lipid content in a woody perennial *Jatropha curcas*. *Front Plant Sci* 9:1479.
- Zdarta J., Meyer A., Jesionowski T. and Pinelo M. 2018. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* 8(2):92.
- Zhang Q.A., Zhang Z.Q., Yue X.F., Fan X.H. Li T. and Chen, S.F. 2009. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food*

Chemistry 116:513-518.

Zhong L., Feng Y., Wang G., Wang Z., Bilal M., Lv H., Jia S. and Cui, J. 2020. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. *International Journal of Biological Macromolecules* 152:207-222.

Zhou L., Luo X., Li J., Ma L., He Y., Jiang Y., Yin L. and Gao, L. 2019. Meso-molding three-dimensionally ordered macroporous alumina: A new platform to immobilize enzymes with high performance. *Biochemical Engineering Journal* 146:60–68.

Al-Zuhair S., Ling F.W. and Jun L.S. 2007. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry* 42(6):951–960.

10. ANEXOS

10.1. Curva Estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Las concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) que se muestran en el Cuadro 9 se determinaron por el ensayo estándar por microplaca Bradford (Bio-Rad Dye Reagent), de acuerdo con las indicaciones del manual, así mismo se listan las diferentes lecturas de absorbancia medidas a 595 nm.

Cuadro 9. Resultados de curvas patrón de BSA.

[BSA] ($\mu\text{g/mL}$)	Patrón 1			Patrón 2		
	Abs. R1	Abs. R2	Promedio	Abs. R1	Abs. R2	Promedio
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
125	0.030	0.036	0.033	0.031	0.049	0.040
250	0.111	0.092	0.102	0.103	0.122	0.113
500	0.254	0.053	0.154	0.210	0.311	0.261
750	0.363	0.373	0.368	0.375	0.414	0.395
1000	0.455	0.465	0.460	0.464	0.500	0.482
1500	0.586	0.609	0.598	0.556	0.679	0.618
2000	0.822	0.809	0.816	0.824	0.822	0.823

Con los datos obtenidos del Cuadro 9, se pudo construir la curva de calibración mostrada en la Figura 22 y de esa manera determinar los cambios en el contenido de proteína durante el proceso de inmovilización.

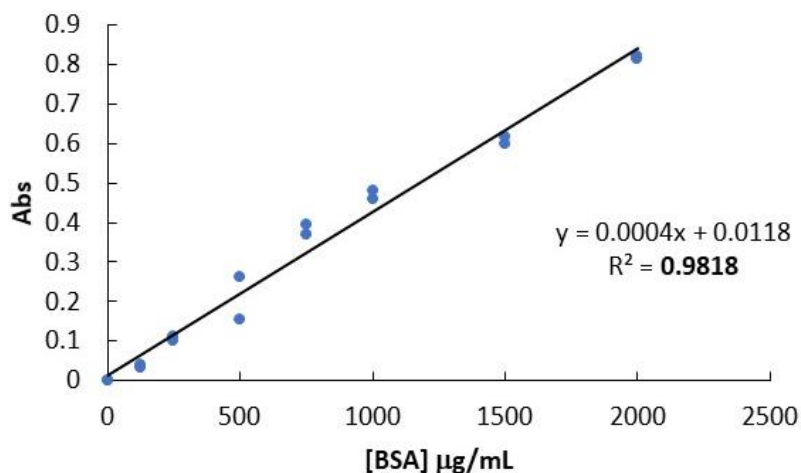


Figura 22. Curva de calibración de BSA.

10.2. Curva Estándar de *p*-nitrofenol (*p*-NF) Utilizada en el Método de *p*-nitrofenol Palmitato (*p*-NFP)

Esta determinación es necesaria para la determinación de la actividad lipasa de nuestro catalizador híbrido. Para ello, se preparó una solución 11mM de *p*-NF en isopropanol y por duplicado se llevaron a cabo las diluciones indicadas en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Diluciones para la curva estándar de *p*-NF

Tubo	Solución 11 mM <i>p</i> -NF (mL)	<i>i</i> -propanol (mL)	[<i>p</i> -NF] (μmol/mL)
1	0.000	0.270	0.000
2	0.011	0.259	0.004
3	0.022	0.248	0.008
4	0.33	0.237	0.012
5	0.44	0.226	0.016
6	0.054	0.216	0.020
7	0.162	0.108	0.060
8	0.270	0.000	0.100

Una vez obtenidas las diluciones se obtuvieron los patrones requeridos (ver Cuadro 11) para la elaboración de la curva de estándar (ver Figura 23) correspondiente.

Cuadro 11. Resultados curva patrón p-NF.

[p-NF] ($\mu\text{mol/m}$ L)	Patrón 1			Patrón 2		
	Abs. R1	Abs. R2	Promedio	Abs. R1	Abs. R2	Promedio
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.004	0.083	0.103	0.093	0.185	0.181	0.183
0.008	0.295	0.304	0.300	0.288	0.298	0.293
0.012	0.409	0.419	0.414	0.358	0.357	0.358
0.016	0.511	0.528	0.520	0.577	0.573	0.575
0.020	0.756	0.614	0.685	0.703	0.701	0.702
0.060	1.856	1.826	1.841	1.994	2.005	2.000
0.100	3.034	2.972	3.003	3.082	3.058	3.070

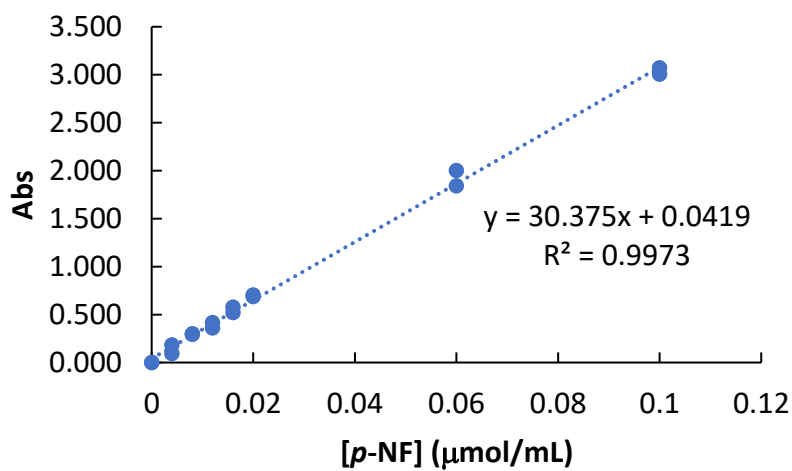


Figura 23. Curva de calibración de p-NF.