



Transesterificación Enzimática de Aceite Usado en Cocción

Mateos, Paula S.^{1*}; Hamet, Maria F.²; Bideberripe, Hernán P.¹; Casella, Mónica L.¹; Briand, Laura E.¹; Matkovic, Silvana R.¹

*1 CINDECA-CCT La Plata, CONICET, UNLP, CICpBA, Calle 47 No 257, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina, *stefaniamateos@quimica.unlp.edu.ar.*

2 CIDCA-CCT La Plata, CONICET, UNLP, CICpBA, Calle 47 esq 116, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina

Palabras Claves: Aceite de cocina usado, transesterificación, Eversa® Transform, biodiesel

Resumen

Los catalizadores enzimáticos resultan promisorios para la generación de biodiesel a partir de aceite usado debido a que su actividad no es influenciada por la presencia de humedad y ácidos grasos libres. En este trabajo se han estudiado las condiciones óptimas para la transesterificación de aceite de girasol usando Eversa® Transform, un biocatalizador comercial que ha mostrado alta efectividad en la transesterificación diferentes aceites.

Las reacciones se realizaron en un sistema batch agitado a 650 rpm usando distintas relaciones molares aceite: alcohol y cantidades de catalizador a 35°C durante 24 horas. Una vez obtenidas las mejores condiciones de reacción, las cuales corresponden a una relación molar de 1:6.8 y 1% v/p de catalizador, se estudió la transesterificación de aceite usado con alcoholes lineales de 1 a 4 C, con y sin agregado de agua. Adicionalmente, se llevaron a cabo las reacciones de reuso de la enzima con los cuatro alcoholes. Los análisis se realizaron mediante la determinación del índice de acidez y cromatografía gaseosa.

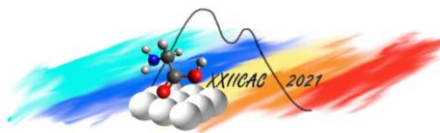
Fue posible obtener ésteres metílicos, etílicos y propílicos de ácidos grasos con conversiones y rendimientos superiores al 90,0%. Asimismo, se demostró que la enzima mantiene un 60,0% de su actividad en el primer reuso.

Abstract

Enzyme catalysts are promising for the generation of biodiesel from used oil due the activity is not influenced by the presence of moisture and free fatty acids. In this work, have been studied the optimal conditions to transesterification of sunflower oil using Eversa® Transform, a commercial biocatalyst that has showed high effectiveness in the transesterification of different oils.

Reactions were carried out in a batch at 650 rpm using different oil: alcohol molar ratios and amounts of catalyst at 35°C for 24 hours. When the better reaction conditions were obtained, which were a molar ratio of 1:6.8 and 1% v/w of biocatalyst, the transesterification of used oil was studied with linear alcohols of 1 to 4 C, with and without water added. The analyzes were carried out by determining of acidity index and gas chromatography.

It was possible to obtain methyl, ethyl and propyl esters of fatty acids with conversions and yields greater than 90.0%. In addition, this enzyme has shown to maintain 60.0% activity on second use.



Introducción

Actualmente, las investigaciones sobre la producción de biodiesel de segunda generación han ganado interés debido a que, principalmente en nuestro país, el aceite de cocina se utiliza en cocción y se descarta luego de unos pocos usos. Por lo tanto, el aceite de desecho es una materia prima económica para producir el biocombustible.

La práctica convencional para generar biodiesel es mediante la transesterificación de aceite vegetal con metanol en presencia de catalizadores alcalinos como hidróxidos de potasio y de sodio. Este método presenta desventajas económicas y medioambientales puesto que requiere del uso de aceites refinados los cuales deben ser sometidos a un pre-tratamiento para eliminar los ácidos grasos libres y la humedad que desactivan al catalizador. Así mismo, el biodiesel crudo es lavado con agua para remover los restos de hidróxido generando grandes volúmenes de desechos alcalinos.

Por otro lado, los catalizadores enzimáticos resultan promisorios para el uso en reacciones de transesterificación de aceites usados en cocción en vista de que la actividad enzimática no es influenciada por la presencia de humedad y ácidos grasos libres [1]. En este contexto, el biocatalizador comercial Eversa® Transform ha mostrado una alta efectividad en la transesterificación de aceite de soja, macaúba, girasol, entre otros. En el trabajo presentado por Nielsen en 2016 se realiza la transesterificación de aceite refinado de soja con metanol y agua agregada, donde la enzima cataliza la reacción obteniéndose un 97% de rendimiento [2]. El mismo año, Remonatto y colaboradores estudiaron la actividad de la Eversa® Transform en la hidrólisis y esterificación de aceite de soja con diferentes porcentajes de ácidos grasos libres, aceite de macaúba y aceite de cocina usado, estas reacciones se llevaron a cabo con metanol, agua y NaOH alcanzando conversiones entre 80,9 y 97,2 % [3]. Posteriormente, inmovilizaron Eversa® Transform y Eversa® Transform 2.0 en soportes hidrofóbicos para estudiar su actividad en la transesterificación de aceite de girasol con metanol y etanol obteniendo altas conversiones a biodiesel [4].

En esta contribución se presenta el estudio de optimización de la reacción de transesterificación de aceite de girasol usando Eversa® Transform. Partiendo de estas condiciones, se investigó la reacción utilizando distintos alcoholes de cadena corta, el efecto causado por el agregado de agua, y adicionalmente el reuso del biocatalizador.

Experimental

Materiales

El aceite de cocina de desecho usado en los ensayos de transesterificación proviene de aceite de girasol fresco (marca comercial Cañuelas, producido en Buenos Aires, Argentina) sometido a la fritura de comidas caseras en cinco ciclos de cocción a 170 °C durante 20 min. Este aceite contiene un índice de acidez de alrededor de 1.

Se utilizó el biocatalizador comercial denominado Eversa® Transform compuesto por una solución de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes, lote LJP00051). Los reactivos utilizados en el estudio fueron; hidróxido de potasio (Carlo Erba, 85%), metanol (Cicarelli 99,5 %), etanol (Cicarelli 99,5 %), n-propanol (Sigma Aldrich, 99,5 %), n-butanol (Sigma Aldrich, 99 %) y tolueno (Dorwil, 99,5 %).

Reacciones de transesterificación de aceite con alcoholes

Las reacciones de transesterificación se realizaron en condiciones batch en un balón provisto con un refrigerante, donde se colocaron 100 g del aceite. El sistema se calentó a 35 °C con un baño de agua y se mantuvo bajo agitación magnética a 650 rpm durante 24 h. El estudio de la influencia del tipo de alcohol utilizado en la reacción se realizó mediante el agregado de distintos alcoholes: metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol. Los agregados se realizaron en 4 alícuotas a distintos tiempos a saber, 0, 1, 3 y 5 horas de reacción. Por otro lado, se ensayaron varias relaciones molares de aceite: alcohol

1:4,5; 1:6,8 y 1:8,9, y distintas cantidades de biocatalizador 1% v/p y 2% v/p. Al respecto de la influencia del agua se estudió la reacción sin agregado de agua y con un 2% v/p.

Ensayos de reuso de la enzima

Previo a los ensayos de reuso, se realizó una centrifugación a fin de separar las fases de las reacciones de transesterificación de aceite usado con agua agregada y se utilizó la fase inferior acuosa la cual contiene a la enzima. En un balón se agregaron 100 g de aceite usado y al llegar a la temperatura deseada se adicionó la fase acuosa mencionada anteriormente. Luego se agregó el alcohol en alícuotas a los tiempos de reacción 0, 1, 3 y 5 horas y se dejó reaccionando 24 horas en total. Las reacciones se realizaron con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol a 35 °C, 650 rpm y una relación molar aceite: alcohol 1:6,8.

Determinación del índice de acidez y análisis por cromatografía gaseosa

Con el objetivo de estudiar la presencia de ácidos grasos libres, se determinó el índice de acidez del aceite fresco y usado y de estos luego de las reacciones de transesterificación, usando la Norma Europea EN 14104. Para ello, se tomó 1 g de muestra y se disolvió en 10 mL de una mezcla neutralizada de tolueno-etanol 1:1, se tituló con una solución etanólica de KOH 0,1 N con fenolftaleína como indicador.

La identificación y cuantificación de los glicéridos se realizó por cromatografía gaseosa de acuerdo a la Norma ASTM D6584. El equipo utilizado fue un GC-2010 Plus Tracera, equipado con un detector BID y una columna capilar (MEGA-Biodiesel 105 de 15 m × 0,32 mm × 0,10 μm). Los detalles del análisis fueron reportados con anterioridad [5].

Resultados y discusión

Con el propósito de encontrar las mejores condiciones operativas para la transesterificación de aceite de girasol se investigó la influencia de la cantidad de alcohol, de biocatalizador y el agregado de agua al medio de reacción. La **Figura 1** muestra los porcentajes de moles de mono-, di- y triglicéridos en el aceite de girasol fresco y luego de la transesterificación con metanol, la conversión y el rendimiento a ésteres metílicos cuando se ensayaron relaciones molares aceite: metanol (1:4,5; 1:6,8; 1:8,9) con cantidades crecientes de metanol. Asimismo, se comparan los resultados obtenidos con el agregado del doble de volumen de biocatalizador (1% vs 2%).

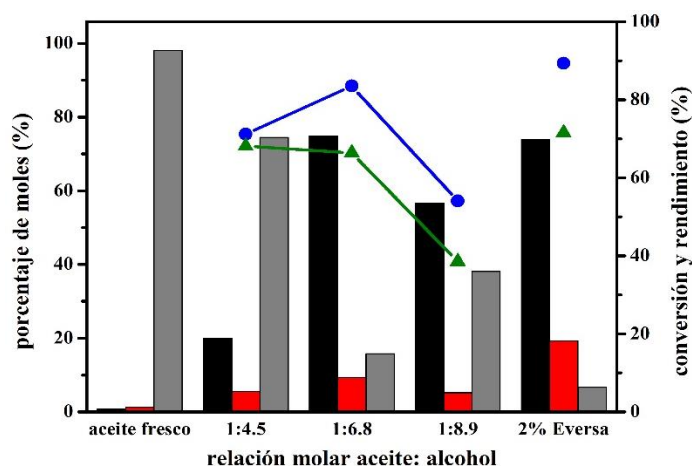


Figura 1: Porcentaje de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (columnas negra, roja y gris, respectivamente); conversión (●) y rendimiento a FAME (▲) en la transesterificación de aceite de girasol a 35 °C, 1% v/p Eversa® Transform, con distintas relaciones molares aceite: metanol. Comparación con 2% v/p Eversa® Transform y aceite: metanol 1: 6.8.

Los resultados demostraron que la relación molar aceite: metanol igual a 1:6,8 y el agregado de 1% p/v de Eversa® Transform conducen al 88,4 % de conversión del aceite de girasol con un 70.3% de rendimiento a metil ésteres FAME en 24 h de reacción a 35 °C.

La transesterificación enzimática de los triglicéridos genera un notable incremento de la cantidad de monoglicéridos, así como de diglicéridos aunque en menor proporción.

La presencia de monoglicéridos es una evidencia de la regioespecificidad de la lipasa que hidroliza los ácidos grasos enlazados a las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos [6]. Este comportamiento es esperado ya que Eversa® está compuesto por *Thermomyces lanuginosus* que es una lipasa sn-1,3 típica. Sin embargo, también se produce la migración de acilo que convierte espontáneamente los 2-monoglicéridos y 1,2-diglicéridos en glicéridos sn-1 y sn-1,3 [7]. La observación de que la conversión alcanza el 88,4 % demuestra claramente que la migración de acilo está desplazando el límite teórico superior de conversión del 66,7 % hacia valores más altos. Aunque un aumento de la cantidad de metanol incrementa la conversión del aceite, un exceso de alcohol disminuye en gran medida el rendimiento de la lipasa (ver figura 1 para la relación molar 1: 8,9). De hecho, las investigaciones de Wang y col. indicaron que existe una cantidad óptima de metanol en la producción de biodiesel catalizado con *Thermomyces lanuginosus* [8]. Los autores obtuvieron el mejor rendimiento en la transesterificación del aceite de maíz con 3,8 equivalentes molares de metanol. De manera similar, Andrade y col. informaron que la proporción de aceite a metanol de 1:6 es la óptima para la transesterificación del aceite de ricino con Eversa® Transform [9].

Los resultados muestran que el aumento de la cantidad de Eversa® Transform (1% versus 2%) incrementó la conversión a 94,6%. Sin embargo, la variación del rendimiento hacia FAME es insignificante. La observación de que ni un exceso de alcohol ni de biocatalizador favorecen el desempeño catalítico está relacionada con la inactivación de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* inducida por metanol y la aglomeración de la proteína a altas cargas de enzima. En este sentido, las simulaciones de dinámica molecular evidenciaron que el metanol causa la interrupción de las interacciones del tipo puente de hidrógeno en el sitio activo además de limitar la exposición de los residuos polares de las proteínas [10]. Ambas situaciones influyen en la interacción entre el sustrato y el sitio activo por lo cual inhiben la actividad enzimática.

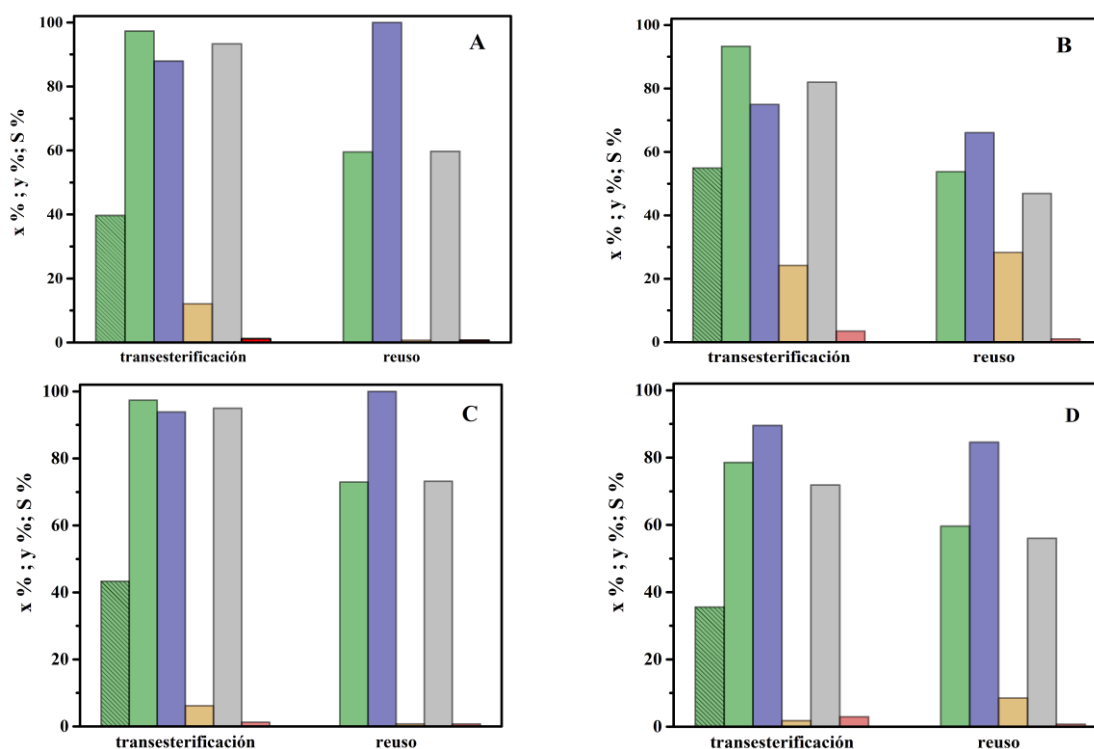


Figura 2: Conversión (X %) sin agua (verde con textura) y con agua agregada (verde), selectividad (S %) a glicerol (azul) y monoglicéridos (naranja); rendimiento (y %) a ésteres (gris) y ácidos grasos (rojo) en la transesterificación de aceite de girasol usado con relación molar aceite: alcohol 1: 6.8, 1% v/p Eversa® Transform, 2% v/p de agua, durante 24 h a 35 °C; y un ciclo de reutilización del biocatalizador. (A) metanol, (B) etanol, (C) n-propanol y (D) n-butanol.

La **Figura 2** presenta los resultados de la transesterificación de aceite de girasol usado con metanol, etanol, n-propanol y n-butanol con la relación molar aceite: alcohol óptima (1: 6.8) a 35 °C por 24 h. Según se observa en las figuras, la presencia de agua es un factor clave en la transesterificación enzimática de glicéridos ya que independientemente de la naturaleza del alcohol, provoca un incremento notable en la conversión.

Las lipasas en medio acuoso catalizan la hidrólisis de los enlaces del tipo éster en las posiciones sn-1,3 de los triglicéridos generando ácidos grasos (ver la columna correspondiente al rendimiento a ácidos grasos en la figura 2) que luego son esterificados con los alcoholes como se observa en la figura 2 [11]. En esta primera etapa del mecanismo se generan mono y diglicéridos. La presencia de agua en el medio de reacción influye en la migración de los grupos acilo de 1,2-diglicéridos y 2-monoglicéridos hacia las posiciones sn-1 y sn-1,3 según se comentó anteriormente. El reposicionamiento de estos grupos posibilita la catálisis enzimática lo que redundará en el incremento de la conversión del aceite, la disminución de los monoglicéridos y la generación de glicerol.

En este contexto, la conversión con metanol, etanol y n-propanol alcanzó valores de hasta 97,0 % y rendimientos a ésteres de 93,0 %, 82,0 % y 95,0 %, respectivamente. En el caso del n-butanol se observaron menores conversiones (78,0 %) y rendimientos (72,0 %) lo que podría atribuirse a cierto efecto inhibitorio del alcohol sobre la actividad de la enzima *Thermomyces lanuginosus*.

En sistemas multifásicos como el que se utiliza aquí, se espera que el sitio activo de la enzima se dirija hacia la fase orgánica [12]. Con esta suposición, se puede explicar la ausencia de inhibición del glicerol, ya que este se disuelve preferentemente en la fase acuosa y, por lo tanto, no está presente en la misma fase que los sitios activos de la enzima. Sin embargo, la solubilidad del n-butanol en agua y su coeficiente de partición ($\log P = 0.88$) son significativamente diferentes al resto de los alcoholes, por lo cual, se puede considerar que está distribuido en ambas fases. En esta situación los sitios activos de la enzima están directa y continuamente expuestos al n-butanol provocando un efecto inhibitorio más marcado que en el caso de los otros alcoholes.



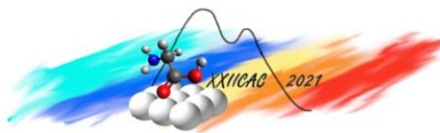
Figura 3: Sistema bifásico observado en la transesterificación de aceite de girasol usado con alcoholes lineales, catalizado con Eversa® Transform.

La **Figura 3** muestra el sistema bifásico acuoso-orgánico que se observa en la transesterificación enzimática del aceite de girasol usado.

Típicamente, la fase superior, contiene los ésteres de ácidos grasos; mono, di y triglicéridos. La enzima se localiza en la fase inferior y a su vez esta última, contiene agua y glicerol.

La recuperación del biocatalizador se realizó a través de la centrifugación del medio de reacción y el aislamiento de la fase acuosa que contiene la enzima.

El reuso del biocatalizador en la transesterificación del aceite con n-propanol presentó una conversión y rendimiento a propil éster de 73,0 % (ver Figura 2C). Mientras que en el resto de los alcoholes el biocatalizador mantuvo el 60,0 % de su actividad catalítica. La desactivación del biocatalizador se atribuye al efecto del nucleófilo o aceptor de acilo (metanol, etanol y n-butanol) sobre la lipasa. Según se describió en las secciones anteriores, los alcoholes se agregan en sucesivas porciones al medio de reacción de forma tal de evitar el contacto prolongado de la lipasa con una elevada concentración de los mismos. De hecho, esta práctica se sustenta en el efecto inhibitorio que ejercen los alcoholes sobre la actividad enzimática tal como se demostró en los experimentos con distintas relaciones molares aceite: metanol.



Conclusiones

Es bien sabido que el aceite comestible usado en cocción es una materia prima económica y abundante, no constituye una competencia con los alimentos y resulta una preocupación ambiental en términos de su disposición final como desecho. La presente investigación demostró que es posible su valorización a través de la transesterificación con alcoholes lineales de cadena corta, sin la necesidad de la aplicación de pretratamientos o el uso de co-solventes. En este contexto, el biocatalizador comercial Eversa® Transform es activo en la transesterificación del aceite usado en cocción para la obtención de biodiesel de tercera generación. Más aún, fue posible obtener metil, etil y propil ésteres de ácidos grasos (FAME, FAEE, FAPE) con conversiones y rendimientos superiores a 90,0 % a 35 °C. Asimismo, se obtuvieron butil ésteres de ácidos grasos FABE aunque con rendimientos más bajos en las condiciones ensayadas. En este sentido, la investigación de la actividad del biocatalizador comercial Eversa® Transform en la transesterificación de aceite usado con etanol, n-propanol y n-butanol son novedosas ya que no se han reportado en la literatura.

Asimismo, el sistema de fases acuoso-orgánico en el que se lleva a cabo la transesterificación, permite separar fácilmente los ésteres de ácidos grasos y recuperar el biocatalizador para su posterior reciclaje. A su vez, se demostró que Eversa® Transform mantiene el 60,0 % de la actividad catalítica en el primer reuso.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto de Ciencia y Técnica 11/X898 acreditado por la U.N.L.P. por su financiamiento y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada.

Referencias

- [1] C. José, G.B. Austic, R.D. Bonetto, R.M. Burton, L.E. Briand; *Catal. Today* 213 (2013) 73-80.
- [2] P.M. Nielsen, A. Rancke-Madsen, H.C. Holm, R. Burton; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93 (2016) 905-910.
- [3] D. Remonatto, C.M.T. Santin, D. de Oliveira, M. Di Luccio, J.V. de Oliveira; *Ind. Biotech.* 12 (2016) 254-262.
- [4] D. Remonatto, J.V. de Oliveira, J.M. Guisan, D. de Oliveira, J. Ninow, G. Fernandez-Lorente; *Appl. Biochem. Biotech.* 185 (2018) 705-716.
- [5] M.B. Navas, I.D. Lick, P.A. Bolla, M.L. Casella, J.F. Ruggera; *Chem. Eng. Sci.* 187 (2018) 444-454.
- [6] R.R.C. Monteiro, S. Arana-Peña, T.N. da Rocha, L.P. Miranda, A. Berenguer-Murcia, P.W. Tardioli, J.C.S. dos Santos, R. Fernández-Lafuente; *Renew. Energ.* 164 (2021) 1566-1587.
- [7] D. Sánchez, G. Tonetto, M.L. Ferreira; *J. Biotechnol.* 220 (2016) 92-99.
- [8] Y. Wang, H. Wu, M.H. Zong; *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 7232-7237
- [9] T.A. Andrade, M. Errico, K.V. Christensen; *Chem. Eng. Trans.* 57 (2017) 913-918.
- [10] X. Tong, P. Kamp Busk, L. Lange, J. Pang; *Mol. Simulat.* 42 (2015) 434-445.
- [11] P.S. Mateos, M.B. Navas, S. Morcelle, C. Ruscitti, S.R. Matkovic, L.E. Briand; *Catal. Today* 372 (2021) 211-219.
- [12] M. Holmquist, M. Martinelle, P. Berglund, I.G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen, K. Hult; *J. Protein Chem.* 12 (1993) 749-757.