

# Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas

## Development of a methodology of transesterification of oil in the production line of biodiesel from microalgae

Ing. Vladimir Plata<sup>1</sup>, Dr. Viatcheslav Kafarov<sup>2</sup>, Dr. Nelson Moreno<sup>3</sup>

1,2. Centro de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía  
Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 calle 9, Bucaramanga, Colombia, E-mail: vladimirplata@gmail.com  
3. Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL. Kilómetro 7 vía Piedecuesta, Piedecuesta, Colombia.

Recibido 20/09/09, Aceptado 12/11/09,

### RESUMEN

Existe actualmente a nivel mundial una fuerte tendencia hacia el desarrollo de un tipo de biocombustibles denominados de tercera generación, los cuales se obtienen mediante métodos de producción similares a los empleados en el desarrollo de biocombustibles de primera y segunda generación, pero aplicados a cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o adaptados para mejorar la conversión de biomasa a biocombustible. Dentro de éstos, se destaca el cultivo de diferentes especies de microalgas, cuyo aceite puede ser utilizado como materia prima en la producción de biodiesel. Este artículo presenta una metodología de transesterificación de una mezcla de aceites vegetales cuya composición de ácidos grasos se aproxima a la del aceite de *Chlorella Vulgaris*, propuesta por los autores en el marco de proyectos apoyados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, conjuntamente con la Corporación Instituto de Morrosquillo, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, la Universidad Industrial de Santander UIS y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.

**Palabras clave:** Transesterificación, biodiesel, microalga, *ChlorellaVulgaris*.

### ABSTRACT

Exists now a strong worldwide trend towards the development of a type of so-called third generation biofuels, which are obtained by similar production methods to those used in the development of first and second generation biofuels, but applied to bioenergy crops specifically designed or adapted to enhance the conversion of biomass to biofuel. Among these, stands out the growing of different species of microalgae, whose oil can be used as feedstock in biodiesel production. This article presents a methodology for the transesterification of a mixture of vegetable oils whose fatty acid composition is close to the *Chlorella Vulgaris* oil, proposed by the authors in the framework of projects supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development, in conjunction with the Institute of Morrosquillo Corporation, the Colombian Institute of Petroleum ICP-ECOPETROL, the Industrial University of Santander and the Iberoamerican Program of Science and Technology for Development CYTED.

**Key words:** Transesterification, biodiesel, microalgae, *ChlorellaVulgaris*.

## 1. Introducción

El calentamiento global es posiblemente una de las mayores preocupaciones de la humanidad actualmente. Son diversas y nefastas las consecuencias que este fenómeno puede llegar a tener sobre el curso normal de la vida en el planeta. Su principal causa es la emisión de gases de efecto invernadero producidos durante la combustión de carburantes fósiles. Como una posible solución, se planteó la utilización de combustibles derivados de biomasa, los cuales ofrecen ventajas evidentes: además de tratarse de una fuente renovable que puede obtenerse en cada país al margen de fluctuaciones de precios y conflictos internacionales, los cultivos empleados en la producción de biocombustibles absorben durante su crecimiento parte del CO<sub>2</sub> emitido a la atmósfera. Sin embargo, los biocombustibles llamados de “primera generación” han generado gran controversia mundial por la afectación del precio de los alimentos asociada a algunos de ellos, así como por el uso de tierras tradicionalmente reservadas para el cultivo de alimentos en la siembra de la biomasa, llegándose inclusive a la deforestación de selvas tropicales.

Lo anterior llevó pronto al desarrollo de un tipo de biocombustibles derivados de materias primas que no tienen usos alimenticios (p.e. el *Panicum Virgatum*, a partir del cual se puede obtener bioetanol, [1]) y semillas oleaginosas no comestibles (p.e. la *Jatropha Curcas*, a partir de la cual se puede producir biodiesel, [2]). Aunque estos biocombustibles llamados de “segunda generación” no presentan las mismas dificultades anteriormente expuestas, existe en este momento un interés generalizado por el desarrollo de cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o “adaptados” (a menudo por medio de técnicas de biología molecular) para mejorar la conversión de biomasa a biocombustible. Dentro de éstos se destaca el cultivo de diferentes especies de microalgas, cuyo aceite puede ser utilizado como materia prima en la obtención de biodiesel.

Las microalgas captan y almacenan carbono para su crecimiento del CO<sub>2</sub> atmosférico [3], tienen elevadas tasas de crecimiento, llegando a doblar su población en 24 horas [4], pueden crecer en agua salada o residual, en suelos inadecuados para el crecimiento de otros tipos de vegetales [3], su producción de aceite por unidad de área cultivada puede ser hasta 300 veces mayor que la de las plantas terrestres oleaginosas [5], el contenido de lípidos puede ajustarse, variando entre otros factores, la composición del medio de cultivo [6]. A pesar de los beneficios que brinda el empleo de microalgas en la obtención de biodiesel, los estudios reportados hasta el momento sobre transesterificación de aceite de microalgas son muy limitados [7, 8].

Adicionalmente, no existen proveedores de aceite de microalgas en el mercado mundial en la actualidad. La im-

posibilidad de adquirir este aceite o producirlo en cantidades necesarios en Colombia motivó la preparación de una metodología de transesterificación de una mezcla de aceites vegetales cuya composición de ácidos grasos se aproxima a la del aceite de la microalga *Chlorella Vulgaris*; tal metodología, sustentada dentro del marco de proyectos apoyados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, será detallada en las líneas a continuación.

## 2. Metodología de transesterificación de aceite sintético de *Chlorella Vulgaris*

### 2.1 Preparación de una mezcla de aceites vegetales de composición conocida, simulando el aceite de *Chlorella Vulgaris*

#### 2.1.1 Composición del aceite de *Chlorella Vulgaris* y superestearina de palma

Petkov & García [9] determinaron la composición del aceite de tres especies de la microalga *Chlorella* cultivadas bajo distintas condiciones de crecimiento. Confirmaron la presencia de ácidos grasos de cadena carbonada 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2, y  $\alpha$ -18:3, y establecieron que cualquier excepción a este perfil lipídico corresponde a impurezas presentes en el cultivo de las microalgas. Ma & Hanna [10] reportan la composición de diversos aceites vegetales. El perfil de ácidos grasos de la superestearina de palma, gentilmente suministrado por el departamento de Investigación y Desarrollo de la compañía Santandereana de Aceites SACEITES S.A. se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de ácidos grasos de la superestearina de palma.

Ácido graso	% másico
C14:0	0.5
C16:0	83
C18:0	5.5
C18:1	8.9
C18:2	1.6

Ácido graso C14:0 contiene una cadena carbonada de 14 carbonos y cero insaturaciones

#### 2.1.2. Preparación del aceite de microalgas sintético

Se procedió a determinar las cantidades de cuatro aceites vegetales, necesarias para la elaboración de una mezcla cuya composición simule la del aceite de *Chlorella Vulgaris* cultivada a la intemperie. Los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de esta microalga se agruparon se-

gún el grado de insaturación de los mismos. Así, 14:0, 16:0 y 18:0 fueron agrupados como ácidos grasos saturados y su porcentaje másico en la mezcla se calculó igual a 13%. De igual forma, se agruparon 16:1 y 18:1 como mono-insaturados, 16:2 y 18:2 como di-insaturados y 16:3 y  $\alpha$ -18:3 como tri-insaturados. Los porcentajes calculados para cada grupo se reportan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Porcentajes másicos de ácidos grasos saturados, mono-insaturados, di-insaturados y tri-insaturados presentes en el aceite de *Chlorella Vulgaris* cultivada a la intemperie.

Tipo de ácidos grasos	% másico
Saturados	13
mono-insaturados	20
di-insaturados	28
tri-insaturados	39

Después de probar diferentes combinaciones de aceites, se encontró que la mezcla de aceite de linaza, aceite de girasol, aceite de oliva y superestearina de palma cumple el requerimiento matemático expresado mediante el sistema de ecuaciones lineales constituido por las Ecuaciones 1, 2, 3 y 4; tales ecuaciones constituyen el balance de masa de ácidos grasos saturados, mono-insaturados, di-insaturados y tri-insaturados presentes en el aceite sintético.

$$W_B C_{B1} + W_C C_{C1} + W_D C_{D1} + W_E C_{E1} = W_A C_{A1} \quad (1)$$

$$W_B C_{B2} + W_C C_{C2} + W_D C_{D2} + W_E C_{E2} = W_A C_{A2} \quad (2)$$

$$W_B C_{B3} + W_C C_{C3} + W_D C_{D3} + W_E C_{E3} = W_A C_{A3} \quad (3)$$

$$W_B C_{B4} + W_C C_{C4} + W_D C_{D4} + W_E C_{E4} = W_A C_{A4} \quad (4)$$

$W$  representa la masa de aceite,  $C_{ij}$  la composición másica en el aceite  $i$  de los ácidos grasos  $j$ ,  $A$  aceite de microalgas,  $B$  aceite de linaza,  $C$  aceite de girasol,  $D$  aceite de oliva,  $E$  superestearina de palma, 1 saturados, 2 mono-insaturados, 3 di-insaturados y 4 tri-insaturados. Las cantidades

así calculadas para preparar 1kg de mezcla sintética se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Masa de los componentes de 1 kg de aceite de *Chlorella Vulgaris* sintético.

Componente de la mezcla	Masa (g)
Aceite de linaza	732
Aceite de girasol	241
Aceite de oliva	8.8
Superestearina de palma	22

## 2.2. Diseño y ejecución experimental, a escala laboratorio, de la transesterificación de la mezcla de aceites

### 2.2.1. Reacción de transesterificación

La Figura 1 esquematiza de manera general la transesterificación de un triglicérido con un alcohol en un medio catalizado; ésta es la reacción comúnmente empleada para la obtención de biodiesel.

Los productos correspondientes son una mezcla de alquilesteres de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos, y glicerina. Una vez finalizada la reacción, la mezcla así formada debe someterse a un proceso de separación de la glicerina, neutralización y lavado [12]. Predojevic [13] recomienda el uso de una solución acidificada 5% w/w durante esta etapa. Después de esto, el biodiesel estará listo para ser caracterizado. Los requerimientos de calidad establecidos en el estándar ASTM D 6751 para el biodiesel se resumen en la Tabla 4.

### 2.2.1. Condiciones de reacción

La transesterificación, también llamada alcoholisis, es sensible a diversos parámetros; los más influyentes sobre la conversión de los triglicéridos en biodiesel son el tipo de alcohol, la relación molar alcohol/aceite, la cantidad de catalizador, la temperatura de reacción y la velocidad de

**Figura 1.** Transesterificación de un triglicérido con un alcohol en un medio catalizado para la obtención de alquilesteres de ácidos grasos y glicerina [11].

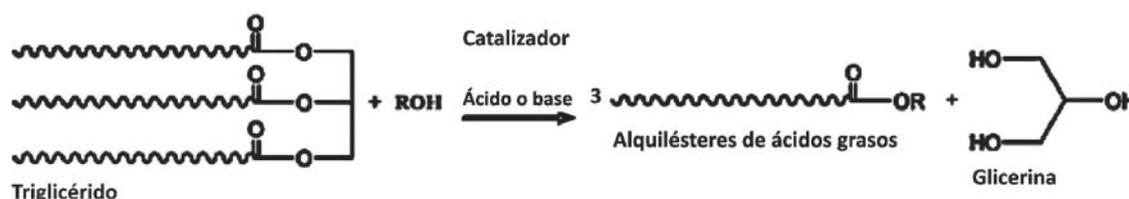


Tabla 4. Estándar ASTM D 6751 para el biodiesel [15].

Propiedad	Método de prueba	Límites	Unidades
Punto de inflamación	D 93	130 min	°C
Agua y sedimentos	D 2709	0.05 max	% volumétrico
Viscosidad cinemática (40°C)	D 445	1.9-6.0	mm <sup>2</sup> /s
Cenizas sulfatadas	D 874	0.02 max	% másico
Contenido de azufre	D 5453	0.0015 max (S15) 0.05 max (S500)	% másico (ppm)
Corrosión en lámina de cobre	D 130	No. 3 max	
Punto de nube	D 2500	Reportar	°C
Carbón residual	D 4530	0.05 max	% másico
Número ácido	D 664	0.5 max	mg KOH/g
Glicerina libre	D 6584	0.02	% másico
Glicerina total	D 6584	0.24	% másico
Contenido de fósforo	D 4951	0.001 max	% másico
Temperatura de destilación	D 1160	360 max	°C
Número de cetano	D 613	47 min	

agitación. Cada uno de estos parámetros debe mantenerse dentro de cierto rango de operación con el objetivo de garantizar una conversión alta.

Entre los alcoholes que pueden ser utilizados, se destaca el metanol por su bajo precio y mayor reactividad. El uso de etanol, por el contrario, presenta la dificultad de formación de emulsiones muy estables durante la reacción [14]. No obstante, la temperatura de ebullición del metanol es baja (64.7°C) y la transesterificación se realiza normalmente a temperaturas cercanas a ésta. Por tanto, se deben tomar medidas de seguridad apropiadas ya que los vapores del metanol son extremadamente tóxicos e inflamables.

Se requiere el uso de un catalizador para mejorar la conversión, el cual puede ser ácido o básico, homogéneo o heterogéneo. La catálisis homogénea ha sido hasta el momento la más implementada a nivel industrial. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suele usarse con mayor frecuencia en catálisis ácida; no obstante, además de las dificultades surgidas por la corrosión de los equipos implicados en el proceso, se necesitan relaciones molares altas para alcanzar conversiones significativas [7,16]; por consiguiente, se prefiere emplear catalizadores básicos. Entre ellos, el más utilizado es NaOH en niveles que van de 0.75 a 1.5% w/w con base en el peso del aceite [11]. Sin embargo, en el caso particular de la etanolisis, los niveles recomendados oscilan entre 0.4 y 0.8% [17].

La conversión aumenta marcadamente con la relación molar; no obstante, por encima de 12:1 la separación de la glicerina producida se dificulta, disminuyendo la conversión [14]. Van Gerpen [12], Meher et al [14] y Sharma & Singh

[11] reportan el uso recurrente de relaciones molares entre 6:1 y 9:1. En cuanto a la velocidad de agitación, entre 360 y 600 rpm la conversión no presenta variaciones significativas. Veljkovic et al [18] establecen que 400 rpm es una velocidad adecuada de agitación.

### 2.2.3 Diseño experimental factorial

El diseño factorial de experimentos constituye una herramienta útil en el estudio de la influencia de distintos factores sobre una variable de respuesta. Diferentes autores han hecho uso de este tipo de diseño en el desarrollo de sus investigaciones. Vicente et al [19], Domingos et al [17] y Yuan et al [20] evaluaron el efecto de la relación molar, la temperatura y la cantidad de catalizador sobre la conversión en la transesterificación del aceite de girasol, de *Raphanus Sativus* y aceite quemado, respectivamente. Los resultados preliminares por ellos obtenidos mostraron un comportamiento no lineal de la variable de respuesta dentro del dominio experimental, requiriéndose la realización de experimentos adicionales que tomaran en cuenta lo anterior. De esta forma, en los tres casos, se llevó a cabo un diseño central compuesto.

### 2.2.4 Establecimiento de los factores y dominio experimental 2<sup>3</sup>

Se establecieron como los principales factores la relación molar alcohol-aceite, la temperatura de reacción y la cantidad de catalizador. Asimismo, se definió el dominio experimental que permite evaluar el efecto de estos factores sobre la conversión de la mezcla de aceites en biodiesel (Tabla 5) y la matriz de experimentos del diseño central

compuesto correspondiente (Tabla 6 y 7). Con el doble propósito de optimizar el estudio realizando sólo una vez cada experimento, y de asegurar la repetibilidad del método, se incluyeron tres réplicas en el centro, filas 9 a 11, en las Tablas 6 y 7 [17].

Tabla 5. Dominio experimental 2<sup>3</sup>.

	Dominio experimental	
	Nivel (-)	Nivel (+)
X1: Relación molar alcohol-aceite	6:1	12:1
X2: Temperatura de reacción	45°C	Metanol: 64°C Etanol: 78°C
X4: Cantidad de catalizador	Metanol: 0,7% w/w Etanol: 0,4% w/w	1,5% w/w 0,8% w/w

Tabla 6. Matriz de experimentos (NaOH y Metanol).

Plan de experimentación			
	Relación molar metanol/aceite	Cantidad de NaOH (w/w)	Temperatura (°C)
1	6:1 (-)	0,7 (-)	45 (-)
2	12:1 (+)	0,7 (-)	45 (-)
3	6:1 (-)	1,5 (+)	45 (-)
4	12:1 (+)	1,5 (+)	45 (-)
5	6:1 (-)	0,7 (-)	64 (+)
6	12:1 (+)	0,7 (-)	64 (+)
7	6:1 (-)	1,5 (+)	64 (+)
8	12:1 (+)	1,5 (+)	64 (+)
9	9:1 (0)	1,1 (0)	55 (0)
10	9:1 (0)	1,1 (0)	55 (0)
11	9:1 (0)	1,1 (0)	55 (0)
12	4:1 (- 23/4)	1,1 (0)	55 (0)
13	14:1 (+ 23/4)	1,1 (0)	55 (0)
14	9:1 (0)	0,42 (- 23/4)	55 (0)
15	9:1 (0)	1,77 (+ 23/4)	55 (0)
16	9:1 (0)	1,1 (0)	38(- 23/4)
17	9:1 (0)	1,1 (0)	72 (+ 23/4)

2.2.5. Sistema de reacción

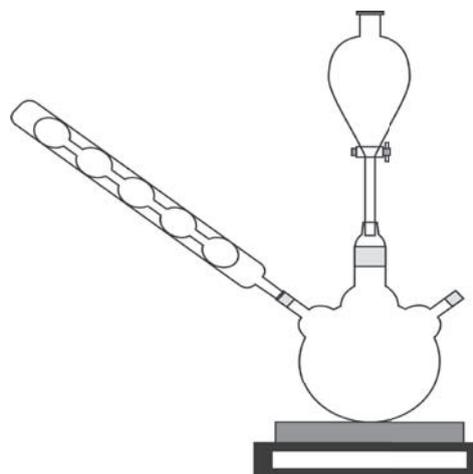
El sistema de reacción propuesto para llevar a cabo la transesterificación del aceite de microalgas sintético se esquematiza en la Figura 2. Consiste en un balón de tres bocas al cual se acoplan un condensador, un sensor de tempe-

ratura incorporado a una plancha de calentamiento con agitación magnética y un recipiente de almacenamiento del alcóxido.

Tabla 7. Matriz de experimentos (NaOH y Etanol)

Plan de experimentación			
	Relación molar metanol/aceite	Cantidad de NaOH (w/w)	Temperatura (°C)
1	6:1 (-)	0,4 (-)	45 (-)
2	12:1 (+)	0,4 (-)	45 (-)
3	6:1 (-)	0,8 (+)	45 (-)
4	12:1 (+)	0,8 (+)	45 (-)
5	6:1 (-)	0,4 (-)	78 (+)
6	12:1 (+)	0,4 (-)	78 (+)
7	6:1 (-)	0,8 (+)	78 (+)
8	12:1 (+)	0,8 (+)	78 (+)
9	9:1 (0)	0,6 (0)	61 (0)
10	9:1 (0)	0,6 (0)	61 (0)
11	9:1 (0)	0,6 (0)	61 (0)
12	4:1 (- 23/4)	0,6 (0)	61 (0)
13	14:1 (+ 23/4)	0,6 (0)	61 (0)
14	9:1 (0)	0,26 (- 23/4)	61 (0)
15	9:1 (0)	0,94 (+ 23/4)	61 (0)
16	9:1 (0)	0,6 (0)	34 (- 23/4)
17	9:1 (0)	0,6 (0)	88 (+ 23/4)

Figura 2. Sistema de reacción para la transesterificación de aceite de microalgas sintético.



2.2.6. Procedimiento de transesterificación

Después de preparada la mezcla de aceites, se le debe mantener en un horno durante 1 hora a 110°C, para eliminar el agua que pueda estar presente [11]. Una vez su

temperatura disminuya hasta la temperatura de reacción, se vierte en el balón y se le agrega lentamente el alcóxido mientras se agita a 400 rpm durante 1 hora, tiempo que toma alcanzar la conversión más significativa [21]. En la preparación del alcóxido se debe tener la precaución de no exponer el NaOH mucho tiempo al ambiente, ya que es un compuesto higroscópico. Finalizada la reacción, la mezcla reaccionante se deja reposar en un embudo de decantación a temperatura ambiente durante 12 horas [13,22]. La fase superior que se forma, rica en ésteres, se somete a evaporación, recuperándose la mayor parte del exceso de alcohol utilizado.

### 2.3. Elaboración y ejecución de un procedimiento de purificación del biodiesel

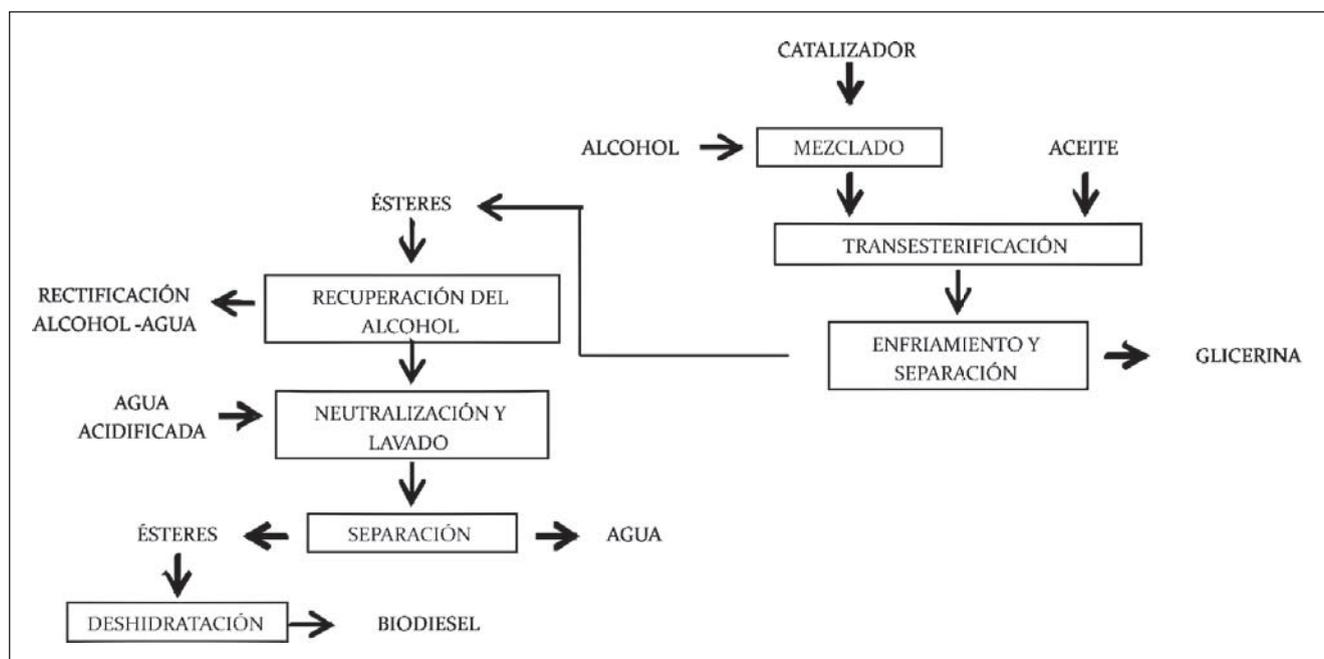
Concluida la evaporación, los ésteres se lavan con agua acidificada 5% w/w (en relación volumétrica 1:1) y agitación vigorosa. De esta forma, se neutraliza el catalizador residual y se escinde cualquier jabón formado durante la reacción, al mismo tiempo que se minimiza la cantidad de agua requerida y la formación de emulsiones durante el lavado. Los jabones reaccionan con el ácido formando sales solubles en agua y ácidos grasos. Estas sales se remueven durante el lavado mientras que los ácidos grasos permanecen en el biodiesel [12]. La mezcla así formada se deja reposar en un embudo de decantación a temperatura ambiente. Este procedimiento se repite mientras el pH del agua de lavado no sea neutro [13,23]. El biodiesel se deshidrata agregando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en una cantidad equivalente al 25% en masa, que posteriormente se separa me-

dante filtración, y sometiéndolo a evaporación [13,23]. La Figura 3 esquematiza el proceso en su totalidad.

### Conclusiones

La producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas constituye un gran avance en el esfuerzo por disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero producidos durante la combustión de carburantes fósiles, al mismo tiempo que evita la utilización de cultivos tradicionalmente empleados para la alimentación humana como materia prima. A pesar de la dificultad actual para adquirir este tipo de aceite, el desarrollo de una metodología de transesterificación de una mezcla de aceites vegetales cuya composición simule la del aceite de *Chlorella Vulgaris* resulta alentador. Esta metodología consiste básicamente en tres etapas: preparación de una mezcla de aceites vegetales cuya composición simule la del aceite de *Chlorella Vulgaris*, diseño y ejecución experimental de la transesterificación de esta mezcla de aceites, y elaboración y ejecución de un procedimiento de purificación del biodiesel. Haciendo uso del diseño factorial central compuesto es posible evaluar la influencia de las principales variables del proceso (relación molar alcohol-aceite, temperatura de reacción y cantidad de catalizador) en la conversión del aceite de microalgas sintético en biodiesel, con la eventualidad posterior de elaborar un protocolo de transesterificación que se implemente sin menores dificultades una vez se tenga disponible aceite de microalgas. La preparación de 1 kg de aceite sintético requiere 732g de aceite de linaza, 24g de aceite de girasol, 8.8g de aceite de oliva y 22g de superestearina de palma.

Figura 3. Proceso de producción de biodiesel.



## Agradecimientos

Los autores agradecen a la *Dirección de Desarrollo Tecnológico y Protección Sanitaria del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural* por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de este trabajo, en el marco del proyecto titulado *Programa de Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel*.

## Bibliografía

- [1] Keshwani, D.R. & Cheng, J. J. (2009) "Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review". *Bioresource Technology*, 100: 1515-1523.
- [2] Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., Muys, B. (2008) "Jatropha bio-diesel production and use". *Biomass and bioenergy*, 32: 1063-1084.
- [3] Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2008). "Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production". *Bioenergy research*, 1: 20-43.
- [4] Rittmann, B. E. (2008). "Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms". *Biotechnology and bioengineering*, 100: 203-212.
- [5] Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
- [6] Widjaja, A., Chien, C. C. & Ju, Y. H. (2009). "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40: 13-20.
- [7] Miao, X. & Wu, Q. (2006). "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil". *Bioresource Technology*, 97: 841-846.
- [8] Umdu, E. S., Tuncer, Me & Seker, E. (2009). "Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts". *Bioresource Technology*, 100: 2828-2831.
- [9] Petkov, G., & Garcia, G. (2007). "Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?". *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 281-285.
- [10] Ma, F. & Hanna, M. A. (1999). "Biodiesel production: a review". *Bioresource Technology*, 70: 1-15.
- [11] Sharma, Y. C. & Singh, B. (2009). "Development of biodiesel: Current scenario". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 1646-1651.
- [12] Van Gerpen, J. (2005). "Biodiesel processing and production". *Fuel Processing Technology*, 86: 1097-1107.
- [13] Predojevic, Z. J. (2008). "The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps". *Fuel*, 87: 3522-3528.
- [14] Meher, L. C., Vidya Sagar, D. & Naik, S. N. (2006). "Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10: 248-268.
- [15] Knothe, G. (2006). "Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods". *Journal of American Oil Chemists' Society*, 83 (10): 823-833.
- [16] Zheng, S., Kates, M., Dubé, M. A. & McLean, D. D. (2006). "Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil". *Biomass and Bioenergy*, 30: 267-272.
- [17] Domingos, A.K., Saad, E.B., Wilhelm, H.M. & Ramos, L.P. (2008). "Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology". *Bioresource Technology*, 99:1837-1845.
- [18] Veljkovic, V. B., Lakicevic, S. H., Stamenkovic, O. S., Todorovic, Z. B. & Lazic, M. L. (2006). "Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids". *Fuel*, 85: 2671-2675.
- [19] Vicente, G., Coteron, A., Martinez, M. & Aracil, J. (1998). "Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production" *Industrial Crops and Products*, 8: 29-35.
- [20] Yuan, X., Liu, J., Zeng, G., Shi, J., Tong, J. & Huang, G. (2008). "Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology" *Renewable Energy*, 33: 1678-1684.
- [21] Freedman, B; Pryde, E.H. & Mounts, T.L. (1984). "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61: 1638-1643.
- [22] Korus, R.A.; Hoffman, D.S.; Peterson, C.L.; Bam, N. & Drown, D.C. (1993). "Transesterification Process to Manufacture Ethyl Ester of Rape Oil". *First Biomass Conference of the Americas*, Burlington, Vol. 2: 815-822.
- [23] Karaosmanoglu, F.; Cigizoglu, K.B.; Tuter, M. & Ertekin, S. (1996). "Investigation of the refining step of biodiesel production". *Energy & Fuels*, 10: 890-895.