



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -CONCYT-
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -SENACYT-
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -FONACYT-
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA-UVG**

INFORME FINAL

Determinación, evaluación y optimización de la producción de biodiesel empleando la extracción acoplada a una reacción simultánea de biomasa rica en grasa

PROYECTO FODECYT No. 003-2012

**MSc. Carlos E. Rolz Asturias
Investigador Principal**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2015



AGRADECIMIENTO

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología –FONACYT- del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología –CONCYT-administrado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT-

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

M.Sc. Carlos E. Rolz Asturias
Investigador Principal

M.Sc. Luis Roberto De León Fajardo
Investigador Asociado

Lic. Ana Luisa Mendizábal de Montenegro
Investigador Asociado

Ing. Químico José Andrés Hernández Gaitán
Investigador Asociado

Sr. Carlos Humberto Arias Méndez
Técnico de Laboratorio

Resumen

Guatemala es un país importador neto de combustibles líquidos derivados del petróleo. El consumo actual de diésel es del orden de los 1,200 millones de litros por año con una tendencia alcista mostrada en las últimas dos décadas. El diésel puede ser mezclado con el biodiesel, combustible renovable producido por la reacción de trans-esterificación entre un aceite vegetal o una grasa animal y un alcohol de bajo peso molecular bajo la acción de un agente catalítico, en diferentes proporciones sin necesidad de alterar el funcionamiento de los motores diésel o de combustión por compresión. En el año 2011 se ha estimado que la producción mundial anual de biodiesel fue de aproximadamente 14,441 ML¹. La región en donde más se produjo fue en Europa con un 44 %. Las materias primas usadas han sido: a) aceites vegetales comestibles refinados, b) metanol y c) catalizadores alcalinos, hidróxido de sodio o de potasio. Entre los aceites vegetales están los siguientes: soya y canola en Norteamérica, soya en Suramérica, colza y girasol en Europa y palma en el Sureste Asiático. La mayoría de ellos son aceites vegetales alimenticios.

En Guatemala se intentó producir biodiesel a partir del aceite de *Jathropa curcas* o piñón como se le conoce localmente, pero el resultado no fue exitoso comercialmente, especialmente por problemas en el rendimiento agrícola del cultivo. Así mismo, plantas piloto han procesado pequeñas cantidades de aceite vegetal de desecho usado en la industria de alimentos fritos, incluyendo la planta demostrativa del Centro de Procesos Industriales, Instituto de Investigaciones, de la Universidad del Valle de Guatemala, la cual al mismo tiempo se emplea en la enseñanza como en la investigación.

El proyecto presente tuvo como un primer objetivo reemplazar el metanol por el etanol, ya que Guatemala produce etanol de recursos renovables. Por lo que se consideró de importancia estratégica conocer con más profundidad la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos o FAEE, como se les conoce por sus siglas en inglés. Un segundo objetivo fue la de investigar una posible consolidación del proceso, integrando en una sola operación la extracción del aceite de la materia prima con la reacción del mismo con el alcohol correspondiente. Por otro lado, Guatemala no cubre la demanda actual de aceites comestibles, ya que se importan, principalmente, aceites de soya, girasol y maíz. El aceite de palma, cuyo cultivo ha crecido últimamente, cubre las necesidades internas y el excedente se exporta. En menor escala se cultiva el ajonjolí, cuya semilla se exporta y cubre también el mercado local. Por lo tanto, un tercer objetivo, de igual importancia estratégica, fue el de explorar opciones no tradicionales como los microorganismos oleaginosos, entre ellos las levaduras, las cuales pueden producirse de subproductos de la industria azucarera, sin la necesidad de emplear tierra de uso agrícola.

La producción de ésteres etílicos a partir de un aceite vegetal y etanol se llevó a cabo con la aplicación de ultrasonido como una fuente de zonas de cavitación acústica y de agitación, empleando agitación mecánica y bajas temperaturas. Se utilizó un diseño factorial con repetición del punto central y se cuantificó el efecto sobre el grado de conversión de dos factores o variables, la relación molar etanol: aceite y la cantidad del catalítico alcalino

¹ U.S. Energy Information Administration www.eia.gov ML = millones de litros

hidróxido de potasio. Los dos factores tuvieron una influencia significativa sobre la conversión y la interacción entre ambos tuvo una importancia relativamente menor. La conversión fue mayor al cambiar los factores de su nivel bajo al nivel alto, en otras palabras, la conversión aumentó cuando inicialmente había mayor cantidad de etanol y de KOH, de acuerdo con el modelo matemático generado. Se estimó que la concentración adecuada de catalizador no debería pasar de 1.0 % en peso referido al contenido de aceite inicial y la relación molar 10: 1 de etanol a aceite era suficiente. El tiempo de reacción para obtener la mayor conversión de un 88 % logrado se observó que estaba entre 10 a 15 min. Los datos obtenidos de la conversión respecto al tiempo fueron ajustados a un modelo de reacción de pseudo segundo orden. El ajuste fue mejor cuando se empleó una mayor cantidad de catalizador.

El costo de producción de ésteres metílicos a partir de un aceite comercial fue de Q 34.24 por galón de producto, en una planta con una producción anual de biodiesel de 50,000 Mg². En Guatemala dicha cantidad puede mezclarse en un 5% con diésel importado para llenar la demanda actual de 1,200 millones de litros por año. Se identificó en el proceso al costo de la materia prima grasa como el factor decisivo en fijar el costo de producción del biodiesel. Por otro lado, se listaron una serie de anotaciones indicando las diferentes alternativas, en el ámbito nacional, para disminuir dicha cifra. Por ejemplo, la única materia prima por el momento capaz de surtir la demanda de aceite de la planta de biodiesel analizada resultó ser la palma. El costo actual de dicho aceite en el mercado internacional está alrededor de US\$ 600 por tonelada. La disminución de un 45 % en el costo del aceite empleado en el proceso tiene un efecto marcado en el costo de producción, el cual disminuiría hasta Q 16.90 por galón. Dicha cifra podría reducirse aún más al llevar a cabo un análisis de costos más detallado.

En relación a la posible consolidación del proceso, la extracción reactiva realizada con el desecho sólido de café y con la semilla de ajonjolí triturada, empleando etanol, hidróxido de potasio como catalítico y usando ultrasonido en pulsos como ayuda física para acelerar la extracción y la reacción, se llevó a cabo sin problemas. La proporción inicial de 1 a 10 en g de material sólido a mL³ de etanol, y la proporción de 1% de hidróxido de potasio en base al peso inicial de aceite contenido en el sólido fueron las apropiadas para la operación del reactor. El tiempo empleado de 4 a 5 h y la operación del sistema de ultrasonido en forma de pulsos logró una conversión adecuada. Los ésteres etílicos identificados en el producto resultante correspondían con la composición de los ácidos grasos del aceite original en el sólido.

La experimentación con las levaduras oleaginosas *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 y *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 como una fuente de aceite no tradicional permitió obtener los resultados siguientes respecto al substrato empleado para crecer las levaduras. Primero, en el crecimiento en hidrolizados de la lignocelulosa, se comprobó que se obtenía un mayor crecimiento en hidrolizados ácidos del tallo de sorgo dulce que de los hidrolizados alcalinos. La levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 tuvo un mayor crecimiento que *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 y el rendimiento de conversión a biomasa seca por unidad de

² Mg = mega gramos o tonelada

³ mL = mililitro o centímetro cúbico

azúcar inicial fue de 0.232. Sin embargo la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 contenía más del doble de aceite que la levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815. En 7 días de cultivo se obtuvo 2.77 g/L de biomasa seca de levadura con un contenido de aceite de 28.27 %. Lo anterior equivale a 0.0047 g aceite por litro por hora de cultivo.

Por otro lado, el empleo del jugo de sorgo como materia prima para producir biomasa de levaduras ricas en aceite fue exitoso. Las dos levaduras anteriores, *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 y *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 mostraron una velocidad inicial de crecimiento entre 0.01 y 0.09 h⁻¹ y rendimientos de biomasa seca por carbohidratos consumidos entre 0.29 y 0.39, cifras aceptables. Se encontró que fue necesario enriquecer el jugo de sorgo con una fuente de nitrógeno para lograr las cifras anteriores. Así mismo se constató experimentalmente que los resultados al emplear nitrógeno orgánico o nitrógeno inorgánico eran equivalentes. El enriquecimiento del jugo de sorgo con 1 g/L de fosfato de amonio fue satisfactorio. Las dos levaduras mostraron una inhibición cuando la concentración inicial del azúcar era alta, sin embargo no se determinó el umbral de azúcar en donde ocurre esta inhibición. El contenido de aceite de la biomasa de la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 estuvo alrededor de 25 % y el de la levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 entre 17 y 28 %. La transformación del aceite a esteres metílicos se realizó exitosamente y el análisis por cromatografía reveló una mayor proporción del éster C18:1 (oleico) en la mezcla resultante.

El costo de producción de esteres etílicos a partir del aceite de una levadura oleaginosa no fue competitivo con la estructura de precios actuales de los combustibles. El costo principal estuvo asociado a la inversión fija en el proceso para producir la biomasa de la levadura oleaginosa, el cual fue relativamente elevado debido a la baja productividad del aceite.

Con el objeto de reducir costos se desarrolló una estrategia de proceso novel para producir del jugo de sorgo dulce con una alta concentración de azúcar dos productos, el etanol y la levadura rica en grasa. El proceso consistió en dos etapas en secuencia.

En la primera etapa se produjo etanol empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se ensayaron cuatro levaduras con jugo de sorgo a las más altas concentraciones de azúcares totales iniciales. Las levaduras CBS381 y CBS 459 produjeron 7.13 y 7.26 g etanol %, respectivamente, y no consumieron el 14 y el 7 % aproximadamente del total de los azúcares iniciales. Por otro lado, la levadura CBS422 produjo la menor cantidad de etanol con el menor consumo de azúcar. Los ensayos anteriores demostraron la flexibilidad de la operación, ya que la cantidad de etanol a producir dependía de la cepa de levadura empleada.

En la segunda etapa se creció *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 en el licor obtenido, luego de separar la primera levadura y destilar el etanol, para producir biomasa rica en grasa ya que dicha levadura consumió mejor la sacarosa en el jugo de sorgo dulce que la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075. Se obtuvo una productividad de aceite de 0.035 g de aceite por litro de medio por hora, lo cual comprobó la factibilidad de la estrategia desarrollada.

La alternativa propuesta en este trabajo de emplear jugo de sorgo de alta concentración de azúcar para producir dos productos en dos etapas consecutivas, utilizando dos distintas

levaduras, pudiera paliar en parte el problema del costo de producción. Por un lado se tendrían dos productos para vender, el etanol y el biodiesel (FAEE). Por el otro es posible procesar la levadura productora de etanol y la levadura oleaginoso (libre de aceite) y vender la mezcla como una materia prima rica en proteína para la industria de concentrados destinados a animales mono-gástricos.

En términos generales puede decirse, entonces, que la experimentación realizada confirmó la factibilidad de emplear etanol en lugar de metanol en la producción de biodiesel y que el ultrasonido aceleró la velocidad de reacción. De igual forma, se llevó a cabo la extracción con etanol del aceite de dos diferentes materias primas oleaginosas acopladas a la reacción de trans-esterificación para formar los ésteres etílicos. Sin embargo, las condiciones de operación deben de optimizarse en futuros trabajos, en los cuales deben de incluirse fuentes de aceite no tradicionales, que no provengan del uso extensivo de la tierra agrícola, tal como los microorganismos oleaginosos. Las levaduras empleadas en este trabajo, especialmente el *Trichosporon oleaginosus*, deben ser estudiadas con más detalle para acelerar su tasa de crecimiento y de acumulación de aceite.

Con el objeto de disminuir los costos de producción debe estudiarse más a fondo la alternativa desarrollada en este trabajo, la cual partiendo del jugo extraído del tallo del sorgo dulce, empleando dos levaduras distintas en etapas consecutivas, produce dos biocombustibles, el etanol y el biodiesel.

A continuación, en la primera parte, luego de una breve introducción, del planteamiento del problema, de los objetivos e hipótesis del proyecto, se describe en detalle la metodología empleada en la ejecución de los experimentos y de las pruebas. La segunda parte del informe contiene los antecedentes o marco teórico elaborado luego de una extensa búsqueda de información en la literatura científica relacionada al tema. La tercera parte presenta, con ayuda de 40 cuadros y 64 gráficas, los resultados experimentales y seguidamente la discusión de los mismos. La cuarta parte resume las conclusiones del trabajo ordenadas en términos de los objetivos iniciales. Finalmente se presentan, recomendaciones, un listado de 195 referencias bibliográficas citadas en el texto, y siete anexos.

Palabras Clave

Biodiesel, ésteres etílicos de ácidos grasos, etanol, extracción-reacción simultánea, levaduras oleaginosas, aceite microbiano

Abstract

Guatemala needs to import all the fuel products used for transport. Diesel consumption has shown a gradual increase during the last two decades and currently stands to 1,200 millions of liters per annum. Diesel can be mixed with biodiesel, a renewable product produced by a transesterification catalytic reaction between a vegetable oil or animal fat with a low molecular weight alcohol, in several proportions without causing a negative effect on the operation of diesel engines. The world annual biodiesel production in 2011 was around 14,441 ML⁴, leading Europe with 44 %. The raw materials employed were: a) refined vegetable oils, b) methanol and c) alkaline homogenous catalysts, NaOH or KOH. Among the vegetable oils used were: soya and canola in Northamerica, rapeseed and sunflower in Europe, soya in Southamerica and palm in Southeast Asia. Most of these are edible oils.

Locally biodiesel was produced some years back from *Jathropa curcas* but the commercial operation failed mainly due to agricultural yield problems. Also, small pilot plants have operated using waste cooking oils, including the installation at the Industrial Processes Center, Research Institute, Universidad del Valle de Guatemala, which is also used in teaching and research activities.

The present project had several objectives, the first one being methanol replacement by ethanol, as this alcohol is produced locally by sugar byproducts fermentation, and so the production of fatty acids ethyl esters or FAEE was considered of strategic importance. A second objective was process consolidation by exploring the possible reactive extraction or *in situ* transesterification of an oleaginous raw material and ethanol. On the other hand, Guatemala is also deficient in edible oil resources, as soybean, sunflower and canola are imported. Palm oil production has shown an increase in recent years, is consumed locally and also exported. Sesame seed has been cultivated for many years but is exported and also supplies the local demand. A third objective was focused on this situation and consisted in exploring the possible microbial oil production, especially oleaginous yeasts, which can be produced from sugar cane and avoiding land use.

The fatty acid ethyl esters were produced employing a vegetable oil and ethanol with the application of ultrasound as a source of acoustic cavitation, mechanical mixing was also employed and the conversion was done at low temperatures. The effect on the extent of reaction of the amount of alkaline catalyst and the molar initial ratio of ethanol to oil was quantified employing a factorial design with replication of the center point. Both factors or variables had a significant influence on the conversion and their interaction had a minor effect. The extent of reaction was higher when the variables changed from their lower to the higher level, in other words, a higher conversion was obtained when the ethanol and KOH concentrations were at their maximum values, as explained by the mathematical model generated. From these results the most adequate operating conditions were a 1.0 % by weight of KOH and a molar ratio of ethanol to oil of 10: 1. A reaction time between 10 to 15 min was sufficient in order to obtain 88 % conversion at the optimum conditions. The experimental

⁴ U.S. Energy Information Administration www.eia.gov MgL = million liters

data was fitted to a pseudo second order reaction model and the adjustment improved at the higher catalyst concentrations.

The production cost of methyl esters in a 50,000 Mg annual capacity plant was Q 32.24 per gallon⁵. Such quantity makes a 5 % blend with the 1,200 million liters of annual imported diesel. The raw materials cost was the main factor affecting the final production cost. Several adaptations to local conditions were considered, for example, palm oil is the only raw material produced which can supply the required oil for such a plant. Palm oil has actually and international cost of around US\$ 600 per Mg. This implies a 45 % decrease in the price of the required oil for the process, which gives a Q16.90 % per gallon production cost. Further considerations, beyond the scope of this project, could decrease the figure even more.

Process consolidation consisted in the reactive extraction of waste coffee grounds and milled sesame seeds employing ethanol, 1 % by weight potassium hydroxide as catalyst and pulsed ultrasound. The trials lasted for 4 to 5 h and conversion to fatty acid ethyl esters took place without any major problem. The initial proportion of 1 g of solid material and 10 mL⁶ of ethanol provided a smooth operation in the glass reactor. The ester composition matched the initial oil fatty acid composition.

Trials done with *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* and *Yarrowia lipolytica CBS 2075*, both oleaginous yeasts were as follows. Both yeast grew well in liquors from pretreated acid hydrolyzed sweet sorghum stalks. The reverse happened when an alkaline hydrolysis was done. *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* grew better than *Yarrowia lipolytica CBS 2075* and showed a biomass yield of 0.232 with respect to the initial sugar concentration. However *Yarrowia lipolytica CBS 2075* biomass had twice the amount of intracellular oil. In a seven days culture 2.77 g/L of dry yeast biomass with a 28.27 % of oil was obtained. This is equivalent to 0.0047 g of oil per liter per hour.

On the other hand, sweet sorghum juice proved to be an excellent substrate for yeast growth. Both *Yarrowia lipolytica CBS 2075* and *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* grew with an initial velocity of 0.01 and 0.09 h⁻¹ and showed biomass yields of 0.19 and 0.39, data which was quite acceptable. Sweet sorghum juice had to be enriched with nitrogen, either organic or inorganic nitrogen, in fact ammonium phosphate at 1 g/L was sufficient to support growth. Both yeast showed growth inhibition at high substrate concentrations, although no effort was made to determine the zone where inhibition started. The biomass oil content of *Yarrowia lipolytica CBS 2075* was around 25 % and of *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* between 17 and 28 %. No problem was found in converting the microbial into methyl esters and chromatography indicated that C18:1 (oleic) was in predominant in the ester mixture.

Production cost of ethyl esters employing the microbial oil was not competitive with the local fossil fuels cost structure. A high equipment fixed cost in the yeast growth section of the plant was the main cost factor, originated by the low oil productivity that has been achieved up to date.

⁵ Mg = mega grams or ton

⁶ mL = milliliter or cubic centimeter

In order to reduce costs an alternative was developed and tested. The novel idea was to utilize sweet sorghum juice with high sugar concentration and produce in a two step sequence ethanol and biodiesel.

Four *Sacharomyces cerevisiae* yeasts were tested for ethanol production. The strains CBS 381 and CBS 459 produced 7.13 and 7.26 g of ethanol per 100 mL, and left 14 and 7 % of the sugars initially present. The strain CBS 422 produced the least amount of ethanol with the smallest sugar consumption. It was shown, then, that the result was dependent on the yeast strain, hence there was flexibility in the operation.

In the second step *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* was grown on the residual liquor after centrifugation and ethanol distillation. The yeast grew well and an oil productivity of 0.035 g of oil per liter per hour was obtained. The proposed alternative was shown to be feasible.

Employing high sugar concentration sweet sorghum juice for a two product process, ethanol and biodiesel (FAEE), employing two different yeasts in two consecutive steps might be a way to reduce production costs. Also, the recovered yeasts, free of oil, could be considered a third product due to its high protein content and possible demand in the animal feed industry..

In general terms we can conclude that FAEE production is technically feasible and that ultrasound accelerated the reaction. Under the same conditions the reactive extraction technique was successful with the two materials tested. However, operating conditions should be optimized preferably with nontraditional oil-bearing raw materials like the oleaginous microbes. Yeasts should be studied further in order to improve biomass production and oil accumulation within the cell.

In order to reduce production costs the process alternative developed in this work should be studied in detail in terms of a biorefinery concept producing various products.

The report contents follow, and as first section the experimental methods are described in detail, after a brief introduction, a problem description, the objectives and hypothesis. The second part deals with a summary of previous knowledge as was published in the scientific literature. The third part presents the experimental results and their technical discussion, done with the help of 40 tables and 64 graphs. The fourth part lists the conclusions reached. Finally, recommendations for future work are given, a list of 195 cited references and seven annex.

Key words:

Biodiesel, fatty acid ethyl esters, ethanol, reactive-extraction, oleaginous yeasts, microbial oil

ÍNDICE

PARTE I

	No. Pág.
I.1 INTRODUCCIÓN	004
I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	005
1.2.1 Antecedentes en Guatemala	005
1.2.2 Justificación del trabajo	006
I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS	006
I.3.1 Objetivos	006
I.3.1.1 General	006
I.3.1.2 Específicos	007
I.3.2 Hipótesis	007
I.4 METODOLOGIA	007
I.4.1 Levaduras oleaginosas	007
I.4.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas	021

PARTE II

II.1 MARCO TEÓRICO	026
II.1.1 ¿Qué es el diesel?	026
II.1.2 ¿Cuáles son los sustitutos del diesel obtenidos de recursos renovables?	027
II.1.3 La reacción de trans-esterificación para producir biodiesel	027
II.1.4 La producción global de biodiesel	028
II.1.5 ¿Qué materias primas y cuál es el proceso industrial más empleado?	029
II.1.6 Costos de producción del proceso alcalino empleando metanol y aceites vegetales	033
II.1.7 Empleo de aceites desechados o reciclados y aceites que no se emplean en la alimentación humana como materias primas	036
II.1.8 Empleo de microorganismos oleaginosos	039
II.1.9 Experiencias previas con las levaduras <i>Yarrowia lipolytica</i> y <i>Trichosporon</i> sp.	046
II.1.10 Empleo del etanol en lugar de metanol en la producción de biodiesel	047
II.1.11 Extracción y reacción simultánea	048

PARTE III

III. RESULTADOS	051
III.1 Resultados experimentales	051
III.1.1 Levaduras oleaginosas	051
III.1.1.1 Pruebas preliminares de crecimiento en un medio sintético	051

III.1.1.2 Pruebas de crecimiento con el objetivo de simplificar el medio	054
III.1.1.3 Pruebas de confirmación de la composición del medio ...	057
III.1.1.4 Pruebas de crecimiento en hidrolizados del bagazo del sorgo dulce	059
III.1.1.5 Desarrollo de nueva tecnología a base de jugo de sorgo dulce	060
III.1.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas	074
III.1.2.1 Aceites vegetales	074
III.1.2.2 Trans-esterificación <i>in situ</i> o reacción extractiva del residuo de café extraído	082
III.1.2.3 Trans-esterificación <i>in situ</i> o reacción extractiva de semillas de ajonjolí	084
III.1.3 Estimación del costo de producción	084
III.2 Discusión de resultados	087
III.2.1 Experimentos con levaduras	087
III.2.1.1 Azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.	087
III.2.1.2 Hidrolizados de lignocelulosa	088
III.2.1.3 Proceso de dos etapas en secuencia	089
III.2.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas	091
III.2.2.1 Aceite comercial	091
III.2.2.2 Transesterificación <i>in situ</i> o reacción extractiva del residuo de café extraído	094
III.2.2.3 Transesterificación <i>in situ</i> o reacción extractiva del aceite en la semilla de ajonjolí	095
III.2.2.4 Aspecto económicos	096

PARTE IV

IV.1 CONCLUSIONES	097
IV.1.1 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (b)	097
IV.1.2 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (e)	097
IV.1.3 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (c)	098
IV.1.4 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (d)	098
IV.1.5 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (f)	099
IV.1.6 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (a)	100
IV.2 RECOMENDACIONES	101
IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
IV.4 ANEXOS	112
ANEXO 1. Ejemplos de experimentos empleando <i>Trichosporon</i> para producir aceite.....	112
ANEXO 2. Ejemplos de experimentos empleando <i>Yarrowia</i> para producir aceite	115

ANEXO 3. Ejemplos de experimentos empleando etanol	118
ANEXO 4. Resultados de los seis experimentos del diseño factorial 2 ² con repetición del punto central de la reacción de trans-esterificación del etanol con un aceite comercial de una mezcla de aceites de soya y girasol bajo efectos de ultrasonido.	119
ANEXO 5. Cromatograma de la distribución de ácidos grasos del aceite del residuo extraído del café y de los ésteres etílicos formados por la extracción reactiva (trans-esterificación <i>in situ</i>)	122
ANEXO 6. Cromatograma de la distribución de ácidos grasos del aceite de semilla de ajonjolí y de los ésteres etílicos formados por la extracción reactiva (trans-esterificación <i>in situ</i>)	123
ANEXO 7. Análisis técnico económico de la producción de biodiesel de aceite de colza y metanol	124
ANEXO 8. Análisis técnico económico de la producción levadura oleaginosa, extracción del aceite y conversión a biodiesel.	128

PARTE V

V.1 INFORME FINANCIERO	133
--	-----

1.1 INTRODUCCIÓN

El suministro de los combustibles fósiles empleados en el transporte ha mostrado en años recientes una incertidumbre en el mercado de la oferta y la demanda y como consecuente directo una volatilidad en los precios. En varios países, número que se incrementa paulatinamente, se encuentran en desarrollo alternativas de combustibles sustentables obtenidos de materias primas renovables. Por ejemplo, a la fecha, son comunes las mezclas de etanol en gasolina y de biodiesel en el diesel, las cuales, no solo se adaptan sin problema alguno a los motores de uso tradicional, sino que es posible que resulten más económicas para el usuario y su producción impulsaría el desarrollo de zonas rurales económicamente empobrecidas. Existen también, iniciativas más novedosas como la producción del gas de síntesis e hidrocarburos de materias primas renovables via procesos de transformación térmica y catalítica.

Los mayores productores de biodiesel en el mundo emplean aceites vegetales comestibles como una de las materias primas. Sin embargo, futuros incrementos en el uso de tales materias primas, debido a una demanda por encima de la actual oferta, pone en riesgo la seguridad alimentaria de la población.

¿Será posible encontrar un balance?

Afortunadamente existen iniciativas para emplear los aceites no comestibles, el aceite vegetal usado en la industria alimenticia y fuentes oleaginosas no tradicionales, es decir, los microorganismos, tanto fotosintéticos, como las algas, así como las levaduras y los hongos filamentosos. Estos últimos pueden reproducirse en efluentes de desecho o en bio refinerías procesando cultivos de múltiple propósito. Las algas, por otro lado, pueden cultivarse, tanto en agua del mar y salobre, como en desagües municipales y efluentes de la industria.

Los resultados que se presentan en este informe contribuyen con este desarrollo en dos instancias: a) la exploración de fuentes no tradicionales de aceite (levaduras) y b) el estudio de emplear como materia prima el etanol en lugar de metanol y la posterior consolidación del proceso.

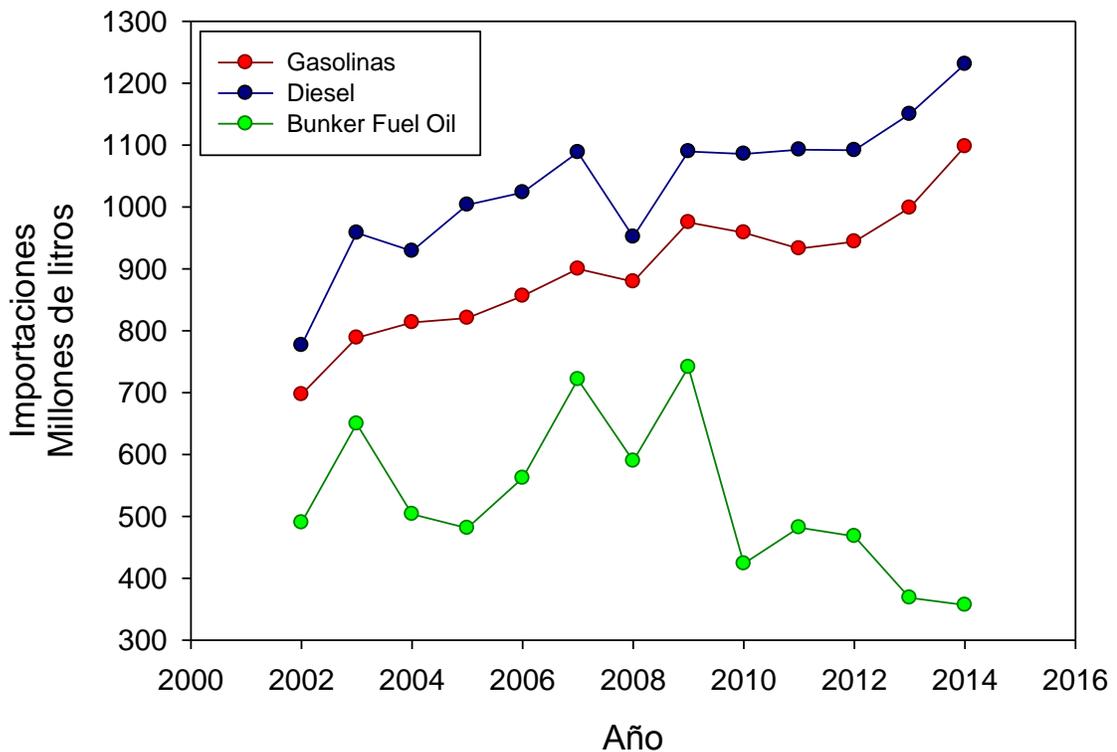
A continuación, luego de plantear el problema y de listar los objetivos de la investigación y la hipótesis experimental, se presenta, en su orden, la metodología experimental descrita en detalle, un extenso marco teórico, la presentación de resultados con ayuda de cuadros y gráficas, la discusión de los mismos, en donde se incluye la comparación de los datos con los obtenidos por otros investigadores, como también, diferentes correlaciones entre variables. Finalmente se presentan las conclusiones para cada objetivo propuesto inicialmente, recomendaciones y la bibliografía consultada y citada en el texto conteniendo referencias de revistas científicas internacionales.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1 Antecedentes en Guatemala

Guatemala es un país importador neto de combustibles líquidos derivados del petróleo, tal como puede apreciarse en la Gráfica 1. Las cifras mostradas indican: a) el diésel es el combustible fósil que más se importa, b) un consumo de diesel del orden de los 1,200 millones de litros por año con una tendencia alcista, c) un consumo de gasolinas con una tendencia alcista, y d) un consumo de bunker y fuel oil con una tendencia negativa.

Gráfica 1. Importaciones de gasolinas superior y regular y diesel en el periodo 2002 al 2014



Fuente: MEM (Ministerio de Energía y Minas) www.mem.gob.gt

La Universidad del Valle de Guatemala, en su Centro de Proceso Industriales del Instituto de Investigaciones y el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería, ha operado una planta piloto de producción de ésteres metílicos (biodiesel) de aceite usado por la industria alimenticia por varios años. Así mismo el producto producido, el cual ha cumplido con estándares de calidad, se ha usado en mezclas y puro en un auto de transporte (pick-up) con el objeto de medir el consumo, el mantenimiento del motor y las emisiones de combustión.

1.2.2 Justificación del trabajo

El empleo de levaduras oleaginosas como fuente de aceite para producir biodiesel ha sido previamente estudiado. En diferentes países se han identificado levaduras que acumulan grasa en su célula al crecer en un medio bajo una limitación de nitrógeno.

Por otro lado, el etanol se ha ensayado con diversos aceites para producir ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) o biodiesel. En términos generales, los investigadores han concluido que la reacción de trans esterificación empleando etanol es más lenta que cuando se emplea metanol. Así mismo han encontrado que la conversión aumenta al emplear tecnologías, como el ultrasonido, el cual provoca una mezcla intensa entre las dos fases y genera microzonas de alta energía en el medio las cuales aceleran la reacción.

También se han publicado trabajos de consolidación del proceso, integrando en una sola operación la extracción del aceite de la materia prima con la reacción del mismo con el alcohol correspondiente. Investigadores han empleado diversas materias primas tradicionales como han sido las semillas oleaginosas, pero también han usado aceites no comestibles y microorganismos oleaginosos, algas, bacterias, levaduras y hongos.

Guatemala produce etanol, pero no metanol. De manera que es de importancia estratégica conocer con más profundidad la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). Por otro lado, Guatemala no cubre sus necesidades de consumo de aceites comestibles, ya que se importa principalmente aceites de soya, girasol y maíz para cubrir la demanda. El aceite de palma, aceite conformado principalmente por ácidos grasos saturados, cuyo cultivo ha crecido últimamente, cubre las necesidades internas y el excedente se exporta. En menor escala se cultiva el ajonjolí, cuya semilla se exporta y cubre también el mercado local. Por lo tanto, es de igual importancia estratégica, explorar opciones como los microorganismos oleaginosos, entre ellos las levaduras.

Estas premisas fundamentan y justifican, entonces, la investigación realizada, la cual pretende obtener la información aludida.

I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

I.3.1 Objetivos

I.3.1.1 General

Determinar, evaluar y optimizar la producción de biodiesel empleando la extracción acoplada a una reacción simultánea de biomasa rica en grasa.

I.3.1.2 Específicos

- a) Evaluar y optimizar el rendimiento de ésteres de etilo, para ser empleados como biodiesel, en la extracción etanólica acoplada a una reacción simultánea de la biomasa rica en grasa.
- b) Encontrar y evaluar las condiciones de producción máxima de la biomasa de levadura en hidrolizados ácidos de hemicelulosa provenientes de bagazos de caña de azúcar o de sorgo dulce.
- c) Definir y evaluar etapas de pretratamiento de las semillas de sorgo dulce y hule.
- d) Obtener y evaluar valores óptimos que maximicen el rendimiento de biodiesel de los factores: relación inicial de etanol/biomasa, humedad inicial de biomasa, temperatura de reacción, tipo y concentración de catalizador empleando dos semillas oleaginosas diferentes (semilla de sorgo dulce y semilla de hule).
- e) Obtener y evaluar valores óptimos que maximicen el rendimiento de biodiesel de los factores: relación inicial de etanol/biomasa, humedad inicial de biomasa, temperatura de reacción, tipo y concentración de catalizador empleando dos levaduras diferentes, y
- f) Estimar costo de producción del biodiesel empleando los parámetros obtenidos.

I.3.2 Hipótesis

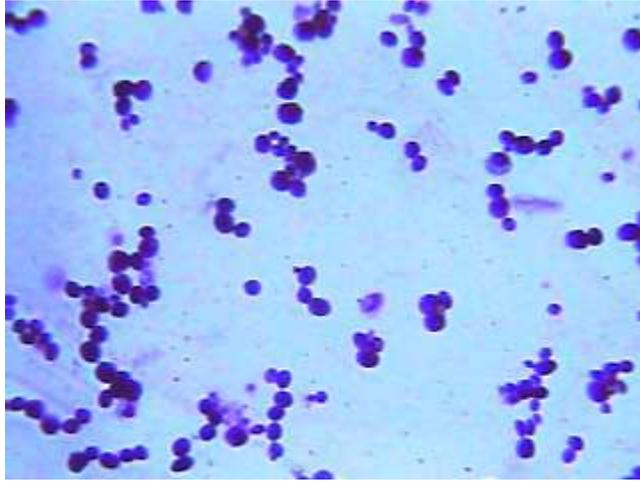
Es posible producir aceite por levaduras oleaginosas en medios conteniendo carbohidratos residuales y es factible extraer el aceite y convertirlo a ésteres etílicos en una sola operación.

I.4 METODOLOGIA

I.4.1 Levaduras oleaginosas

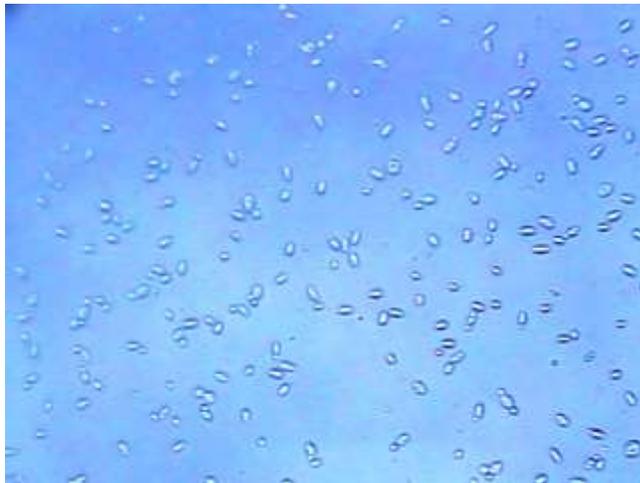
Las cepas de las levaduras oleaginosas *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 y *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 del cepario del Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, fueron adquiridas originalmente del Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands y del Leibnitz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. La Gráfica 2 y 3 presentan una observación microscópica de estas levaduras.

Gráfica 2. *Yarrowia lipolytica* CBS 2075



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 3. *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815



Fuente: FODECYT 003-2012

Las cepas de las levaduras etanólicas *Saccharomyces cerevisiae* CBS 381, 400, 422 y 459 del cepario del Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, fueron adquiridas originalmente del Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Se empleó el protocolo siguiente para el crecimiento en el laboratorio de las levaduras tanto las oleaginosas como las productoras de etanol: a) se traspasó bajo condiciones estériles una mínima cantidad de biomasa a un frasco de 125 mL conteniendo los diferentes medios previamente esterilizados empleados en las diferentes pruebas; b) los frascos se colocaron en agitadores rotatorios a 28 °C y 250 rpm durante 48 h como tiempo mínimo; c) el contenido de

los frascos se centrifugó a temperatura ambiente y a 5,000 rpm; d) se descartó el líquido; e) la biomasa de levadura separada se suspendió en agua a la densidad deseada; y f) se registró la densidad óptica de la suspensión en un espectrofotómetro y la mismo sirvió de inóculo de los medios en los reactores empleados en las diferentes pruebas.

La Gráfica 4 ilustra uno de los agitadores de frascos empleados. La Gráfica 5 muestra la centrífuga usada. La Gráfica 6 enseña el espectrofotómetro utilizado para medir la densidad óptica. La Gráfica 7 muestra el autoclave usado para esterilizar medios.

Gráfica 4. Agitador de frascos, Modelo 25, New Brunswick, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 5. Centrífuga refrigerada, Modelo 5804 R, Eppendorf, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 6. Espectrofotómetro, UV-VIS Mini 1240, Shimadzu, Japan



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 7. Autoclave, Modelo 8000-DSE, Napco, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

Los tallos de sorgo dulce empleados en la experimentación se obtuvieron de trozos previamente fermentados para producir etanol de los azúcares solubles. Los trozos fermentados se habían deshidratado a 65 °C y almacenado. Posteriormente, los trozos se molieron a un tamaño fino de partícula como se muestra en la Gráfica 8. En una muestra del bagazo se estimó la proporción de los principales biopolímeros empleando la metodología de Van Soest.

Gráfica 8. Bagazo de sorgo dulce molido y seco (malla 60)



Fuente: FODECYT 003-2012

Se llevaron a cabo dos tratamientos del bagazo: a) un tratamiento ácido con H_2SO_4 y b) un tratamiento alcalino con NaOH. El objetivo de dichos tratamientos fue romper la estructura lignocelulósica, liberándola parcialmente de lignina, hidrolizando la hemicelulosa a xilosa y arabinosa, y levemente hidrolizando la celulosa a glucosa.

El pretratamiento se llevó a cabo en tubos de vidrio con tapón sellado resistentes a altas temperaturas y presión. Los tubos se muestran en la Gráfica 9.

Gráfica 9. Tubos de vidrio (ACE GLASS)



Fuente: FODECYT 003-2012

El protocolo de operación fue el siguiente: a) se pesaron aproximadamente 5 g de bagazo y se agregaron 50 mL de H_2SO_4 al 1 % en cada tubo. Los tubos se pusieron en la autoclave a 121 °C por 150 min; b) se pesaron aproximadamente 5 g de bagazo y 50 mL NaOH al 2 % en cada tubo. Los tubos se pusieron en la autoclave a 121 °C por 60 min; c) los tubos se enfriaron y se centrifugaron a 5,000 rpm por 4 min, d) la fase líquida se llevó a un pH de 5.5 y se registró el Brix, ver Gráfica 10; e) los sólidos se secaron a 65 °C, se pesaron, y se descartaron.

Gráfica 10. Refractómetro para medir grados Brix (sólidos solubles), Sper Scientific, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

Se colocaron 60 mL del hidrolizado ácido en Erlenmeyers de 125 mL. Un frasco se inoculó con 6 mL de una suspensión de *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 con una densidad óptica de 1.813. El otro frasco, se inoculó con 6 mL de una suspensión de *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 con una densidad óptica de 1.793.

Por otro lado, Se colocaron 30 mL del hidrolizado alcalino en Erlenmeyers de 125 mL. Un frasco se inoculó con 3 mL de una suspensión de *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 con una densidad óptica de 1.813. El otro frasco, se inoculó con 3 mL de una suspensión de *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 con una densidad óptica de 1.793.

Todos los frascos se agitaron a 250 rpm por 7 días mantenidos a 30 °C. Al finalizar se separó por centrifugación la biomasa de la levadura. Se secó y se pesó. En la misma se determinó el contenido de aceite con el método explicado más adelante.

Las pruebas de aumento de escala de la fermentación se llevaron a cabo en un fermentador de 1 litro de capacidad, con control de temperatura y pH. El equipo se observa en la Gráfica 11.

Gráfica 11. Fermentador BioStat A-Plus, Sartorius, Suiza



Fuente: FODECYT 003-2012

La agitación empleada varió según la prueba y el flujo de aire se mantuvo constante en todas las pruebas alrededor de 0.8 a 0.9 vvm. El equipo estaba controlado por medio de una computadora la cual registraba los valores de los diferentes parámetros, ver Gráfica 12.

Gráfica 12. Fermentador BioStat A-Plus y computadora ACER, Sartorius, Suiza



Fuente: FODECYT 003-2012

Las muestras del líquido en el fermentador se obtuvieron por medio de un dispositivo de toma de muestras. Generalmente se obtuvieron 10 mL. Estos se centrifugaron en una centrífuga de tubos. La fase líquida se envió para un análisis y los sólidos se deshidrataron a 60 °C.

La Gráfica 13 muestra la centrífuga de tubos y la Gráfica 14 el horno para deshidratar la biomasa en los tubos.

Gráfica 13. Centrífuga de tubos, Fischer Scientific Modelo 228, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 14. Horno deshidratador Symphony VWR, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

En las pruebas con jugo de sorgo en las que primero se produjo etanol y luego se crecieron las levaduras oleaginosas, el procedimiento fue el siguiente. La fermentación para producir etanol se llevó a cabo en el mismo fermentador de 1 litro, a una temperatura controlada de 30 °C, sin agitación y por supuesto sin inyección de aire. El fermentador se inoculaba con una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* en proporción de un 10 % en volumen. En algunas pruebas, el líquido en frascos de vidrio se colocó en una incubadora a 30 °C, como se aprecia en la Gráfica 15.

Gráfica 15. Incubadora LabLine, Imperial III, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

El tiempo de fermentación varió entre 48 a 96 h en las diferentes pruebas. Al finalizar la fermentación etanólica, el líquido se centrifugó por 5 min a 3,000 rpm y 10 °C. Ver Gráficas 16 y 17.

Gráfica 16. Centrífuga refrigerada, Sorvall, Modelo RT7, UK



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 17. Recipientes de 1 L para centrifugar la suspensión de levadura en etanol y agua



Fuente: FODECYT 003-2012

La levadura separada se descartó. La fase líquida se llevó a un evaporador Soxhlet para separar el etanol destilado, como se aprecia en la Gráfica 18.

Gráfica 18. Evaporador tipo Soxhlet para separar el etanol



Fuente: FODECYT 003-2012

La fase líquida sin etanol se esterilizó en el fermentador de 1 litro y se inoculó con una suspensión de la levadura oleaginoso en una proporción de 10 %. El crecimiento de dicha levadura procedió de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente.

Al finalizar el crecimiento de las levaduras oleaginosas se procedió de la siguiente manera. El líquido se centrifugó por 5 min a 3,000 rpm y 10 °C. Se descartó el líquido y la biomasa de levadura se secó a 60 °C. Se pesó y se procedió a cuantificar el contenido de aceite o materia grasa de acuerdo a la técnica de Blight y Dyer con algunas modificaciones (Zhu et al, 2008; Mandal y Malik, 2009; Chen et al, 2009; Liang et al, 2012), Aproximadamente 80 mg de biomasa seca se colocaron en un tubo de 15 mL. Se adicionaron 2 mL de metanol y 1 mL de cloroformo y se agitaron, ver Gráfica 19, por 1 min. La suspensión se dejó a temperatura ambiente por 24 h. Se adicionó 1 mL de cloroformo y se agitó por 1 min. Luego se adicionaron 1.8 mL de agua destilada y se agitó por 2 min. El contenido se centrifugó por 10 min a 2,000 rpm. La capa líquida inferior se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se recibió en un recipiente de peso conocido. El recipiente se colocó en un horno a 60 °C por 24 h. El recipiente se pesó y se estimó el contenido de aceite crudo de la biomasa seca levadura.

Gráfica 19. Agitador vortex de tubos, Fisher Scientific, USA



Fuente: FODECYT 003-2012

El análisis de azúcares, sacarosa, glucosa y fructosa, se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta presión, Agilent 1100, empleando un detector de índice de refracción Agilent 1200, una columna Zorbax NH2, de 25 cm de largo, 4.6 mm de diámetro interno, y como solvente acetonitrilo en agua (70-30). El etanol se determinó en un cromatógrafo de gases, Agilent 6890N, con una columna HP-Plot/Q de 30 m de longitud y 3.2 mm de diámetro interno.

Las Gráficas 20 y 21 muestran los equipos de cromatografía.

Gráfica 20. Cromatógrafo líquido de alta presión



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 21. Cromatógrafo de gases



Fuente: FODECYT 003-2012

I.4.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas

Las pruebas de trans-esterificación de aceites comestibles con etanol y KOH como catalizador se llevaron a cabo en un balón de vidrio de tres bocas. Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo a un diseño factorial 2^3 con repetición del punto central. En todas las pruebas se empleó una probeta de ultrasonido a 90 % de amplitud operada intermitentemente, 3 seg de acción y 7 seg de descanso (Hielscher Ultrasonic UP100H, Alemania). El balón se encontraba en una chaqueta con la que se llevó la temperatura inicial de reacción entre 35 a 48 °C. El equipo se ilustra en la Gráfica 22.

Gráfica 22. Reactor de trans-esterificación con probeta de ultrasonido en donde se llevaron a cabo las pruebas del diseño factorial 2^3



Fuente: FODECYT 003-2012

Se tomaron muestras de aproximadamente 3 mL a diferentes tiempos hasta 60 min. Las muestras se lavaron con agua tres veces, se removió el agua residual de la capa aceitosa por calor y se registró su índice refracción a 40 °C (Refractómetro Atago RX 5000, USA), ver Gráfica 23.

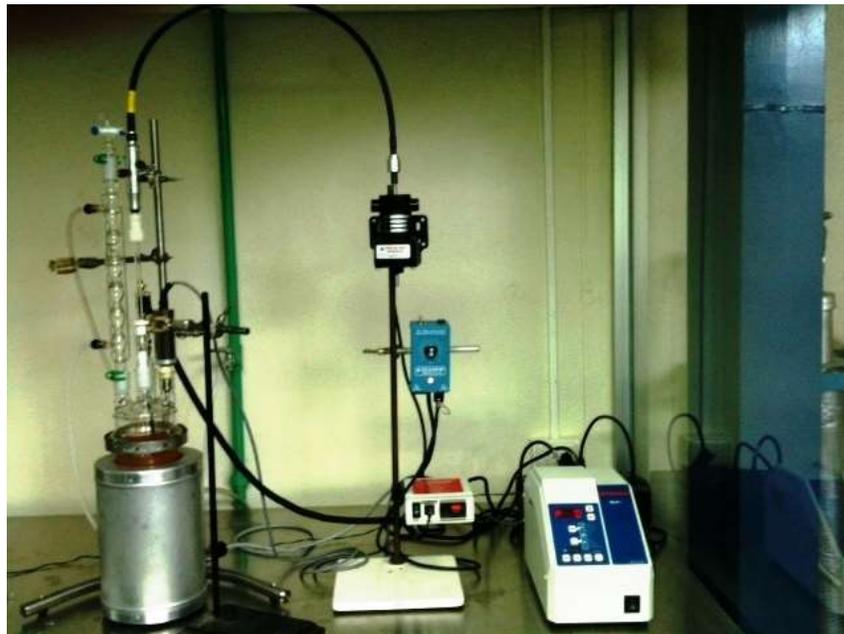
Gráfica 23. Refractómetro para medir índice de refracción



Fuente: FODECYT 003-2012

La reacción de trans-esterificación en condiciones óptimas se llevó a cabo en el reactor de dos litros (ACE Glass) adquirido con fondos del proyecto, empleando la unidad de ultrasonido Branson Modelo SLPe con una probeta 4C15, adquirida también con fondos del proyecto, con una amplitud de 60 % operando en forma intermitente con un ciclo repetitivo de operación de 3 seg seguido de un descanso de 10 seg. La reacción se llevó a cabo por 60 min y con leve agitación mecánica a una temperatura entre 40 y 50 °C. Ver Gráfica 24.

Gráfica 24. Equipo de trans-esterificación “escala de banca” (*bench scale*)



Fuente: FODECYT 003-2012

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo Agilent Modelo 6850, una columna DB-WAX de 60 m, 0.25 mm de diámetro interno y una recubierta de 0.25 μ m. El programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial 50°C rampa a 5°C/min y temperatura final 250°C por 20 min. La temperatura del inyector fue de 250°C. Se empleó un detector de masas Agilent Modelo 5975C VLMSD para la identificación de los compuestos separados.

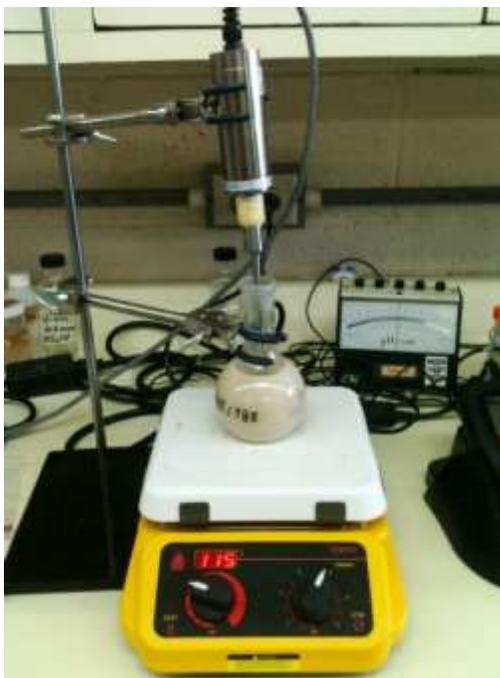
Las pruebas de la trans-esterificación *in situ* se llevaron a cabo en un balón de vidrio de 250 mL de capacidad. Se acopló la probeta de ultrasonido por la parte superior, de manera que la punta de la misma estaba de 2 a 3 mm sumergida en el etanol alcalino. El recipiente descansaba sobre una mesa de agitación magnética con la cual el sólido se mantenía suspendido en el etanol alcalino durante la reacción. Se llevaron a cabo dos ensayos con diferentes materia primas: a) residuo de la extracción de café y semillas de ajonjolí. El primero es un residuo de la industria de café y el segundo representa un ejemplo de semilla oleaginosa. La instalación del equipo se aprecia en las Gráficas 25 y 26.

Gráfica 25. Equipo empleado en la trans-esterificación *in situ* o reacción extractiva del desecho de café.



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 26. Equipo empleado en la trans-esterificación in situ o reacción extractiva de semillas de ajonjolí



Fuente: FODECYT 003-2012

En la prueba con residuo de la extracción de café se procedió de la manera siguiente: se colocaron 20 g de residuo con una humedad de 2.85 %. El material se había recolectado de diferentes oficinas en la UVG y se deshidrató en un horno a 65 °C. Se disolvieron 0.03 g de KOH en 200 mL de etanol absoluto. El etanol alcalino se adicionó al balón que contenía el residuo de café extraído, se inició la agitación y la probeta de ultrasonido. El ultrasonido funcionó cada 15 min, con una amplitud de 60 %, durante 3 seg. y 10 seg. de descanso. El proceso duró cuatro horas. Se filtró la suspensión y se procedió a evaporar el exceso de etanol. Se centrifugó, separándose dos capas, las cuales se analizaron por cromatografía de gases como antes se indicó.

En la prueba con semilla de ajonjolí se procedió de la manera siguiente: se obtuvo semilla de ajonjolí comercial sin corteza y se deshidrató en un horno a 65 °C. Luego se molió la semilla en un molino Wiley de laboratorio. Se colocaron 20 g de semilla molida con una humedad de 1.94 % en un balón de 250 mL. Se disolvieron 0.12 g de KOH en 200 mL de etanol absoluto. El etanol alcalino se adicionó al balón que contenía la semilla molida, se inició la agitación y la probeta de ultrasonido. El ultrasonido funcionó cada 15 min, con una amplitud de 60 %, durante 3 seg. y 10 seg. de descanso. El proceso duró cinco horas. Se centrifugó la suspensión y se procedió a evaporar el exceso de etanol. Los ésteres etílicos se analizaron por cromatografía de gases como antes se indicó.

En ambos casos el etanol se evaporó en un evaporador rotatorio Brinkman con vacío mostrado en la Gráfica 27.

Gráfica 27. Equipo empleado para evaporar el exceso de etanol operando al vacío



Fuente: FODECYT 003-2012

PARTE II

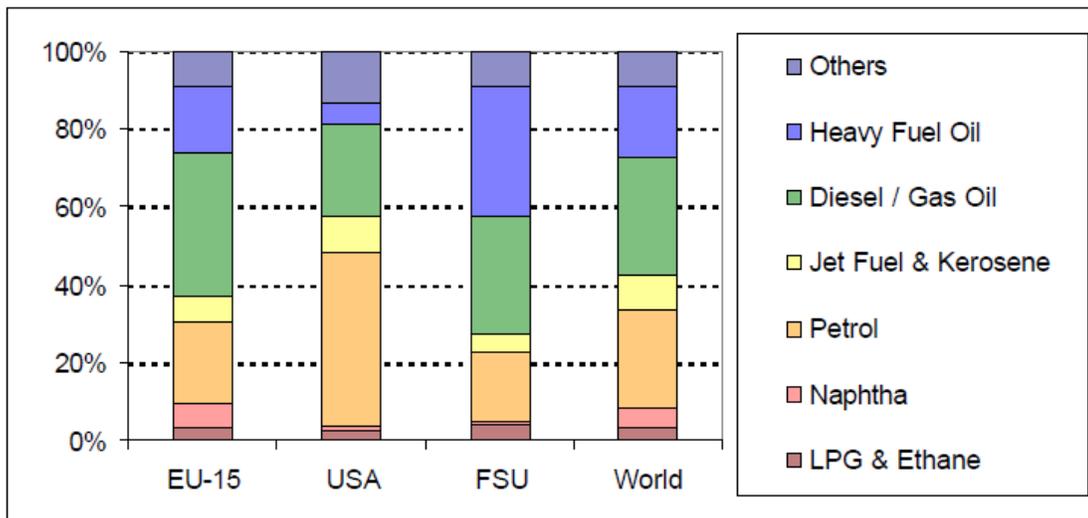
II.1 MARCO TEÓRICO

II.1.1 ¿Qué es el diesel?

El diesel y la gasolina son las fracciones mayoritarias provenientes de la refinación del petróleo y ambas constituyen los combustibles líquidos empleados en el transporte. La gasolina es una mezcla de hidrocarburos con una cadena de carbono entre C4 y C12. El diesel por el contrario, su cadena está entre C11 y C25. Las gasolinas se emplean en los motores Otto de combustión por chispa. El diesel en motores Diesel de combustión por compresión. Es interesante conocer que Nicolás Augusto Otto desarrolló su primer prototipo de motor de encendido por chispa para emplear etanol como combustible. A su vez, Rodolfo Diesel lo diseñó para emplear aceites vegetales. Es decir ambos combustibles renovables. La industria del petróleo vino a cambiar la historia y pareciera que cuando el mismo se agote, los motores regresarán a los combustibles originales. Los motores diesel muestran un mejor consumo energético y producen menos gases de invernadero que los motores de gasolina, y es por ello que a nivel mundial se emplea una mayor cantidad de diesel que de gasolina. Como puede verse en la Gráfica 28 solamente en Estados Unidos de América la gasolina es mayoritaria.

Gráfica 28. Productos de refinación a nivel mundial por región

Refinery output breakdown in EU-15, USA, Former Soviet Union (FSU) and in the world in 2001, (%)



Fuente: Kavalov y Peteves (2004)⁷

⁷ Kavalov B, SD Peteves (2004) *Impacts of the increasing automotive diesel consumption in the UE* European Commission, Directorate General Joint Research Centre (DG JRC) Institute for Energy, Petten, The Netherlands

II.1.2 ¿Cuáles son los substitutos del diesel obtenidos de recursos renovables?

Como se mencionó antes en el inicio del motor de combustión por compresión o diesel se emplearon como combustible diversos aceites vegetales, y debido a su alta viscosidad, el motor poseía inyectores relativamente grandes. Este inconveniente y además, una baja volatilidad y alto costo, incidió en que los aceites vegetales no se emplean actualmente en los diseños modernos del motor diesel⁸. Se han ensayado, sin embargo, varias alternativas para disminuir la viscosidad de los aceites vegetales. Entre ellas están, la dilución, la micro-emulsificación y la pirólisis⁹. Sin embargo la alternativa que originó el combustible denominado biodiesel fue la transformación de los aceites vegetales por una reacción de trans-esterificación.

Conviene brevemente mencionar que debido a la posible competencia entre la producción de alimentos y de combustibles empleando la misma materia prima, en este caso los aceites vegetales comestibles, están desarrollo procesos para producir biocombustibles de segunda generación. En el caso del diesel, se encuentran en desarrollo: a) el hidro-procesamiento de aceites y grasas para producir hidrocarburos saturados, y b) la gasificación y síntesis Fischer-Tropsch de biomasa lignocelulósica para producir hidrocarburos saturados¹⁰. Los hidrocarburos son parafinas que como combustible son equivalentes al diesel del petróleo.

II.1.3 La reacción de trans-esterificación para producir biodiesel

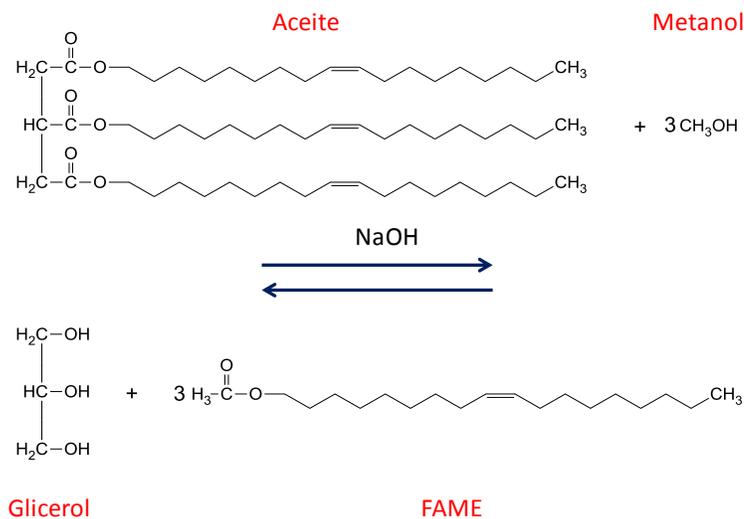
Una alternativa para reducir la viscosidad de los aceites vegetales es la conversión de los ácidos grasos a ésteres de un alcohol más simple que el glicerol. En otras palabras, el aceite original es un compuesto formado por triglicéridos, o sea, ácidos grasos unidos al glicerol, ver Gráfica 29. La reacción de trans-esterificación consiste en remover, por la acción de un catalizador, el glicerol y unir los ácidos grasos a otro alcohol. El alcohol más empleado ha sido el metanol y el catalizador el hidróxido de sodio. De manera que lo que se forma son ésteres metílicos de ácidos grasos o FAME por sus siglas en inglés y glicerol.

⁸ Bart JCJ, Palmieri N, Cavallaro S (2010) *Biodiesel Science and Technology* Woodhead Publishing Ltd Chapter 4, p114

⁹ Sarin A (2012) *Biodiesel Production and Properties* RSC Publishing Chapter 2, p5

¹⁰ Bart et al loc.cit. Chapter 15, p726

Gráfica 29. Reacción de trans-esterificación



Fuente: FODECYT 003-2012

II.1.4 La producción global de biodiesel

En el año 2011 se ha estimado que la producción mundial anual de biodiesel fue de aproximadamente 14,441 ML¹¹. La región en donde más se produjo fue en Europa con un 44 %. El Cuadro 1 siguiente muestra el listado por países.

Cuadro 1. Principales países productores de biodiesel en el año 2001 en % del total

País	%
EEUU	15.63
Alemania	12.88
Argentina	11.73
Brasil	11.41
Francia	8.42
Indonesia	4.95
España	2.97
Italia	2.77
Tailandia	2.53
Holanda	2.38
Colombia	2.23

¹¹ U.S. Energy Information Administration www.eia.gov ML = millones de litros

Bélgica	2.15
China	1.93
Polonia	1.86
Corea del Sur	1.56
Austria	1.54
Portugal	1.36
República Checa	1.02
Gran Bretaña	0.99

Fuente: FODECYT 003-2012

El mercado de biodiesel en Europa es grande y crecerá en el futuro debido a regulaciones de la unión europea en materia de energías renovables. Por el momento utiliza únicamente el 50 % aproximadamente de la capacidad de producción instalada. Por otro lado importa principalmente de Argentina, debido a un mejor precio. Sin embargo esta situación es volátil y depende de factores políticos. Se prevé un aumento en la producción en Polonia, España, y Francia. La mayoría de las plantas tienen una capacidad instalada de 100,000 a 200,000 toneladas por año, es decir, 380,000 a 760,000 litros por día (Covrig y Bosch-Gual, 2010).

II.1.5 ¿Qué materias primas y cuál es el proceso industrial más empleado?

Las materias primas usadas en los procesos industriales son: a) aceites vegetales comestibles refinados, b) metanol y c) catalizadores alcalinos, NaOH o KOH. Entre los aceites vegetales están los siguientes (Hanna et al, 2005; Canakci y Sanli, 2008; Azócar et al, 2010; Balat, 2011; Shahid y Jamal, 2011):

Cuadro 2. Aceites vegetales refinados empleados como materia prima en la producción industrial del biodiesel por región

Región	Aceite
Norteamérica	Soya y canola
Suramérica	Soya
Europa	Colza y girasol
Sureste asiático	Palma y coco

Fuente: FODECYT 003-2012

La Gráfica 30 reproduce una imagen global del uso de diferentes aceites refinados comestibles en la producción de biodiesel por país (Lin et al, 2011):

Gráfica 30. Aceites comestibles refinados empleados en la producción de biodiesel



Fuente: Lin et al (2011)

El proceso comercial empleado es el de la trans-esterificación empleando metanol y NaOH disuelto en metanol, formado un metóxido, como catalizador. Las gráficas siguientes muestran diagramas de flujo de dicho proceso, desde el diagrama de bloques hasta un diagrama con los equipos principales identificados.

En la Gráfica 31 se explica en forma de bloques el proceso comercial. Se observa que se parte de un aceite vegetal neutro, es decir con un contenido mínimo de ácidos grasos libres (usualmente <0.5%), al cual en el reactor se le agregan las proporciones adecuadas de metanol y de soda cáustica o hidróxido de sodio como catalizador. Como productos se obtienen el biodiesel crudo, el glicerol y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres. El biodiesel se purifica y se determina la calidad de los ésteres metílicos producidos de manera que cumplan con normas internacionales.

Gráfica 31. Diagrama de bloques del proceso industrial para producir biodiesel

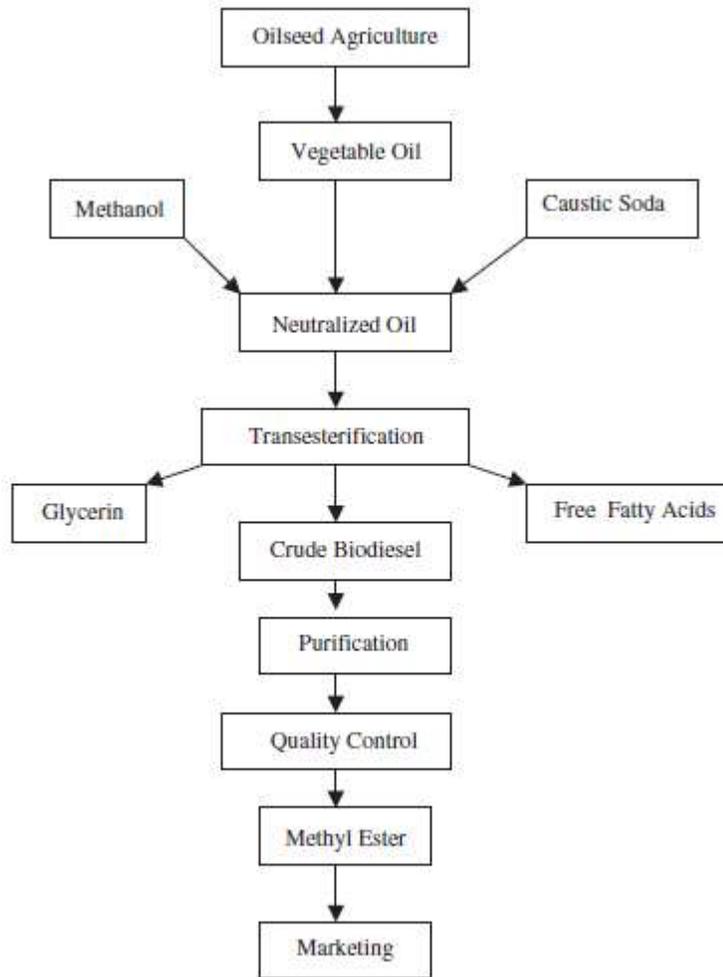


Fig. 1. Biodiesel processing flow diagram.

Fuente: Demirbas (2007)

La Gráfica 32 reproduce un diagrama de flujo ilustrando el equipo principal del proceso. Se observa un tanque preparador del catalizador en donde se mezcla el metanol con el hidróxido de sodio. Este se adiciona a dos reactores operando en serie en donde toma lugar la transesterificación del aceite. El producto del segundo reactor se separa en dos fases. La fase superior se lava con agua, se vuelven a separar las fases y el biodiesel se purifica en una columna de destilación. La fase inferior de los decantadores contiene el metanol sin reaccionar, el cual se recupera por destilación para volver a emplearse en el proceso.

Gráfica 32. Diagrama de flujo mostrando principales equipos

J.M. Marchetti/ Energy Conversion and Management 52 (2011) 3227–3233

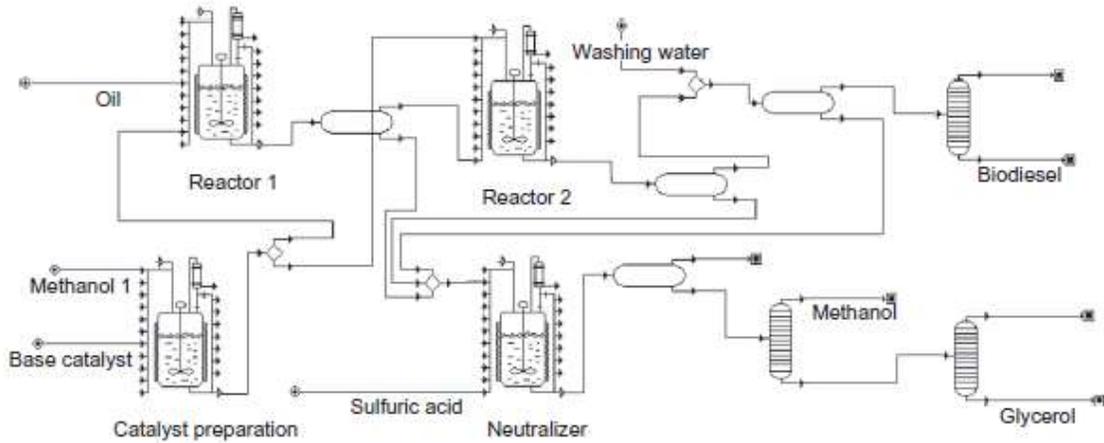
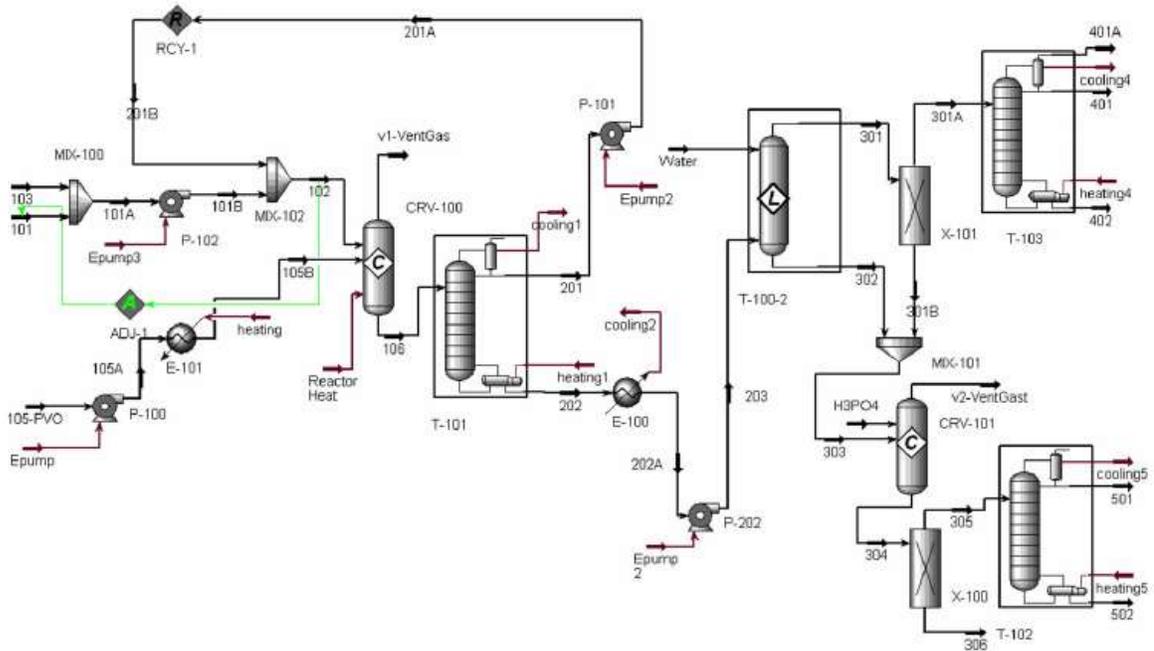


Fig. 1. Flow diagram of the process under studied.

Fuente: Marchetti (2011)

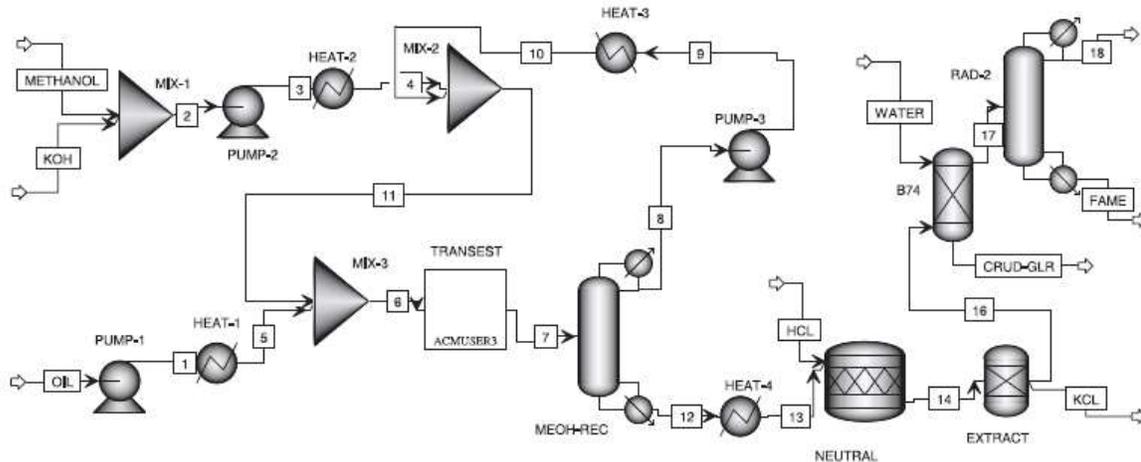
En las Gráficas 33 y 34 se muestran diagramas de flujo más completos empleados en la elaboración de balances de masa y de energía, diseño preliminar de equipo y estimación de costos de producción.

Gráfica 33. Diagrama de flujo detallado mostrando equipos principales y complementos



Fuente: West et al (2008)

Gráfica 34. Diagrama de flujo detallado mostrando equipos principales y complementos



Fuente: Vlysidis et al (2011)

II.1.6 Costos de producción del proceso alcalino empleando metanol y aceites vegetales

La mayoría de autores que han publicado costos de producción del biodiésel coinciden en que los factores significativos que inciden en el costo son: a) costo del aceite empleado como materia prima, b) tamaño de la planta y c) el valor de la glicerina producida como subproducto.

El Cuadro 3 ofrece un resumen de indicadores económicos en donde la glicerina se ha vendido como subproducto. Debe tenerse precaución al comparar los resultados de los diferentes estudios ya que fueron realizados en diferentes países. Los primeros tres de ellos, no incluyeron tasas de retorno de capital en los estimados de costos de producción. El costo de producción osciló entre Q15.6 y Q21.8 por galón. Por el contrario los dos últimos si lo han incluido y el costo de producción osciló entre Q19.9 y Q33.3 por galón. El costo del aceite empleado como materia prima varió entre los diferentes estudios, desde un 55 hasta un 94%. Esta variación depende del tipo de aceite y de la capacidad de la planta. Conforme aumenta la capacidad de la planta el porcentaje aumenta, como se observa en la Gráfica 35. Por el contrario el precio total de producción disminuye conforme aumenta la capacidad de la planta, como se observa en la Gráfica 36.

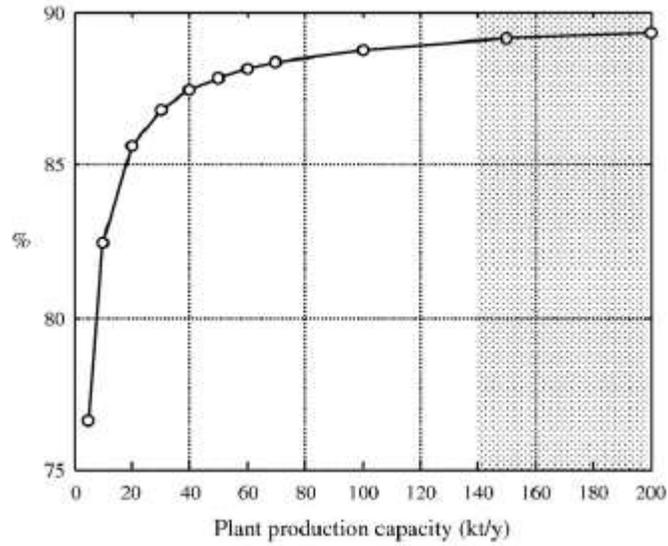
Cuadro 3. Indicadores económicos estimados en la producción de biodiesel de aceites vegetales

	Zhang et al (2003)	Haas et al (2006)	You et al (2008)	Apostolakou et al (2009)	Marchetti (2011)
Capacidad de biodiesel Mg/año	8,000	43,262	8,000	50,000	150,480
Capacidad de biodiesel L/día	25,575	103,710	25,575	159,844	481,066
Aceite	Se	Soya	Soya	Colza	Se
Costo fijo \$ * 10 ⁻⁶	1.17	3.62	1.17	5.2	26.34
Inversión total \$ * 10 ⁻⁶	1.34	11.35	1.35	9.4	34.87
Costo total de manufactura \$ * 10 ⁻⁶	6.86	20.04	6.89	65.9	118.21
Costo de producción \$/Mg	858	463	862	1,318	786
Costo de producción \$/L	0.73	0.53	0.74	1.13	0.67
Costo de producción Q/galón	21.6	15.6	21.8	33.3	19.9

Se = sin especificar

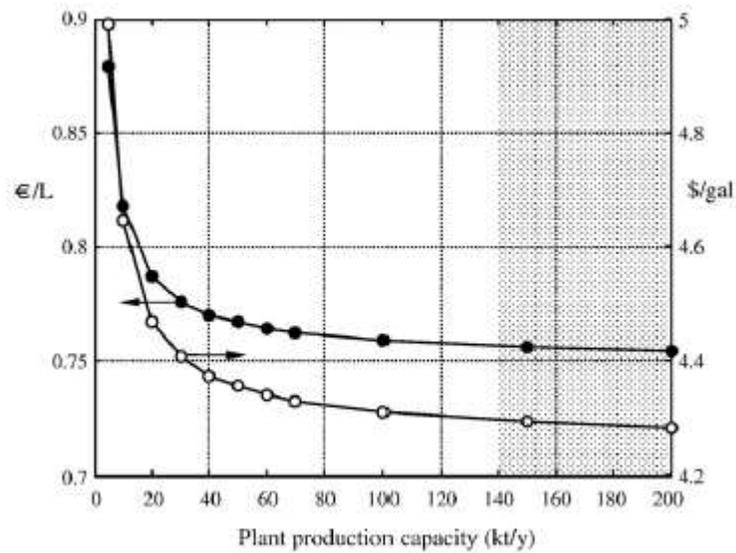
Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 35. Costo de aceite como % del costo total de producción en función de la capacidad de la planta



Fuente: Apostolakou et al (2009)

Gráfica 36. Costo de producción del biodiesel en función de la capacidad de la planta



Fuente: Apostolakou et al (2009)

Los precios actuales de aceites (soya, girasol, palma) están entre US\$750 y US\$850 por lo que inciden fuertemente en el costo de producción del biodiesel. Una alternativa para disminuir este costo es que el proceso incluya una planta extractora del aceite de la semilla. Y aun más, podría también poseer tierra suficiente para cultivar la planta oleaginosa, de manera que en la estructura de costos se eliminen los costos de los pasos intermedios, es decir, la venta de la semilla y la venta del aceite.

El estudio reciente de Miller et al (2012) ofrece algunos datos económicos de la alternativa anterior. Fue realizado en Canadá en donde las semillas oleaginosas seleccionadas en ese país son la canola y la camelina. El costo del aceite obtenido varió dependiendo de la capacidad de la planta extractora y del precio al cual se vendería la torta sin aceite producida en el mercado de concentrados para animales. Para canola el costo del aceite estuvo entre Q.16.00 y Q.18.00 por galón. Para camelina, alrededor de Q.8.00 por galón.

II.1.7 Empleo de aceites desechados o reciclados y aceites que no se emplean en la alimentación humana como materias primas

Entre las fuentes oleaginosas desechadas que han sido estudiadas para producir biodiesel están: a) el *soapstock*, b) grasas de origen animal, c) aceite reusado de frituras industriales y comerciales y d) aceite contenido en el chingaste del café. Todas ellas de bajo o ningún costo nominal pero con limitaciones en su composición química.

El *soapstock* es un subproducto considerado un desecho que se obtiene durante la purificación de los aceites vegetales. Es una emulsión acuosa y alcalina de aceite y de ácidos grasos libres. El agua y la alta acidez impiden emplear el método tradicional de transesterificación. Varios investigadores han empleado una transesterificación ácida previa una remoción del agua por secado (Haas et al, 2005; Usta et al, 2005; Keskin et al, 2008). Recientemente se han reportado resultados empleando diferentes agentes catalíticos, sólidos super-ácidos (Li et al, 2010) y enzimático con lipasa (Su y Wei, 2014).

Entre las grasas de origen animal están el sebo y la manteca que se obtienen en el destace de los animales. Su calidad difiere no solo por la clase de animal, rumiantes, cerdos, aves, sino que de la tecnología empleada en el destace y la práctica de manufactura. La grasa de mejor calidad tiene un contenido de ácidos grasos libres entre 0.5 a 7.0 %. Las otras, entre 10 a 20 %¹². En el primer caso varios autores han demostrado resultados satisfactorios con la transesterificación alcalina (Alcántara et al, 2000; Tashtoush et al, 2004; Bhatti et al, 2008; Oner y Altun, 2009) y con la enzima lipasa (Lu et al, 2007). También se ha informado de una reacción catalizada con heteropoliácidos, un catalizador sólido estable (Cao et al, 2008). Para el segundo caso, varios autores han empleado dos etapas en serie, con diferentes variantes, incluso en mezclas con aceites vegetales. La primera, una esterificación ácida que convierte los ácidos grasos libres, seguida de la transesterificación alcalina tradicional (Canoira et al, 2008; Ngo et al, 2008; Dias et al, 2009; Guru et al, 2009, 2010). Al emplear la grasa de bajo costo como

¹² Bart et al (2010) loc.cit. P.197

materia prima del proceso, el costo unitario de producción disminuye como ha sido informado por Nelson y Schrock (2006). En el pasado fue común emplear el sebo y la manteca como materias primas en los concentrados para animales. Debido a la potencial transmisión al ser humano de priones infecciosos, agentes causantes de una serie de encefalopatías esponjosas bovinas, las agencias reguladoras en diferentes países restringieron dicho uso. Lo anterior ha causado un inusitado interés en convertirlas en biodiesel. Recientemente Seidell et al (2006) informaron de resultados experimentales en las cuales en todas las etapas de producción de biodiesel los priones infecciosos se reducían, por lo que concluyeron que el proceso era seguro.

En muchas partes del mundo se emplea la fritura en la preparación de alimentos. El aceite se reutiliza por un tiempo y luego se desecha. Su empleo en la producción de biodiesel ha sido estudiado en detalle (Canakci, 2007; Banerjee y Chakraborty, 2009; Enweremadu y Mbarawa, 2009; Öner y Altun 2009; Gürü et al, 2009; 2010; Lam et al, 2010; Sabudak y Yildiz, 2010; Maddikeri et al, 2012; Yaakob et al, 2013). El aceite contiene niveles altos de ácidos grasos libres y cierta humedad que lo convierte en una materia prima complicada. Lo anterior incide en el proceso alcalino de trans-esterificación e interfiere en la separación de los ésteres formados y el glicerol. Es por esto que el proceso recomendado ha sido el de dos etapas en serie, una con catálisis ácida para convertir los ácidos grasos libres a ésteres, seguida de una catálisis alcalina para trans-esterificar. Las referencias siguientes informan de los detalles del proceso de dos etapas y los resultados obtenidos (Wang et al, 2007; Issariyakul et al, 2007; Phan y Phan, 2008). En el caso de aceites reusados con menos cantidad de ácidos grasos libres se ha logrado obtener biodiesel con el proceso usual de catálisis alcalina (Felizardo et al, 2006; Leung y Guo, 2006; Zheng et al, 2006; Bautista et al, 2009; Charpe y Rathod, 2011).

Los residuos que quedan de café tostado que se ha usado para preparar la bebida contienen alrededor de un 15 % de aceite. Se han publicado artículos sobre la extracción del mismo y su conversión a biodiesel. Principalmente por investigadores fuera de los países productores, ya que en ellos es donde existe un mayor consumo de café y por lo tanto más disponibilidad del residuo. Kondamudi et al (2008) emplearon el clásico proceso alcalino en una etapa obteniendo una alta conversión. Al-Hamamre et al (2012) emplearon el proceso de dos etapas, esterificación ácida seguida de una trans esterificación alcalina, ya que el aceite extraído contenía 3.65 % de ácidos grasos libres, estando fuera del límite para el proceso normal. Kwon et al (2013) propusieron un proceso para producir tanto etanol como biodiesel de los residuos de café. Primero hidrolizaban con ácido sulfúrico diluido la celulosa contenida en los residuos. La glucosa liberada se empleaba para producir etanol. El residuo se extraía el aceite y se trans esterificaba sin catalítico a una temperatura elevada, 380 °C. Finalmente Vardon et al (2013) propusieron la estrategia de extraer el aceite, convertirlo a biodiesel empleando el proceso de dos etapas, ácido y álcali. Los residuos eran pirolizados para obtener un aceite sintético y residuo rico en carbono como subproductos.

Las plantas productoras de aceites que no se emplean en la alimentación humana han recibido bastante atención y el lector podrá consultar referencias recientes (Azocar et al 2010; Janaum 2010; Karmakar et al, 2010; Balat 2011; No, 2011; Borugadda et al, 2012; Pinzi et al 2014). El Cuadro 4 ofrece una lista de las plantas que se han identificado como posibles fuentes de aceite no edile.

Cuadro 4. Plantas de interés como fuentes de aceite

Table 2
Various inedible vegetable oils with oil and free fatty acid contents.

Vegetable oil	Oil content	
	Seed (wt%)	Kernel (wt%)
<i>Jatropha (Jatropha curcas)</i>	20-60	40-60
Karanja (<i>Pongamia pinnata</i>) = Honge	25-50	30-50
Mahua (<i>Madhuca indica</i>)	35-50	50
Linseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	35-45	
Rubber (<i>Hevea brasiliensis</i>)	40-60	40-50
Cottonseed	17-25	
Neem (<i>Azadirachta indica</i>)	20-30	25-45
Putranjiva (<i>Putranjiva roxburghii</i>)	42	
Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	36-41	17
Polanga (<i>Calophyllum inophyllum</i>)	65	22
Cardoon (<i>Cynara cardunculus</i>)	25-26	
Deccan hemp (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	13	
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	45-50	
Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)	45-55	
Moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	33-41	2.9
Poon (<i>Sterculia foetida</i>)	50-55	
Koroch seed (<i>Pongamia glabra</i>)	33.6	
Desert date (<i>Balanites aegyptiaca</i>)	45-50	
Eruca Sativa Gars	35	
See mango (<i>Cerbera odollam</i>)	54	6.4
Pilu (<i>Salvadora oleoides</i>)	45	
Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	38	
Syringa (<i>Melia azedarach</i>) = Persian lilac	10-45	2.8
Milkweed (<i>Asclepias syriaca</i>)	20-25	0.019
Field pennycress (<i>Thlaspi arvense</i> L.)	20-36	
Stillingia (<i>Sapium sebifeum</i> Lin. Roxb)	13-32	
Radish (<i>Raphanus sativus</i>)	40-54	
Ethiopian mustard (<i>Brassica carinata</i>)	42	2.2-10.8
Tomato seed	32-37	
Kusum (<i>Scheuchera triguga</i>)	10.65	
<i>Michelia champaca</i>	45	
<i>Garcinia indica</i>	45.5	
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	24-28	25

Fuente: No (2011)

Es pertinente indicar que no es suficiente que una planta tenga una semilla con alto contenido de aceite, pues necesario asegurarse que existe la tecnología agrícola apropiada para su cultivo en plantaciones a escala industrial. La mayoría de las plantas listadas no la posee, pues se cultiva en pequeño o se recolecta de la forma silvestre en que crece. Han sido publicados trabajos que ofrecen resultados experimentales de la producción de FAME y FAEE de algunos de estos aceites. Por ejemplo, en el caso del aceite de ricino (*Ricinus communis*) Meneghetti y colaboradores presentaron estudios de producción de FAEE del aceite solo y en mezcla con aceite de algodón (Meneghetti et al, 2006a; 2006b); da Costa Barbosa et al (2010) FAEE de mezclas de aceites de ricino y soya; Koberg y Gedanken (2012) producción de FAME empleando microondas y ultrasonido; Thomas et al (2013) FAEE y Fang et al (2013) FAME empleando líquidos iónicos.

Para el país dos de estas materias primas podrían considerarse preliminarmente. El aceite de la semilla de hule, por las plantaciones que ya existen; y la *Jatropha* o piñón como se le conoce acá, por las inversiones que se han efectuado previamente, las cuales no han sido exitosas comercialmente..

El aceite de semilla de hule presenta el problema de contener un alto contenido de ácidos grasos libres, el cual varía considerablemente dependiendo del tiempo de almacenamiento de las mismas (Zhu et al, 2011). Ikwuagwu et al (2000) emplearon el proceso normal para producir FAMES con aceite refinado con un valor ácido de 1.0. Ramalho et al (2005) con un aceite crudo con un valor ácido de 34, emplearon el proceso con dos etapas, en el orden usual, primero reacción ácida seguida de una reacción alcalina. En forma similar procedieron, Jose et al (2011), Satyanarayana y Muraleedharan (2011) quienes trabajaron con un aceite con un valor ácido de 48. Khan et al (2010) emplearon únicamente catálisis ácida en una mezcla en igual proporción de aceites de semilla de hule y de palma, la cual tenía un valor ácido inicial de 31.9. Ragavan y Roy (2011) igualmente emplearon catálisis ácida con ayuda de ultrasonido. Yan et al (2011) emplearon como catalizador acrilato de sodio impregnado con hidróxido de sodio. Finalmente Abdulkadir et al (2012) emplearon una reacción in situ empleando semillas secas finamente molidas, metanol y KOH como catalizador.

La jathropa se alzó como el cultivo más apropiado para países en vías de desarrollo para producir biodiesel a partir del aceite contenido en su semilla, principalmente en tierras sin uso con suelos pobres y poca irrigación. De esta manera se establecieron programas agrícolas con la participación de agricultores en varios países, especialmente en Asia (India y China y en África Oriental (Tanzania). De acuerdo con Kant y Wu (2011) dicho desarrollo no ha llenado las expectativas y su futuro es incierto. El principal problema es agronómico, rendimientos bajos, contenido de aceite de la semilla variable y susceptibilidad de la planta a la sequía, inundaciones, plagas y enfermedades. Existen varios informes que apoyan estas conclusiones y que sugieren que es necesario todavía invertir en investigaciones agronómicas que estudien en detalle estos problemas (Openshaw, 2000; Achten et al, 2007; 2008; Becker y Makkar, 2008; Jain y Sharma, 2010; Ceasar e Ignacimuthu, 2011). Tailandia es un país que ha hecho estudios comparativos antes de embarcarse en un programa ambicioso con Jathropa. Han concluido que, desde varios puntos de vista, el sistema de producción de biodiesel a partir de palma resulta superior a cualquier esquema empleando Jathropa (Lam et al, 2009; Prueksakorn et al, 2010).

II.1.8 Empleo de microorganismos oleaginosos

Iniciativas recientes de investigación han desarrollado la posibilidad de emplear microorganismos que acumulan grasa en sus células durante un crecimiento restringido o limitado por un nutriente. Aquellos que logran acumular arriba del 20 % de grasa del material celular seco, se denominan oleaginosos. Se han identificado y caracterizado levaduras, hongos filamentosos, algas, cianobacterias y bacterias que cumplen con este objetivo (Li et al, 2008; Meng et al, 2009; Feofilova et al, 2010; Shi et al, 2011; Kosa y Ragauskas, 2011; Huang et al, 2013; Xu et al, 2013; Ratledge, 2013; Thevenieau y Ricaud, 2013; Koutinas et al, 2014; Pinzi et al, 2014; Sitepu et al, 2014). El Cuadro 5 lista algunos microorganismos oleaginosos.

Cuadro 5. Ejemplos de micro-algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos y su contenido de aceite como % en base seca

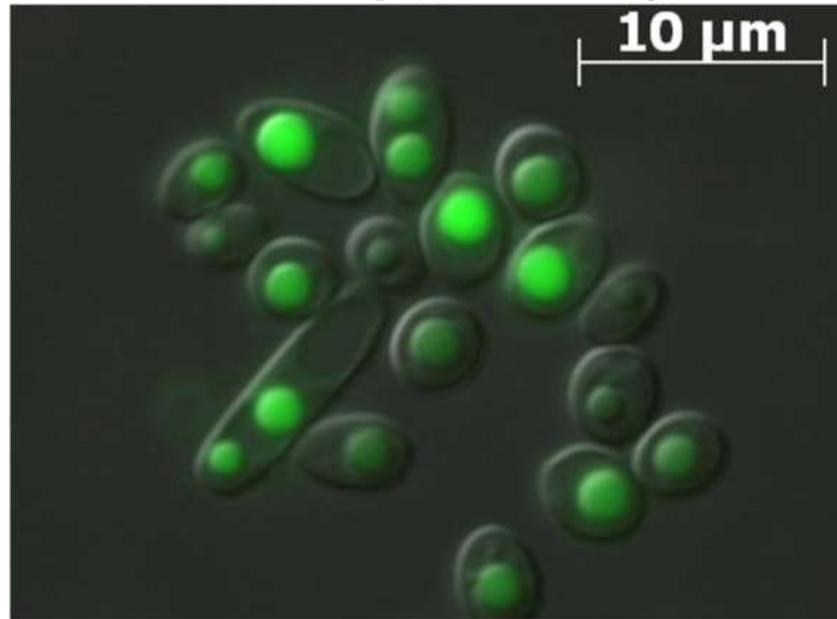
Table 1
Oil content of some microorganisms

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Fuente: Meng et al, 2009

Los microorganismos oleaginosos como materias primas para producir biodiesel poseen ciertas ventajas sobre otras fuentes más tradicionales. No requieren grandes extensiones de tierra para producirlos, Por lo tanto no están afectados ni por el lugar o el clima. Existe experiencia previa industrial en crecer microorganismos en reactores y por lo tanto la tecnología está lista y el proceso es fácilmente ajustable a la producción deseada. No existe una competencia con la producción de alimentos, de hecho como materia prima para crecer los microorganismos pueden emplearse subproductos o desechos agroindustriales. La Gráfica 37 muestra la acumulación de aceite en células de levadura.

Gráfica 37. Visualización de las estructuras grasosas acumuladas (esferas verdes claro) en la levadura *Yarrowia lipolytica* al crecer en glucosa



Fuente: Thevenieau y Ricaud, 2013

El proceso de acumulación de aceite se conoce y es similar en todos los microorganismos oleaginosos (Ratledge, 2013). Generalmente se crecen en forma balanceada respecto a los nutrientes necesarios para el crecimiento, siendo glucosa la fuente de carbono, y alguna sal inorgánica como fuente de nitrógeno. Luego de obtener una concentración de células adecuada en el medio, se continúa el proceso bajo una restricción de nitrógeno, ya que la mayoría se ha consumido por la célula para multiplicarse. En esta situación de estrés celular, cualquier sustrato consumido para mantener la viabilidad celular es dirigido por el metabolismo a la formación y acumulación de cuerpos grasos.

Para aumentar la productividad es importante, no solo la cantidad de grasa que el microorganismo en cuestión acumule, sino que también dentro del reactor se logre una alta concentración de células en el menor tiempo posible. De esta manera puede optimizarse la producción en g de triglicéridos por L de reactor por día.

Las micro-algas y las levaduras son los microorganismos más estudiados. Existe solo una planta piloto demostrativa en Finlandia empleando levaduras. Sin embargo, con algas la historia es diferente ya que existen en funcionamiento varias plantas piloto e industriales en operación (Abishek et al, 2014). La principal ventaja del alga es que se ha informado de especies que bajo ciertas condiciones de crecimiento pueden llegar a tener arriba de un 60 % de aceite, Sin embargo, la dependencia de la fotosíntesis en su crecimiento causa que en reactores abiertos de diferente tipo no se logren alcanzar densidades celulares adecuadas y apenas se llegue a valores entre 1.5 a 3.0 g/L en base seca. Deben ser cultivadas en forma abierta, en canales con agitación o en simples piscinas de poca profundidad lo que presenta el problema de frecuente contaminación y la necesidad de extensiones de tierra apreciables. Con las levaduras, estos problemas no se presentan debido a que se cultivan en reactores cerrados y se logran

mayores densidades de células en el reactor. Sin embargo, por lo general el contenido de aceite es menor. En ambos casos, es necesario seleccionar materias primas disponibles y de bajo costo para lograr precios competitivos del biodiesel.

En la Gráfica 38 se muestra el proceso para producir levaduras (u hongos filamentosos).

Gráfica 38. Etapas del proceso: a) preparación del medio, b) crecimiento del microorganismo en un reactor, c) separación de la biomasa del microorganismo y posterior secado

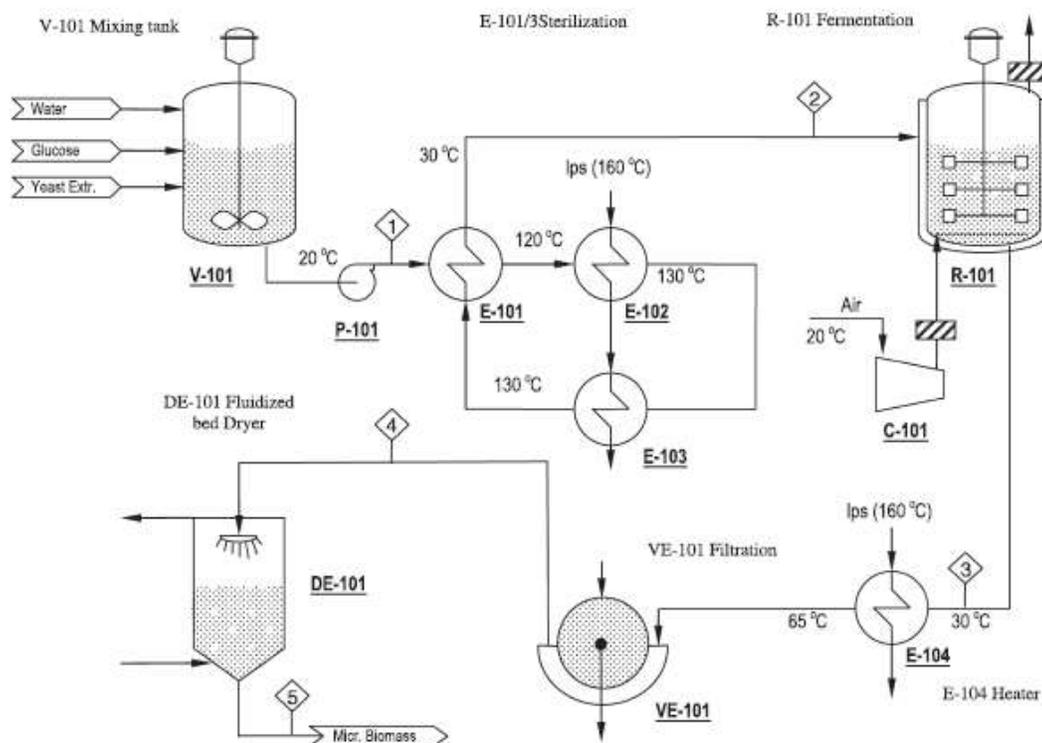


Fig. 1. Process flow diagram for the MO production process.

Fuente: Koutinas et al, 2014

El proceso continua con la extracción del aceite de la biomasa tal como se muestra en la Gráfica 39.

Gráfica 39. Etapas del proceso: a) extracción del aceite de las células por solvente en un tanque agitado, b) rompimiento de la estructura celular, c) separación del aceite y recuperación del solvente

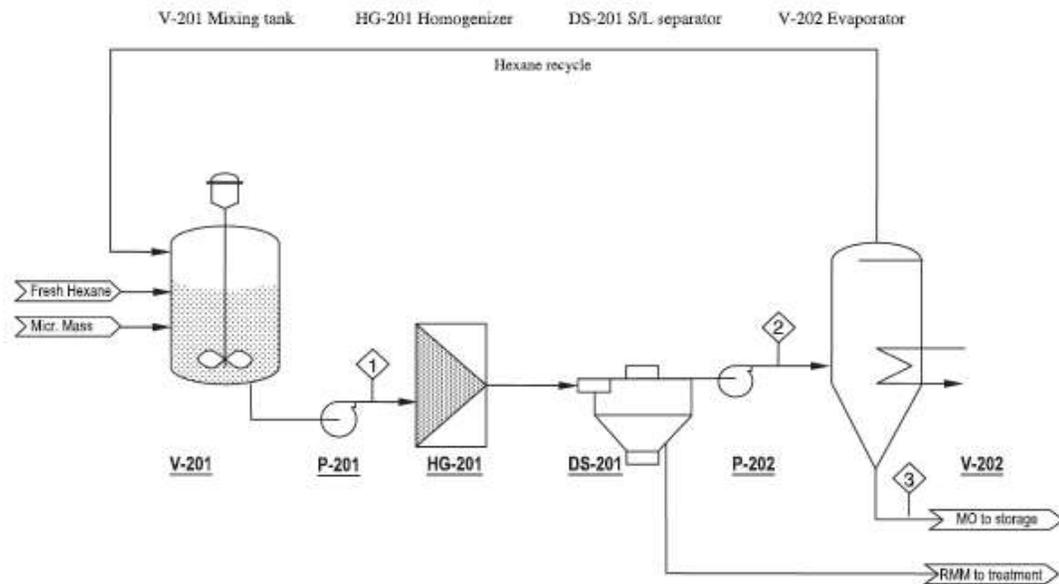


Fig. 2. Process flow diagram for the MO extraction process.

Fuente: Koutinas et al, 2014

El aceite se trans-esterifica con el proceso normal alcalino descrito en secciones anteriores para la producción de biodiesel y glicerol como subproducto.

En el caso de las algas se ilustra el concepto del proceso en la Gráfica 40. Se enfatiza el empleo de la luz solar como fuente de energía, el CO₂ obtenido de la industria como fuente de carbono y el reciclaje del agua empleada.

Gráfica 40. Etapas del proceso: a) crecimiento del alga en el reactor, b) separación de la biomasa del microorganismo, extracción del aceite y procesamiento del sólido residual

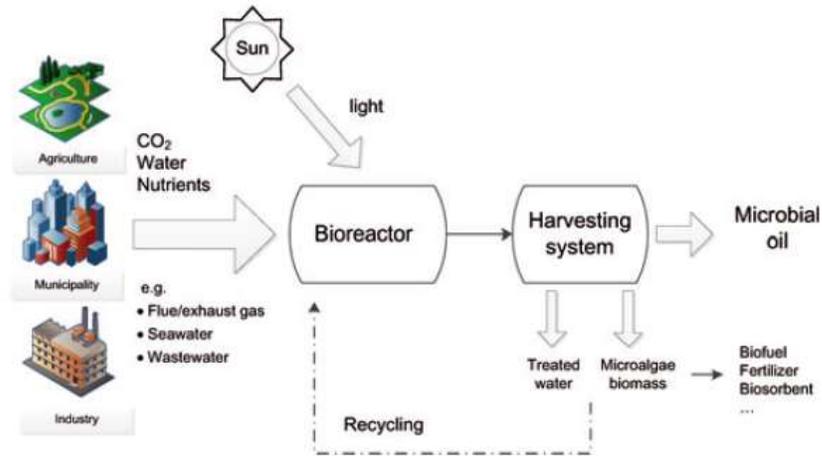


Figure 1. Schematic description of a sustainable microbial oil production.

Fuente: Xu et al, 2013

En la Gráfica 41 se ilustra los dos tipos de reactores. Los corredores abiertos (raceway pond) con agitación para forzar la circulación y reactores tubulares cerrados en donde crece el alga.

Gráfica 41. Reactores empleados en la producción de algas

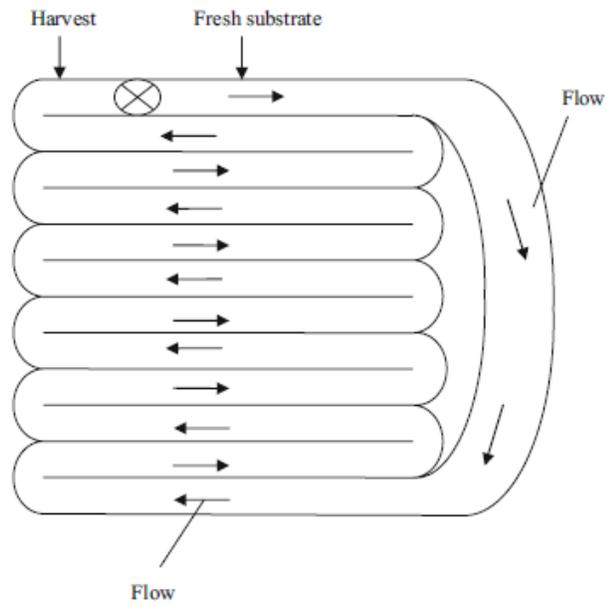
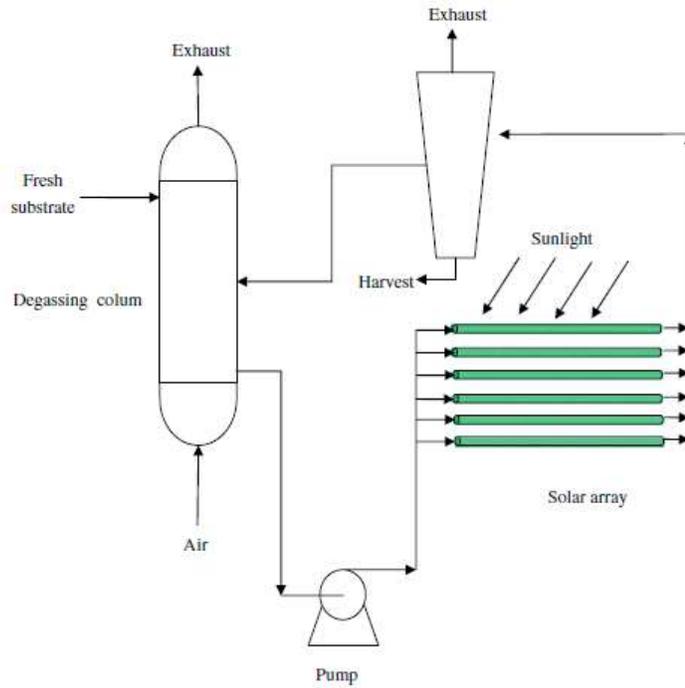


Fig. 2 Outline of a raceway pond



Fuente: Li et al, 2008

II.1.9 Experiencias previas con las levaduras *Yarrowia lipolytica* y *Trichosporon* sp.

Se denominan levaduras oleaginosas aquellas que son capaces de acumular hasta un 20 % de sustancias grasas de su peso seco celular. Estas levaduras representan una proporción minoritaria de toda la población de levaduras conocidas. Los géneros incluyen a *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Yarrowia*. Las levaduras exhiben ventajas sobre otras alternativas como fuentes de grasa, su tiempo de duplicación de la biomasa es menor a 1 hora, su crecimiento no depende del clima y el proceso puede aumentar de escala sin dificultad (Ageitos et al, 2011; Beopoulos et al, 2011).

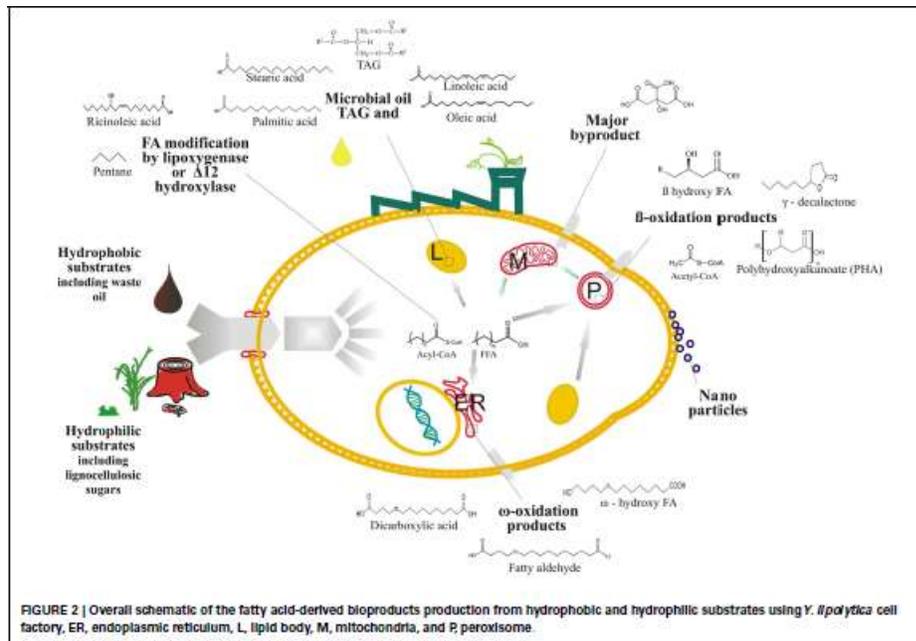
Se pone especial atención en los géneros *Trichosporon* y *Yarrowia*, ya que cepas de los mismos se emplearon en este trabajo.

En el Anexo 1 se lista en orden alfabético experimentos llevados a cabo con diferentes cepas de *Trichosporon* bajo diversas condiciones, empleando varios substratos, desde azúcares simples, melazas e hidrolizados de residuos lignocelulósicos, a escala de frascos agitados y fermentadores de laboratorio. Se muestran algunos indicadores, la biomasa seca obtenida y su contenido de aceite, los cuales varían ampliamente. Se listan también la productividad del aceite y el rendimiento de aceite obtenido por 100 gramos de glucosa. En teoría, podrían obtenerse como máximo 0.32 a 0.34 g de aceite por g de carbohidrato (Chuck et al, 2014). Estos dos últimos indicadores se han obtenidos por cálculos de los datos experimentales, por lo que es posible que los autores hayan diferido en la metodología. Aún así, los indicadores muestran cierta consistencia. Nótese que los autores, con una excepción, son de China.

Se ha estudiado también el efecto de ciertos compuestos originados durante la hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos sobre el crecimiento de *Trichosporon* (Huang et al, 2011; 2011; 2012, 2012; Sitepu et al, 2013; 2014). También se ha empleado el diseño de experimentos para optimizar el proceso (Huang et al, 2012).

La levadura *Yarrowia lipolytica* ha sido estudiada profusamente debido a su capacidad de acumular grasa en su célula y por la producción extracelular de ciertos metabolitos (Beopoulos et al, 2008, 2009a, 2009b; Bankar et al, 2009; Papanikolaou et al, 2010; Makri et al, 2010; Moeller et al, 2012; Nicaud, 2012; Blazeck et al, 2013; Sitepu et al, 2013; Abghari y Chen, 2014). En la Gráfica 42 se ilustra el diagrama de producción de aceites, o cuerpos lípidos, dentro de la célula de *Yarrowia lipolytica* utilizado para convertir substratos, tanto hidrofóbicos como aceites de reciclaje, como hidrofílicos como carbohidratos o glicerol.

Gráfica 42. Esquema ilustrativo de la producción de lípidos en una célula de *Yarrowia lipolytica*



Fuente: Abgahri y Chen, 2014

En el Anexo 2 se lista en orden alfabético experimentos llevados a cabo con diferentes cepas de *Yarrowia* bajo diversas condiciones, empleando varios sustratos, desde azúcares simples, como la glucosa e hidrolizados de residuos lignocelulósicos, por un lado, y glicerol por el otro, tanto a escala de frascos agitados como en fermentadores de laboratorio. Se muestran algunos indicadores, la biomasa seca obtenida y su contenido de aceite, los cuales varían ampliamente. Se listan también la productividad del aceite y el rendimiento de aceite obtenido por 100 gramos de glucosa. En teoría, podrían obtenerse como máximo 0.32 a 0.34 g de aceite por g de carbohidrato (Chuck et al, 2014). Estos dos últimos indicadores se han obtenidos por cálculos de los datos experimentales, por lo que es posible que los autores hayan diferido en la metodología. Aún así, los indicadores muestran cierta consistencia. Debe enfatizarse el tema del glicerol como sustrato, en el sentido de que, su objetivo es valorizar el glicerol que se obtiene de la reacción de trans esterificación para formar los ésteres de los ácidos grasos.

II.1.10 Empleo del etanol en lugar de metanol en la producción de biodiesel

El metanol es empleado como alcohol en la producción de biodiesel comercial en la actualidad. Como se explicó en la introducción, en algunas circunstancias resultaría pertinente el empleo del etanol. Se han realizado ensayos empleando etanol y aceites de diversas materias primas como reaccionantes, y catalizadores homogéneos como heterogéneos. En el Anexo 3 se lista en un orden cronológico algunos de los experimentos llevados a cabo, informando el tipo de aceite, la relación molar etanol aceite, la cantidad de catalizador homogéneo, la temperatura y la conversión al tiempo especificado.

Se observan variedad de condiciones de operación. Por ejemplo, a) relación etanol: aceite desde 4:1 hasta 25:1, b) cantidad de catalizador, de preferencia KOH, desde 0.3 hasta 1.25 %, c) temperaturas de operación en un rango de 23 hasta 80 °C, y d) rendimientos de ésteres etílicos en un intervalo de una baja conversión, 72%, hasta una conversión casi completa, 97.6 %. Estas variaciones pueden haber sido causadas por varios factores incluyendo la manera de operación y el equipo empleado, y sobre todo, la materia prima empleada.

Es de notar que en algunos casos se ha empleado el ultrasonido, como una fuente de energía que mezcla las fases y crea micro zonas turbulentas muy activas de contacto por la cavitación, acelerando la reacción considerablemente.

II.1.11 Extracción y reacción simultánea

Con el objeto de eliminar cuellos de botella en la producción de biodiesel de materias primas ricas en aceite se ha investigado la consolidación del proceso, intentando unir dos operaciones realizadas por separado, en una sola que permita realizar ambos objetivos. Los esfuerzos se han centrado en dos tipos de consolidación: la extracción y reacción simultáneas y la reacción y separación de fases acopladas como las ha descrito Kiss & Bildea (2012).

En la primera de ellas, el aceite de donde provenga en la naturaleza, se extrae de la matriz sólida con el alcohol, el cual a su vez, reacciona por la acción de un catalizador con los triglicéridos, operación que se lleva a cabo en un mismo equipo. De esta manera el proceso se consolida ya que se elimina la etapa de la extracción y purificación del aceite presente en el proceso tradicional.

A este desarrollo los investigadores iniciales (Harrington & D Árcy-Evans, 1985a, b; Kildiran et al 1996; Siler-Marinkovic & Tomasevic, 1998) le denominaron trans esterificación *in situ*. Más adelante también se le conoce como una reacción extractiva.

A continuación se presentan los resultados de algunos ejemplos descritos en la literatura en forma cronológica empleando semillas oleaginosas. Puede observarse la alta cantidad de materias primas usadas y la variabilidad en los procedimientos. Los rendimientos en algunos casos son excelentes, y en general puede decirse, que dependen de la materia prima empleada y el procedimiento experimental seguido:

a) Ozgul-Yucel & Turkey (2002). *Materia prima*: afrecho de arroz. *Condiciones*: 50 g de partículas en frasco, empleando 200 mL de metanol y 5 mL de H₂SO₄ en reflujo. Tiempo de 5 h. *Rendimiento* de 99.8% en la reacción.

b) Haas et al (2006). *Materia prima*: partículas secas de semilla de soya. *Condiciones*: 5 g de partículas en frascos agitados, empleando metanol y NaOH en proporción de 543:1:2. Tiempo de 8 h a temperatura ambiente. *Rendimiento*: 90% en la reacción y un 95 % de extracción de aceite de la soya.

- c) Qian et al (2008). *Materia prima*: semilla de algodón molida y seca. *Condiciones*: 25 g de partículas en frasco con agitación mecánica, empleando metanol y NaOH en proporción de 135:1,1. Tiempo de 3 h a 40 °C. *Rendimiento*: 98% en reacción y un 99% de extracción.
- d) Georgogianni et al (2008). *Materia prima*: semilla de girasol macerada en el solvente. *Condiciones*: 20 g de partículas maceradas en frasco con agitación mecánica o con ultrasonido, empleando metanol (150 mL) o etanol (216 mL) y NaOH en proporción de 2%. Reflujo por 2 h (metanol) y 4 h (etanol) a 60 °C (metanol) y 80 °C (etanol). Rendimiento de 98% en reacción y un 99% de extracción. *Rendimiento*: para metanol de 97 % con agitación y 95 % con ultrasonido; para etanol 90 y 95 % respectivamente.
- e) Zeng et al (2009). *Materia prima*: semilla de girasol molida y seca. *Condiciones*: 20 g de partículas en frasco con agitación mecánica, empleando metanol, dietoximetano (DEM) y NaOH con las proporciones siguientes: metanol/DEM/aceite/catalizador 47.6/22.56/1/0.3. Tiempo de 4 min a temperatura ambiente. *Rendimiento*: 94.4 % en reacción.
- f) Haagenson et al (2010). *Materia prima*: semilla de canola molida y seca. *Condiciones*: 40 g partículas (19.2 g de aceite) en frascos agitados, empleando metanol y KOH en proporción de 275:1:1.05. Tiempo de 6 h a 60 °C. *Rendimiento*: 80.0 % en total.
- g) Kaul et al (2010). *Materia prima*: semilla de jathropa molida y seca. *Condiciones*: 14 g partículas en frasco con agitación mecánica, empleando metanol y NaOH en proporción de 7.8:1:1. Tiempo de 1 h a 65 °C. *Rendimiento*: 98.0 % en total.
- h) Shiu et al (2010) *Materia prima*: afrecho de arroz. *Condiciones*: 10 g partículas en reactor con agitación mecánica, empleando metanol y H₂SO₄ en proporción de metanol a afrecho 15 mL/g, ácido a afrecho 0.18. Tiempo de 15 min a 60 °C. Luego adición de 8 mL de 5N NaOH por 60 min. *Rendimiento*: 96.8 % reacción.
- i) Shuit et al (2010a, 2010b) *Materia prima*: semilla de jathropa molida y seca. *Condiciones*: 20 g partículas en frasco con agitación mecánica, empleando metanol y H₂SO₄ en proporción de metanol a semilla de 10.5 mL/g, 21.8 % de H₂SO₄. Tiempo de 10 h a 60 °C. *Rendimiento*: 98.1 % en total.
- j) Hincapié et al (2011). *Materia prima*: semilla de castor molida. *Condiciones*: 20 g partículas en frasco con agitación mecánica 300 rpm, y calentamiento empleando etanol y H₂SO₄ en proporción de 60:1:1. Tiempo de 1 h. Luego se agregó KOH 1 % y se dejó otra hora. *Rendimiento*: 41-5 a 57.3 % en total.
- k) Boey et al (2011) *Materia prima*: Arcilla blanqueadora de desperdicio de aceite de palma. *Condiciones*: 2 g partículas en tubo con ultrasonido, y temperatura de 55 °C empleando metanol y KOH en proporción de 150:1.0.2. Tiempo de 2 h. *Rendimiento*: 75.2 % en total.
- l) Kasim y Harvey (2011) *Materia prima*: semilla de jathropa molida y seca. *Condiciones*: 10 g partículas en botellas en agitador 300 rpm, y temperatura de 30 °C, empleando metanol y NaOH en proporción de 400:1 y 0.15N de NaOH. Tiempo de 0.5 h. *Rendimiento*: 87.8 % reacción.

m) Koberg y Gedanken (2012). *Materia prima*: semillas de jathropa y de castor molidas. *Condiciones*: 1 g partículas en frasco empleando metanol-cloroformo en proporción 1:2 y 0.3 g SrO como catalizador. Tiempo de 5 min a 60 °C. Irradiación con microondas. *Rendimiento*: 57.20 % y 40.96 % en base a peso de semilla, para castor y jathropa respectivamente.

n) Abo El-Enin et al (2013) *Materia prima*: semillas de colza molidas. *Condiciones*: 40 g partículas en frasco empleando metanol en proporción 720:1 KOH como catalizador a 0.02N. Tiempo de 60 min a 65 °C. *Rendimiento*: 90 % en total.

o) Abdulkadir et al (2014) *Materia prima*: semillas de hule secas, molidas, pre-calentadas. *Condiciones*: 10 g partículas en frasco empleando metanol en proporción másica de 1 a 6, y KOH a 2.5 % (p/v) como catalizador. Tiempo de 120 min a 60 °C y 400 rpm. *Rendimiento*: 75 % en total.

Esta técnica también se ha aplicado con anterioridad a microorganismos ricos en grasa incluyendo algas, bacterias, hongos y levaduras. No son muchas las referencias sobre la extracción y reacción simultánea empleando la biomasa de levaduras, y en todas ellas se ha empleado el metanol como solvente y reaccionante a la vez. No hemos encontrado referencia alguna en donde se haya empleado el etanol:

Liu y Zhao (2007) sentaron las bases de la investigación, empleando biomasa seca de las levaduras oleaginosas, *Lipomyces starkeyi* y *Rhodospiridium toruloides*. Lograron rendimientos de 98 % a 70 °C, 20 h, relación de biomasa a etanol de 1:20 (peso/volumen) catalizado por 0.2 mol/L de H₂SO₄ o 0.4 mol/L de HCl.

Cheirsilp y Louhasakaul (2013) reportaron resultados con varias cepas de *Yarrowia lipolytica* previamente crecidas en residuos líquidos de la agroindustria, utilizando metanol, 50 °C, 0.4 M H₂SO₄ y la biomasa seca como también biomasa con diferentes contenidos de humedad. Se logró un rendimiento de 69 % con biomasa seca y una relación de 167:1 de metanol:aceite. El rendimiento con biomasa húmeda fue de 73 % pero en 6 horas de reacción; y de 72 % en una hora de reacción pero con una relación de reaccionantes de 209:1.

Cui y Liang (2014) trabajaron con *Cryptococcus curvatus* empleando dos etapas, KOH como catalítico a 5 % e irradiación de microondas. Las condiciones óptimas fueron de 2 min de tiempo de reacción, una relación de 50:1 en peso, y una agitación de 966 rpm. El rendimiento de extracción fue de 56 % en la primera etapa y de 92 % en la segunda. El contenido de FAMES fue de 64 %.

Thliveros et al (2014) utilizaron biomasa seca de *Rhodospiridium toruloides*. Las condiciones más adecuadas fueron 4 g/L de NaOH, 20:1 de metanol/biomasa seca, 10 h a 50 °C. El rendimiento fue de 98 %.

PARTE III

III. RESULTADOS

III.1 Resultados experimentales

III.1.1 Levaduras oleaginosas

Con las dos levaduras seleccionadas se planificaron y llevaron a cabo las actividades siguientes:

- a) Pruebas preliminares de crecimiento en un medio sintético
- b) Pruebas de crecimiento con el objetivo de simplificar el medio
- c) Pruebas de confirmación de la composición del medio
- d) Pruebas de crecimiento en hidrolizados del bagazo del sorgo dulce

III.1.1.1 Pruebas preliminares de crecimiento en un medio sintético

Se llevaron a cabo pruebas de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 y de *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 en un medio sintético cuya composición se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Composición del medio sintético de crecimiento

Componente	g/L
Glucosa	20
Extracto de levadura	10
Peptona	10

Fuente: FODECYT 003-2012

El crecimiento se llevó a cabo en un fermentador de un litro bajo las condiciones mostradas en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones de operación del fermentador

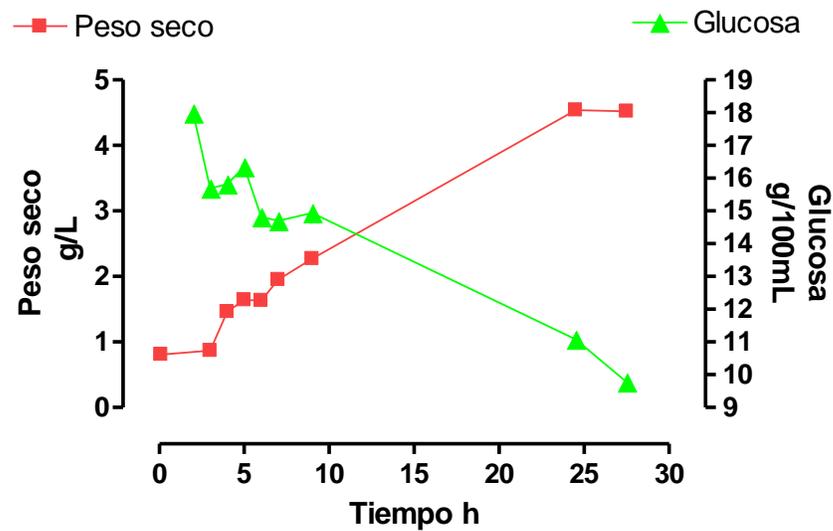
Parámetro	Valor para <i>Yarrowia</i>	Valor para <i>Trichosporon</i>
Volumen, mL	900	900
Temperatura, °C	30	28
pH	5.5	6.0
Agitación, rpm	200	200
Flujo de aire, vvm	1	0.75
Tiempo, h	27.5	32.0

Fuente: FODECYT 003-2012

La glucosa resultó una excelente fuente de carbono; la peptona y el extracto de levadura también resultaron excelentes fuentes de nitrógeno, fósforo y elementos menores.

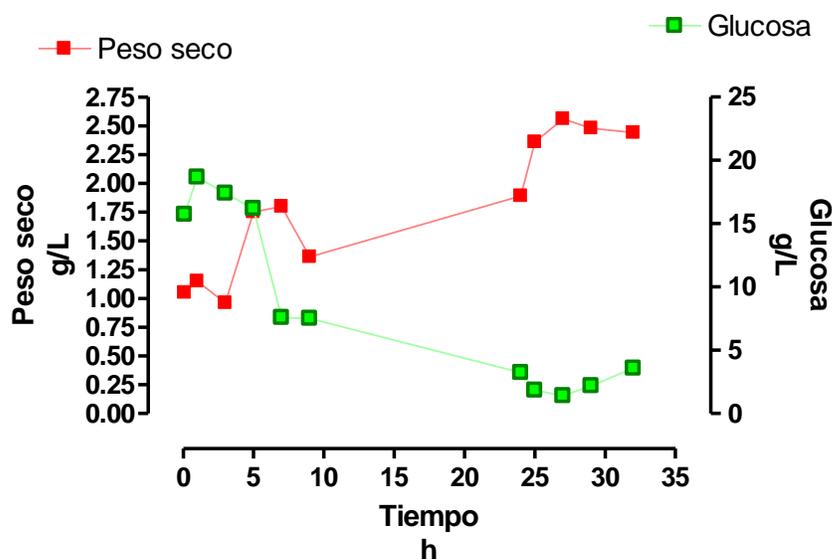
Los resultados obtenidos se muestran en las Gráficas 43 y 44, en donde se observa el aumento del peso seco de la biomasa de la levadura y el descenso de la glucosa en el medio conforme transcurrió el tiempo de la fermentación.

Gráfica 43. Crecimiento de *Y. lipolytica* en un medio sintético



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 44. Crecimiento de *T. oleaginosus* en un medio sintético



Fuente: FODECYT 003-2012

El valor obtenido de los parámetros de la cinética de crecimiento se presenta en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Valor numérico de los parámetros de crecimiento

Parámetro	Valor	Valor
	Yarrowia	Trichosporon
Constante de crecimiento, h^{-1}	0.09	0.075
Rendimiento, g peso seco/g glucosa consumida	0.29	0.09

Fuente: FODECYT 003-2012

Los datos obtenidos mostraron lo siguiente: a) las dos levaduras crecieron en forma bastante similar, b) por otro lado, la *Yarrowia* tuvo un mayor rendimiento de biomasa seca respecto a la glucosa consumida.

La biomasa obtenida de levadura se centrifugó y luego se deshidrató por liofilización. El contenido de aceite fue de alrededor de 4.0 % en base seca.

III.1.1.2 Pruebas de crecimiento con el objetivo de simplificar el medio

Se llevaron a cabo pruebas en las cuales se empleó el jugo extraído del tallo de sorgo (maicillo) dulce como fuente de carbono, debido a que el mismo es rico en sacarosa, glucosa y fructosa y además contiene una amplia gama de micro nutrientes y minerales. Como fuente de nitrógeno se emplearon la peptona y el extracto de levadura, cuando se creció *Yarrowia lipolytica* CBS 2075. La composición del medio se especifica en el Cuadro 9. Debe notarse la alta concentración de compuestos solubles medidos por el Brix.

Cuadro 9. Composición del medio conteniendo jugo de sorgo y nitrógeno orgánico

Componente	g/L
Jugo de sorgo	15.3 °Brix
Extracto de levadura	10
Peptona	10

Fuente: FODECYT 003-2012

Al emplear *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 la fuente de nitrógeno fue el fosfato de amonio, substituyendo de esta manera en la formulación el nitrógeno orgánico que generalmente es más caro. La composición del medio se especifica en el Cuadro 10. Notar que el Brix del jugo de sorgo fue menor en este caso.

Cuadro 10. Composición del medio conteniendo jugo de sorgo y nitrógeno inorgánico

Componente	g/L
Jugo de sorgo	11.0 °Brix
Fosfato de amonio	1

Fuente: FODECYT 003-2012

El crecimiento se llevó a cabo en un fermentador de un litro bajo las condiciones de operación mostradas en el Cuadro 11. Notar que se prolongó el tiempo de operación al emplear *T. oleaginosus*.

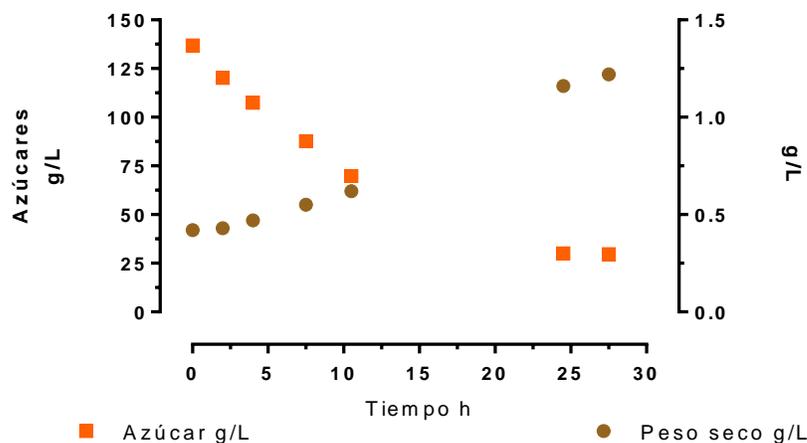
Cuadro 11. Condiciones de operación del fermentador

Parámetro	Valor <i>Yarrowia</i>	Valor <i>Trichosporon</i>
Volumen, mL	1025	1025
Temperatura, °C	30	30
pH	5.45	5.49
Agitación, rpm	200	200
Flujo de aire, vvm	0.70	0.70
Tiempo, h	27.5	54.0

Fuente: FODECYT 003-2012

Los resultados obtenidos se muestran en las Gráficas 45 y 46, en donde se observa el aumento del peso seco de la biomasa de la levadura en el medio y el descenso de los azúcares totales.

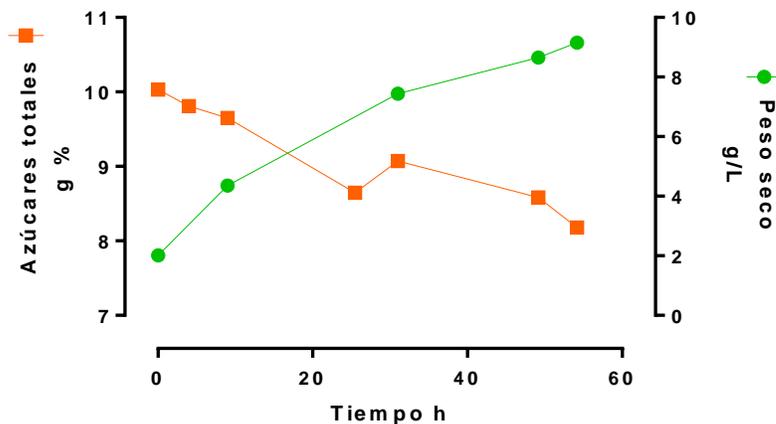
Gráfica 45. Crecimiento de *Y. lipolytica* en un medio con jugo de sorgo y nitrógeno orgánico



Fuente: FODECYT 003-2012

Se observa que el peso seco obtenido de biomasa de *Yarrowia*, aproximadamente 1.25 g/L, fue menor que cuando se empleó solo glucosa como fuente de carbono. La causa posiblemente se debió a que la levadura consumió los azúcares reductores preferentemente, así un 100 % de glucosa y un 95.36 % de fructosa, pero, por otro lado, el consumo de sacarosa fue únicamente de 37.11 %.

Gráfica 46. Crecimiento de *T. oleaginosus* en un medio con jugo de sorgo y nitrógeno inorgánico



Fuente: FODECYT 003-2012

Puede verse que el aumento de peso del *Trichosporon* a las 54 h de cultivo sobrepasó los 9 g/L. La glucosa se consumió preferentemente, un 25.87 %, luego la sacarosa, 15.14 % y luego la fructosa, 11.79 %.

El valor obtenido de los parámetros de la cinética de crecimiento se presenta en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Valor numérico de los parámetros de crecimiento

Parámetro	Valor Yarrowia	Valor Trichosporon
Constante de crecimiento, h ⁻¹	0.05	0.09
Rendimiento, g peso seco/g glucosa consumida	0.01	0.39

Fuente: FODECYT 003-2012

Se concluye de estas dos pruebas que *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* creció en forma adecuada en jugo de sorgo dulce fortificado con fosfato de amonio.

En ambos casos la biomasa obtenida se centrifugó y luego se deshidrató por liofilización.

La cantidad de aceite en la biomasa seca de *Yarrowia* fue de 24.09 ± 0.75 %, y en la de *Trichosporon* fue de 17.23 ± 2.12 %.

Se prepararon ésteres metílicos de la fase aceitosa obtenida de *Trichosporon* y se determinaron los ácidos grasos por cromatografía gaseosa, obteniéndose la composición siguiente:

Cuadro 13. Contenido de ácidos grasos en el aceite de *Trichosporon*.

Ácido	%
Palmítico, C16:0	26.6
Palmitoleico, C16:1	2.4
Esteárico, C18:0	8.3
Oleico, C18:1	44.8
Linoleico, C18:2	8.9

Fuente: FODECYT 003-2012

Se sabe que la composición de los ácidos grasos varía según la especie de levadura y las condiciones de cultivo (Sitepu et al, 2013), por lo que era de esperarse que las cifras no

coincidieran. Sin embargo las proporciones son similares, siendo el principal ácido graso insaturado el ácido oleico (C18:1).

III.1.1.3 Pruebas de confirmación de la composición del medio

Con el objeto de definir con más detalle el medio de crecimiento se realizaron dos pruebas. En la primera, se exploró la posibilidad de aumentar el contenido inicial de carbohidratos con el objeto de incrementar el peso seco de la levadura al final de la fermentación. En la segunda, se comparó la adición de nitrógeno orgánico con la adición de nitrógeno inorgánico.

En la primera prueba se utilizó un jugo de sorgo dulce con un mayor contenido de azúcares. En este caso se empleó un jugo con un Brix alto a su vez enriquecido con peptona y extracto de levadura. La levadura empleada fue *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815.

Las condiciones del crecimiento en el fermentador de un litro se listan en el Cuadro 14.

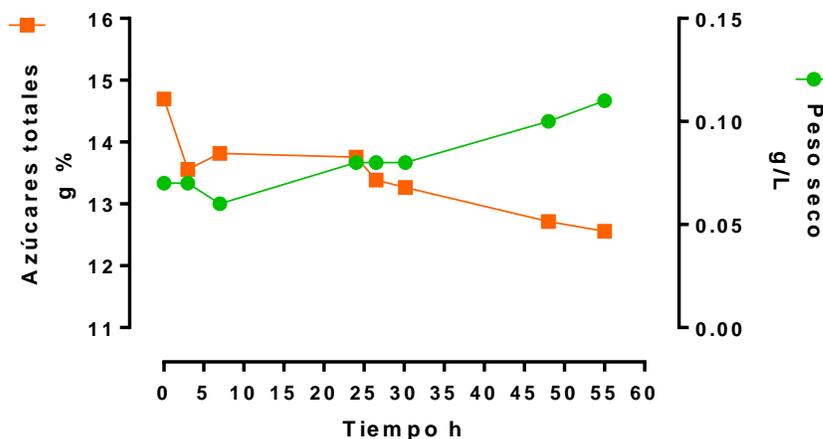
Cuadro 14. Condiciones de operación del fermentador

Variable	Valor
Brix	17.3
Peptona g/L	1
Extracto de levadura g/L	3
pH	5.20
Temperatura, °C	30
Agitación, rpm	200
Aire, vvm	0.80

Fuente: FODECYT 003-2012

Los cambios del consumo de azúcar y el aumento del peso seco se observan en la Gráfica 47.

Gráfica 47. Crecimiento de *T. oleaginosus* en un medio con jugo de sorgo con un alto contenido inicial de azúcar y nitrógeno orgánico



Fuente: FODECYT 003-2012

Como puede observarse en la gráfica el consumo de azúcares y el aumento del peso seco fueron bajos. Es probable que la levadura estuviera inhibida por un exceso de sustrato al inicio del experimento. El contenido de aceite de la biomasa fue de $9.72\% \pm 0.95$.

Se concluye, entonces, que no es posible pensar en aumentar la concentración de azúcar al iniciar el cultivo de la levadura con el objeto de tener una mayor cantidad de biomasa.

En la segunda prueba, la cual se llevó a cabo a escala de frasco agitado, se comparó el efecto de agregar diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 y *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 en jugo de sorgo dulce. Se emplearon las fuentes de nitrógeno siguientes: a) fosfato de amonio y b) una mezcla en partes iguales de peptona (PEP) y extracto de levadura (EL).

Los resultados se resumen en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Resultados comparativos del crecimiento de las levaduras en un medio conteniendo nitrógeno orgánico o nitrógeno inorgánico

	g/L	Brix a 72 h	Peso seco a 72 h	Y
<i>Trichosporon</i>	Fosfato	8.6	16.01	0.73
<i>Trichosporon</i>	PEP/EL	8.2	11.43	0.44
<i>Yarrowia</i>	Fosfato	8.4	8.30	0.35
<i>Yarrowia</i>	PEP/EL	8.1	9.40	0.35

Fuente: FODECYT 003-2012

Los resultados indican claramente que en ambas levaduras no existió una diferencia significativa al emplear nitrógeno inorgánico (fosfato) o nitrógeno orgánico (PEP/EL). Por lo tanto se concluye, que en futuros ensayos con jugo de sorgo dulce se adicionará fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y fósforo, debido a su menor costo unitario.

III.1.1.4 Pruebas de crecimiento en hidrolizados del bagazo del sorgo dulce

Las dos levaduras ensayadas mostraron una preferencia por glucosa como sustrato de carbono para reproducirse. Es posible obtener glucosa al hidrolizar la celulosa presente en las plantas.

Se realizaron pruebas para determinar el crecimiento de las levaduras *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 y *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 en hidrolizados del bagazo del sorgo dulce.

La composición de los carbohidratos estructurales del bagazo se lista y se compara con datos informados en la literatura en el Cuadro 16. Es necesario aclarar que la composición del bagazo del sorgo dulce varía de acuerdo con la variedad y el manejo del cultivo. Además el bagazo puede lavarse con agua exhaustivamente para eliminar los compuestos solubles antes de efectuar el análisis. La muestra de bagazo empleada en este proyecto provino de una mezcla de las variedades Della, M81-E, Top 76-6 y Umbrella, las cuales se habían fermentado por extracción fermentación simultánea de los azúcares solubles. Como se observa en el cuadro todavía contenía 10 % de solubles y minerales. La muestra de Li et al (2010) se refiere a la composición completa del tallo por lo que contiene carbohidratos solubles en apreciable cantidad. La muestra de Kim y Day (2011) se refiere a un bagazo lavado con agua, dejando prácticamente los polímeros. La proporción de celulosa a hemicelulosa es parecida en las tres muestras, 1.77, 1.88 y 1.64, respectivamente. Sin embargo, la proporción de la suma de celulosa y hemicelulosa a lignina, es diferente, 8.56, 2.92 y 3.46, respectivamente. La muestra procesada en este trabajo fue de sorgos dulces con un bajo contenido relativo de lignina.

Cuadro 16. Composición del bagazo del sorgo dulce

Componente	% en base seca	Li et al (2010)	Kim y Day (2011)
Celulosa	51.46	27.3	44.6
Hemicelulosa	29.13	14.5	27.1
Lignina	9.41	14.3	20.7
Solubles y cenizas (por diferencia)	10.00	32.3	0.40

Fuente: FODECYT 003-2012

La hidrólisis ácida se realizó con 5 g de sólidos secos + 50 mL de H₂SO₄ al 1 % en 2 tubos ACE colocados a 121 °C por 150 min. Se solubilizaron el 41.62 % de los sólidos iniciales.

La hidrólisis alcalina con 5 g de sólidos secos + 50 mL de NaOH al 2 % en tubos ACE colocados a 121 °C por 60 min. Se solubilizaron el 33.18 % de los sólidos iniciales

El análisis de azúcares en los hidrolizados se encuentra en el Cuadro 17. Puede notarse que la mayor cantidad de azúcares solubles se produjeron en la hidrólisis ácida.

Cuadro 17. Azúcares solubles producidos por la hidrólisis del bagazo del sorgo dulce

Componente en g%	Hidrólisis ácida	Hidrólisis alcalina
Glucosa	2.00	Trazas
Xilosa	0.47	Trazas
Arabinosa	0.35	Trazas

Fuente: FODECYT 003-2012

Se prepararon inóculos de las dos levaduras en caldo *Sabouraud*, se recuperó la biomasa y se diluyó en agua destilada obteniendo las densidades ópticas siguientes en las suspensiones: *Trichosporon* = 1.813 y *Yarrowia* = 1.793. Se agregó un 10 % del inóculo a los líquidos hidrolizados, los cuales se llevaron a un pH de 5.5.

Las levaduras crecieron por 7 días (168 h) a 32 °C y 250 rpm en frascos agitados. Los resultados de biomasa obtenida y contenida de aceite se reportan en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Crecimiento de las levaduras en los hidrolizados y contenido de aceite

	Peso seco g/L	Contenido de aceite
<i>Yarrowia</i> (hidrólisis ácida)	2.77	28.27
<i>Yarrowia</i> (hidrólisis alcalina)	1.10	6.36
<i>Trichosporon</i> (hidrólisis ácida)	5.80	11.47
<i>Trichosporon</i> (hidrólisis alcalina)	1.90	2.98

Fuente: FODECYT 003-2012

Se observa en el cuadro que a) los mejores resultados se obtuvieron en los hidrolizados ácidos y b) la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 fue superior.

III.1.1.5 Desarrollo de nueva tecnología a base de jugo de sorgo dulce

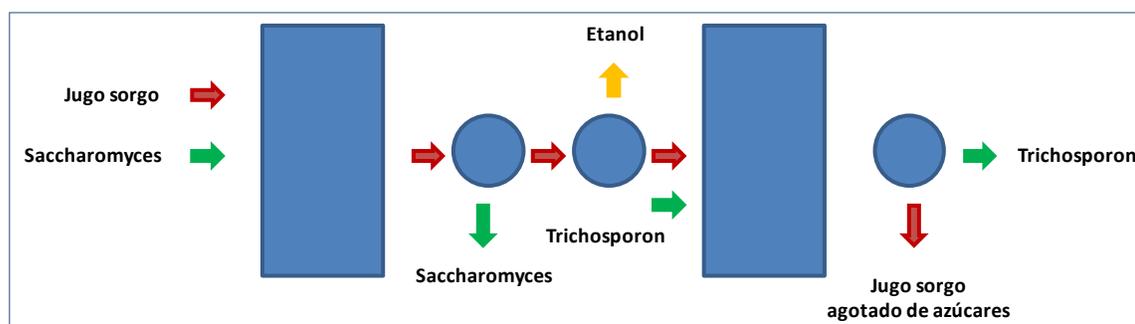
Aunque se comprobó experimentalmente que es posible utilizar la glucosa y xilosa proveniente de la hidrólisis del bagazo del sorgo dulce, el proceso de hidrólisis en si es complicado y costoso. Por otro lado, se encontró que el jugo de sorgo dulce fortificado con nitrógeno inorgánico resulto ser un excelente medio para el crecimiento de la levadura.

Basados en estas experiencias se diseñó un sistema novel para producir biodiesel del jugo.

El procedimiento diseñado fue el de utilizar dos etapas consecutivas de fermentación. La primera, convirtiendo parte de los azúcares a etanol con levaduras *Saccharomyces*. La segunda, usando los azúcares residuales para producir biomasa de la levadura oleaginosa *Trichosporon*. De esta manera con una misma materia prima podría producirse dos biocombustibles, el etanol y el biodiesel.

El proceso se visualiza mejor en el diagrama operativo mostrado en la Grafica 48.

Gráfica 48. Diagrama de flujo de tecnología propuesta a base de jugo de sorgo dulce



Fuente: FODECYT 003-2012

El diagrama muestra las operaciones en secuencia siguientes: en una primera fermentación del jugo de sorgo, conteniendo la mayor concentración de azúcares posible, la levadura *Saccharomyces* produce etanol. Luego se separa la biomasa de levadura por centrifugación y el etanol por destilación. El jugo resultante se emplea para crecer *Trichosporon*. Al finalizar se separa la biomasa de *Trichosporon* rica en aceite por centrifugación.

Se empleó un diseño factorial 2^4 con la repetición del punto central seis veces para un total de 22 experimentos, empleando el logicial *Design Expert 7.0.3*, con el objeto de determinar el efecto de cambiar cuatro factores (la cepa de levadura, la cantidad inicial de azúcar en el jugo de sorgo, la cantidad adicionada de extracto de levadura y la cantidad adicionada de fosfato de amonio) sobre la cantidad de etanol producido y el consumo de azúcares durante la fermentación.

El nivel de los factores se encuentra en el Cuadro 19. Notar que la cepa de levadura es una variable de categoría.

Cuadro 19. Niveles de los factores en el diseño factorial 2⁴

Factor	Nivel inferior	Nivel superior	Punto central
(A) Cepa de levadura	CBS 381	CBS 422	-
(B) Brix inicial jugo sorgo	10	15	12.5
(C) Extracto levadura (EL), g/L	5	10	7.5
(D) Fosfato de Amonio (FA), g/L	1	3	2

Fuente: Fodecyt 003-2012

La matriz del diseño factorial se encuentra en el Cuadro 20. La unidad positiva indica el nivel superior del factor. La unidad negativa, el nivel inferior. El cero, el punto central. Notar que cada experimento es único, con la salvedad del punto central que se repite seis veces.

Cuadro 20. Matriz de experimentos del diseño factorial 2⁴

Experimento	Levadura	Brix	EL	FA
1	CBS 422	0	0	0
2	CBS 381	0	0	0
3	CBS 422	-1	1	-1
4	CBS 422	-1	-1	1
5	CBS 422	0	0	0
6	CBS 422	1	-1	-1
7	CBS 381	0	0	0
8	CBS 422	-1	1	1
9	CBS 381	-1	1	1
10	CBS 422	1	-1	1
11	CBS 381	1	1	1
12	CBS 381	-1	-1	-1
13	CBS 422	0	0	0
14	CBS 422	1	1	-1
15	CBS 422	1	1	1
16	CBS 422	-1	-1	-1
17	CBS 381	0	0	0
18	CBS 381	1	1	-1
19	CBS 381	1	-1	1
20	CBS 381	-1	-1	1
21	CBS 381	1	-1	-1
22	CBS 381	-1	1	-1

Fuente: FODECYT 003-2012

Las fermentaciones en los frascos estáticos se llevaron a cabo a 30 °C por 48 h. El valor del azúcar inicial para los diferentes Brix fueron: 8.12 g de azúcares totales/100mL para el Brix

de 10. Un valor de 10.23 para el Brix 12.5, y un valor de 12.36 para el Brix 15. El resultado del etanol producido y el consumo de azúcares se muestran en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Resultados de los experimentos del diseño factorial 2^4

Experimento	Etanol producido g %	Consumo de azúcares g %
1	1.40	43.38
2	5.32	83.45
3	1.82	46.43
4	1.80	48.26
5	2.60	49.55
6	3.21	50.52
7	4.72	84.53
8	1.45	53.41
9	3.52	88.42
10	2.61	50.51
11	7.09	82.56
12	4.88	87.88
13	1.82	46.68
14	2.54	45.32
15	1.17	51.21
16	1.96	56.80
17	3.80	84.76
18	8.07	85.50
19	6.00	85.25
20	3.08	85.99
21	7.37	88.07
22	2.24	86.06

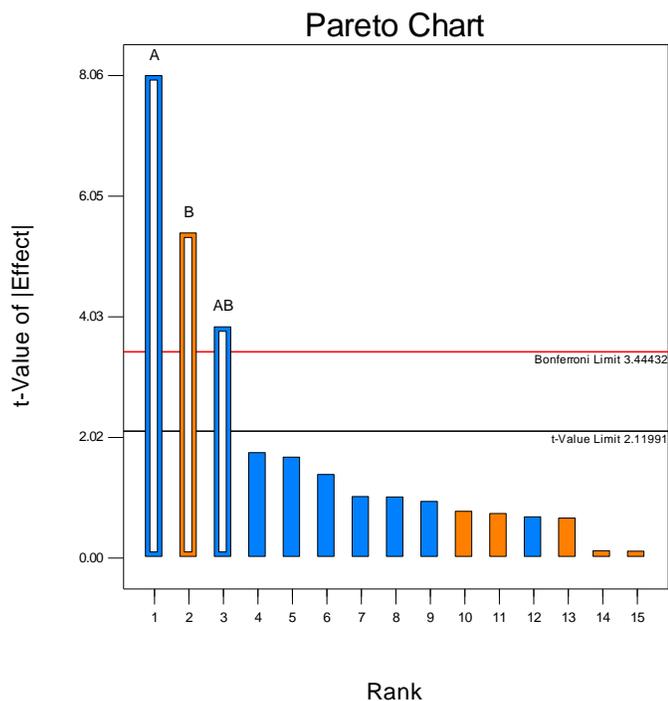
Fuente: FODECYT 003-2012

La diferencia entre el valor máximo y mínimo obtenidos en las dos variables de respuesta fue de 6.90 g % y 45.04 g %, para el etanol producido y el consumo de azúcares, respectivamente. Lo anterior implica la existencia de efectos apreciables inducidos por los cambios en las variables. El rendimiento promedio de todas las pruebas, Y, de etanol producido sobre azúcar consumida, fue de 0.49 con una desviación estándar de 0.14. El valor teórico de dicho rendimiento para el tipo de levadura empleado es de 0.51, por lo que el promedio del rendimiento en todas las pruebas fue de un 96 % del teórico.

Los efectos sobre la producción de etanol de los diferentes factores o variables se observa en el Grafica 49, en donde se comparan efectos primarios e interacciones binarias, terciarias y cuaternarias. Se observa que resaltan los efectos de las variables primarias A, tipo de levadura, B, el Brix inicial del medio y la interacción binaria entre ambos, AB. El resto son

estadísticamente no significativos. Las barras de color azul indican un efecto negativo sobre la respuesta. Las barras anaranjadas un efecto positivo.

Grafica 49. Comparación de los efectos de los factores sobre la producción de etanol



Fuente: FODECYT 003-2012

El análisis de variancia confirmó la significancia estadística de los efectos, como puede observarse en el Cuadro 22. El efecto de la levadura fue negativo, lo que indicó que al pasar del nivel inferior (levadura CBS 381) al nivel superior (levadura CBS 422) se produjo menos etanol. En cambio, el efecto del Brix fue positivo, es decir, al aumentar el Brix, aumento el etanol producido. La interacción significativa entre los factores debe interpretarse indicando que la magnitud del efecto del Brix es diferente para cada levadura.

Cuadro 22. Análisis de variancia (ANDEVA) de los experimentos del diseño factorial 2⁴

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado del Promedio	F	P
Modelo	79.85	3	26.62	41.94	<0.0001
A-Levadura	41.25	1	41.25	64.99	<0.0001
B-Brix	18.73	1	18.73	29.50	<0.0001
AB	9.47	1	9.47	14.92	0.0014
Desajuste del modelo	8.24	12	0.69	1.44	0.3913
Error experimental	1.91	4	0.48		

Fuente: FODECYT 003-2012

El ajuste del modelo fue significativo y consideró el 87 % de la variación de los datos ($R^2_{ajustado} = 0.866$).

El modelo matemático para la levadura CBS 381 que predice la cantidad de etanol (E) producido fue:

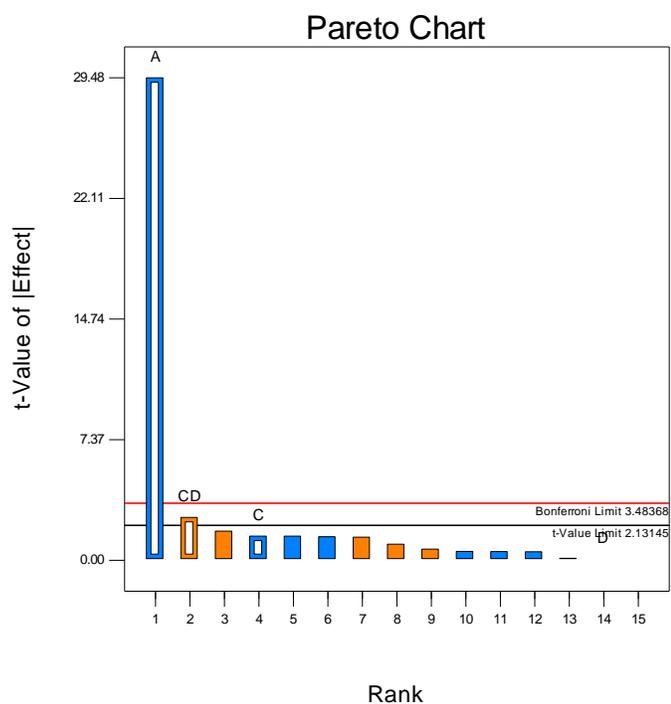
$$E = -3.97 + 0.7405 * \text{Brix}$$

El modelo matemático para la levadura CBS 422 fue:

$$E = 0.5075 + 0.125 * \text{Brix}$$

Los efectos sobre el consumo de azúcar de los diferentes factores o variables se observa en el Grafica 50, en donde se comparan efectos primarios e interacciones binarias, terciarias y cuaternarias. Se observa un efecto negativo de la variable primaria A. Es decir, la levadura CBS 381 mostró un mayor consumo de azúcar que la levadura CBS 422, También puede verse un efecto positivo levemente significativo de la interacción entre los dos nutrientes, el extracto de levadura C y el fosfato de amonio D.

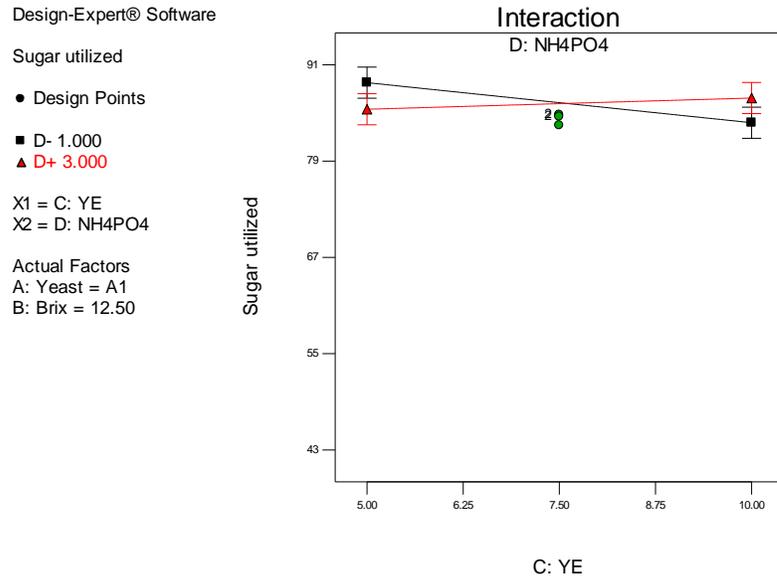
Gráfica 50. Comparación de los efectos de los factores sobre el consumo de azúcares



Fuente: FODECYT 003-2012

El efecto de la interacción puede observarse en la Grafica 51. Si el nivel del fosfato es bajo, el incremento del extracto de levadura al inicio de la fermentación, causa un menor consumo de azúcar. Por el contrario, si el nivel del fosfato es alto, ocurre lo contrario.

Grafica 51. Interacción entre YE y FA



Fuente: FODECYT 003-2012

El análisis de variancia confirmó la significancia estadística de los efectos, como puede observarse en el Cuadro 23.

Cuadro 23. Análisis de variancia (ANDEVA) de los experimentos del diseño factorial 2⁴

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado del Promedio	F	P
Modelo	7341.36	4	1835.34	309.12	<0.0001
A-Levadura	5158.11	1	5158.11	868.78	<0.0001
C-YE	12.89	1	12.89	2.17	0.1613
D-FA	0.058	1	0.058	0.0097	0.9228
CD	40.77	1	40.77	6.87	0.0193
Desajuste del modelo	69.01	11	6.27	1.25	0.4495
Error experimental	20.04	4	5.01		

Fuente: FODECYT 003-2012

El ajuste del modelo fue significativo y consideró el 98 % de la variación de los datos (R^2 ajustado = 0.985).

El modelo matemático para la levadura CBS 381 que predice la cantidad de azúcar (A) consumida fue:

$$A = 98.60625 - 1.636 * YE - 4.84875 * FA + 0.6385 * YE * FA$$

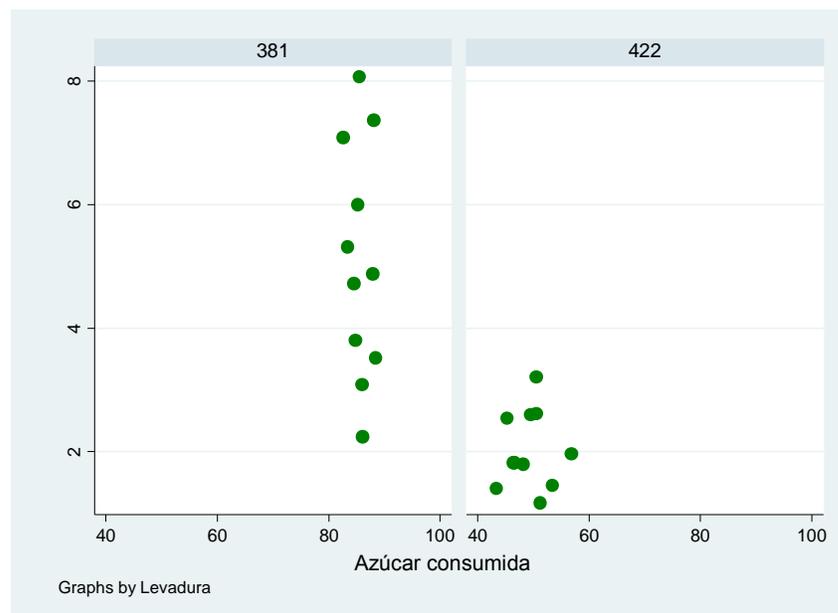
El modelo matemático para la levadura CBS 422 fue:

$$A = 62.69625 - 1.636 * YE - 4.84875 * FA + 0.6385 * YE * FA$$

Resumiendo, esta experiencia permitió: a) identificar a la levadura CBS 381 como excelente productora de etanol y consumo de azúcar del jugo de sorgo dulce, b) establecer un ligero efecto positivo de suplementar el jugo de sorgo dulce con nitrógeno inorgánico u orgánico para lograr un mejor consumo de azúcar.

La Gráfica 52 muestra la producción de etanol en función del azúcar consumido por las dos levaduras, lo cual permite compararlas.

Gráfica 52. Comparación de la efectividad de las levaduras CBS 381 y CBS 422



Fuente: FODECYT 003-2012

Conociendo que el factor levadura y la concentración inicial de azúcar en el jugo de sorgo eran los factores importantes en la primera etapa de fermentación para producir etanol, se

realizó un diseño factorial 2^3 con la repetición del punto central seis veces, para un total de 14 experimentos, empleando el logicial *Design Expert 7.0.3*.

El nivel de los factores se encuentra en el Cuadro 24. Notar que se emplearon dos cepas nuevas de levadura y que dicha variable es de categoría. Además se suprimió la adición del nitrógeno orgánico contenido en el extracto de levadura.

Cuadro 24. Niveles de los factores en el diseño factorial 2^3

Factor	Nivel inferior	Nivel superior	Punto central
(A) Cepa de levadura	CBS 400	CBS 459	-
(B) Brix inicial jugo sorgo	14	17.5	15.0
(D) Fosfato de Amonio (FA), g/L	0	2	1

Fuente: FODECYT 003-2012

La matriz del diseño factorial se encuentra en el Cuadro 25. La unidad positiva indica el nivel superior del factor. La unidad negativa, el nivel inferior. El cero, el punto central. Notar que cada experimento es único, con la salvedad del punto central que se repite seis veces.

Cuadro 25. Matriz de experimentos del diseño factorial 2^3

Experimento	Levadura	Brix	EL	FA
1	CBS 400	0	0	0
2	CBS 400	0	0	0
3	CBS 459	-1	1	-1
4	CBS 400	-1	-1	1
5	CBS 459	0	0	0
6	CBS 400	1	-1	-1
7	CBS 400	0	0	0
8	CBS 459	-1	1	1
9	CBS 459	-1	1	1
10	CBS 459	1	-1	1
11	CBS 459	1	1	1
12	CBS 459	-1	-1	-1
13	CBS 400	0	0	0
14	CBS 400	1	1	-1

Fuente: FODECYT 003-2012

Las fermentaciones en los frascos estáticos se llevaron a cabo a 30 °C por 48 h. El resultado del etanol producido y el consumo de azúcares se muestra en el Cuadro 26.

Cuadro 26. Resultados de los experimentos del diseño factorial 2³

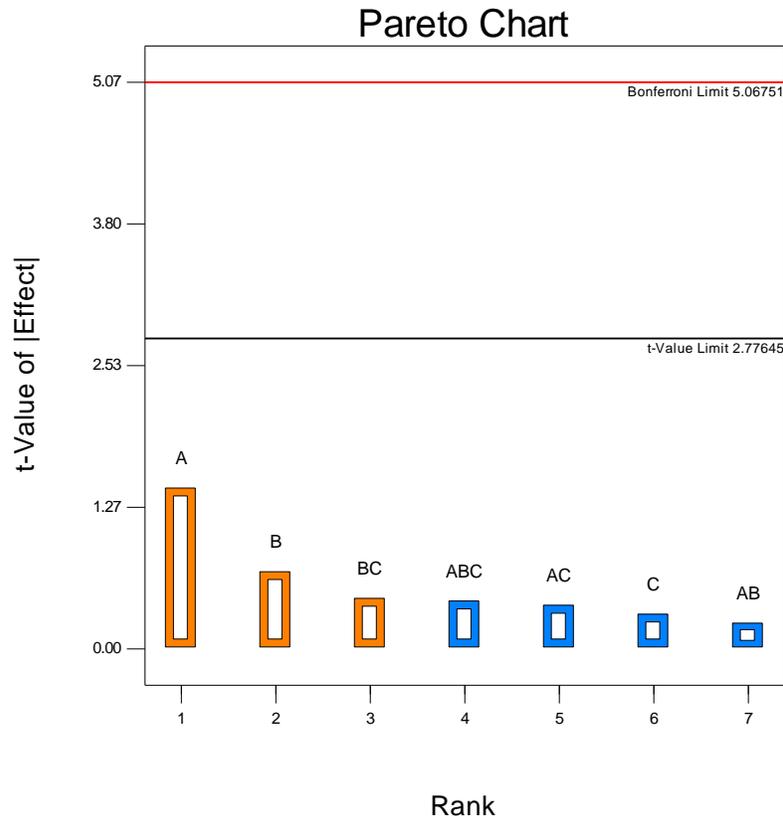
Experimento	Levadura	Etanol producido g %	Consumo de azúcares g %
1	CBS 400	5.09	95.17
2	CBS 400	6.32	96.04
3	CBS 459	4.28	93.62
4	CBS 400	5.09	96.77
5	CBS 459	6.20	93.46
6	CBS 400	5.58	96.72
7	CBS 400	4.01	96.22
8	CBS 459	6.82	93.17
9	CBS 459	7.13	93.29
10	CBS 459	7.73	93.31
11	CBS 459	7.69	92.66
12	CBS 459	9.21	93.37
13	CBS 400	5.04	96.42
14	CBS 400	5.94	96.78

Fuente: FODECYT 003-2012

La diferencia entre el valor máximo y mínimo obtenidos en las dos variables de respuesta fue de 5.20 g % y 3.61 g %, para el etanol producido y el consumo de azúcares, respectivamente. Lo anterior implica la existencia de efectos apreciables inducidos por los cambios en las variables sobre la producción de etanol. El consumo de azúcares fue alto en todos los casos. El rendimiento promedio de todas las pruebas, Y, de etanol producido sobre azúcar consumida, fue de 0.49 con una desviación estándar de 0.12. El valor teórico de dicho rendimiento para el tipo de levadura empleado es de 0.51, por lo que el promedio del rendimiento en todas las pruebas fue de un 96 % del teórico.

Los efectos sobre la producción de etanol de los diferentes factores o variables se observa en el Grafica 53, en donde se comparan efectos primarios e interacciones binarias, y terciarias. Se observa que no existen efectos significativos

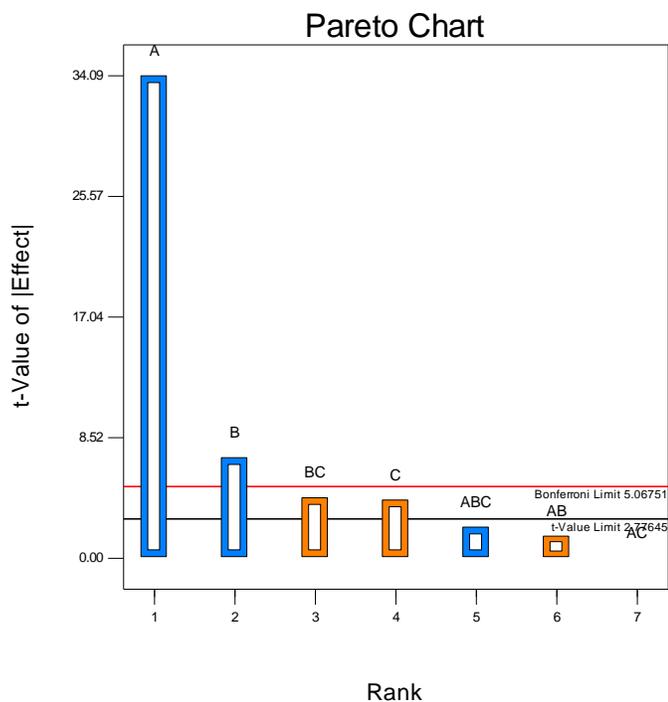
Gráfica 53. Comparación de los efectos de los factores sobre la producción de etanol



Fuente: FODECYT 003-2012

Los efectos sobre el consumo de azúcar de los diferentes factores o variables se observa en el Grafica 54, Pueden observarse efectos significativos y negativos de las variables levadura (A) y concentración de Brix (B). Lo anterior implica que la levadura CBS 459 consumió más azúcar que la levadura CBS 400, además, al aumentar el Brix inicial el consumo de azúcares fue menor. También se observa efectos significativos y positivos de la cantidad de fosfato (C) y la interacción entre Brix (B) y fosfato (C). Esto implica que la adición de fosfato es beneficiosa para aumentar el consumo de azúcares, pero la magnitud del efecto dependerá del valor del Brix inicial.

Gráfica 54. Comparación de los efectos de los factores sobre la producción de etanol



Fuente: FODECYT 003-2012

El análisis de variancia confirmó la significancia estadística de los efectos, como puede observarse en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Análisis de variancia (ANDEVA) de los experimentos del diseño factorial 2^3

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado del Promedio	F	P
Modelo	33.48	7	4.78	349.89	<0.0001
A-Levadura	15.89	1	15.89	1162.12	<0.0001
B-Brix	0.69	1	0.69	50.49	0.0021
C-FA	0.23	1	0.23	16.91	0.0147
BC	0.25	1	0.25	18.30	0.0129
Error experimental	0.06	4	0.01		

Fuente: FODECYT 003-2012

El ajuste del modelo fue significativo y consideró el 99 % de la variación de los datos ($R^2_{ajustado} = 0.995$).

El modelo matemático para la levadura CBS 400 que predice la cantidad de azúcar (A) consumida fue:

$$A = 95.963 - 0.358 * \text{Brix} + 0.169 * \text{FA} + 0.268 * \text{Brix} * \text{FA}$$

El modelo matemático para la levadura CBS 459 fue:

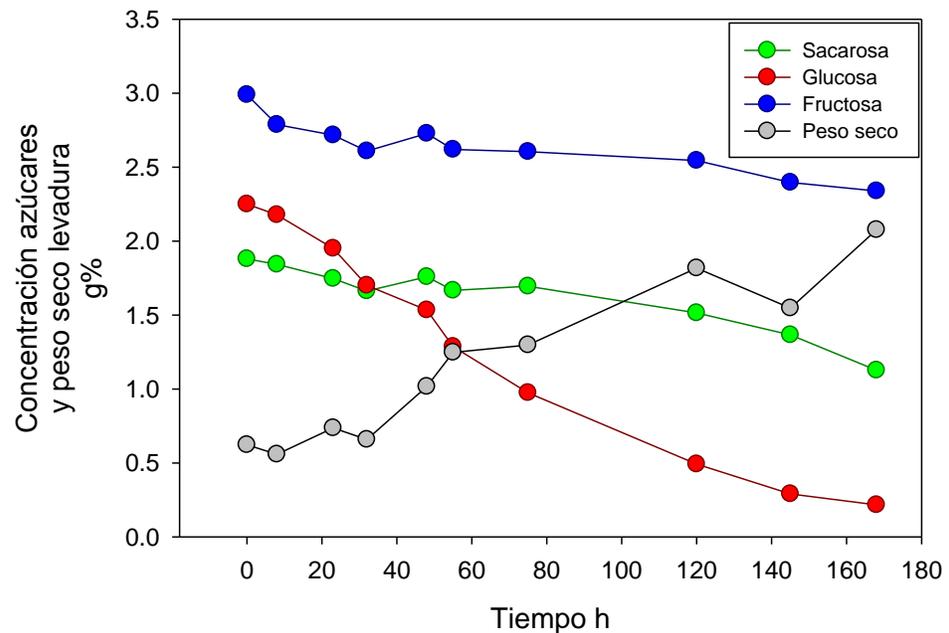
$$A = 93.144 - 0.229 * \text{Brix} + 0.171 * \text{FA} + 0.086 * \text{Brix} * \text{FA}$$

Resumiendo, esta experiencia permitió: a) identificar a la levadura CBS 459 como excelente productora de etanol y consumo de azúcar del jugo de sorgo dulce, b) establecer un efecto positivo de suplementar el jugo de sorgo dulce con nitrógeno inorgánico.

Luego de terminar la fermentación etanólica, se juntaron los contenidos de todos los frascos y se centrifugaron con el objeto de separar la biomasa de la levadura. Se obtuvo aproximadamente 1,200 mL. Luego se separó el etanol por destilación. El líquido residual de aproximadamente 672 mL con un pH de 4.8 se esterilizó en el fermentador de 1 litro. Al enfriar se inoculó con 70 mL de una suspensión de *Trichosporon oleaginosus DSM 11815*, con una densidad óptica de 1.70. Las condiciones en el fermentador fueron: a) control de pH, b) aproximadamente 12 % de pO₂ controlando las rpm (350) y 0.8 vvm.

Los resultados del crecimiento de la levadura oleaginosa y el consumo de los azúcares presentes durante 168 horas (7 días) de operación se muestran en la Gráfica 55.

Gráfica 55. Crecimiento de *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 expresado como g de peso de levadura por 100 mL y concentración de azúcares en el medio expresada como g por 100 mL.



Fuente: FODECYT 003-2012

Se observó lo siguiente: a) el peso seco alcanzado a los 7 días fue de 2.08 g %, b) la glucosa fue el azúcar que más rápidamente se consumió, luego la sacarosa y por último la fructosa, c) el consumo de los tres azúcares ocurrió desde el principio, d) la glucosa se consumió en un 90 % del original, e) la sacarosa en un 40 %, e) la fructosa en un 22 %, y f) el rendimiento de peso seco sobre el total de azúcares consumidos fue de 0.47.

La biomasa de levadura se recuperó por centrifugación y se deshidrató a temperatura ambiente. El contenido de aceite fue de 28.33 %. La productividad de aceite lograda fue de 0.035 g de aceite por litro de medio por hora.

III.1.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas

III.1.2.1 Aceites vegetales

Se realizaron una serie de experimentos para documentar el efecto de la concentración del catalizador alcalino y la proporción de los reaccionantes (alcohol y aceite) sobre la velocidad de reacción. Para esto se empleó una mezcla de aceites de soya y girasol comercial, etanol anhidro y el hidróxido de potasio (KOH) como catalizador. Así mismo se empleó el ultrasonido como

una fuente de zonas de cavitación acústica y de agitación. La temperatura empleada fue baja, oscilando entre 50 y 35 °C. Se utilizó el reactor de vidrio de una capacidad de 2 litros.

Se empleó un diseño factorial 2^2 con repetición del punto central. El nivel de los factores se encuentra en el Cuadro 28. Nótese que la proporción de los dos reaccionantes, el aceite y el etanol, está en moles; en cambio la concentración del catalizador está dada en % del peso del aceite empleado.

Cuadro 28. Niveles de los factores en el diseño factorial 2^2

Factor	Nivel inferior	Nivel superior	Punto central
(A) Relación molar etanol: aceite	8	10	9
(B) KOH % del peso de aceite	0.3	0.7	0.5

Fuente: FODECYT 003-2012

La amplitud de la probeta de ultrasonido fue de 90 %, operando por 3 seg en forma intermitente cada 10 seg. El total de la reacción fue de 1 hora. Se tomaron muestras periódicamente determinando el índice de refracción.

La matriz del diseño factorial se encuentra en el Cuadro 29. La unidad positiva indica el nivel superior del factor. La unidad negativa, el nivel inferior. El cero, el punto central. Notar que cada experimento es único, con la salvedad del punto central que se repite dos veces.

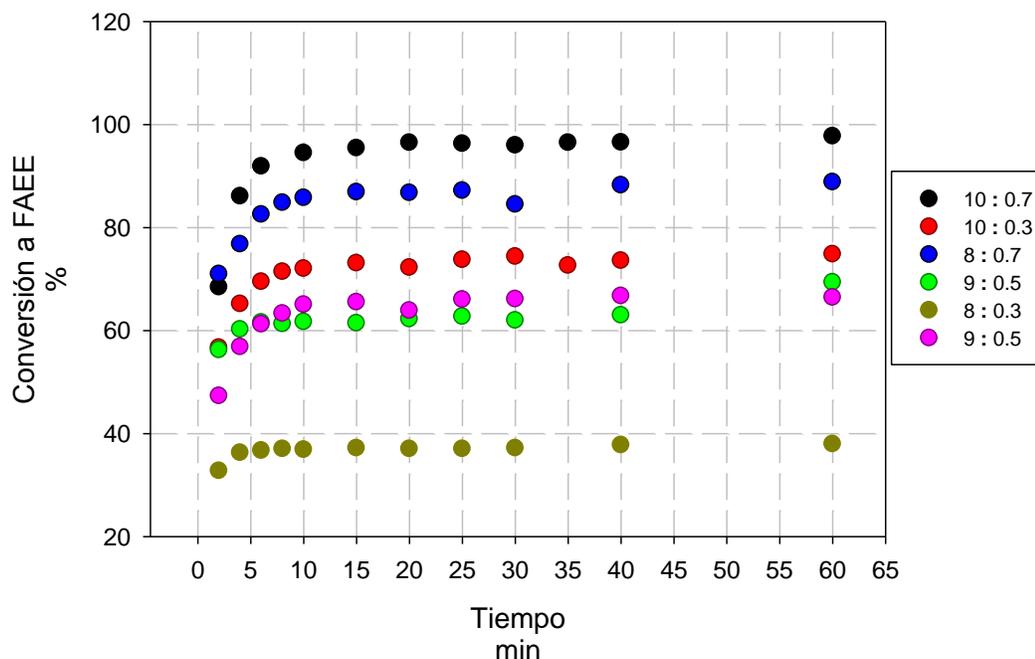
Cuadro 29. Matriz de experimentos del diseño factorial 2^2

Experimento	Relación etanol: aceite	KOH %
1	10	0.7
2	10	0.3
3	8	0.7
4	9	0.5
5	9	0.5
6	8	0.3

Fuente: FODECYT 003-2012

Los resultados experimentales de los seis experimentos se encuentran en el Anexo 4. En los cuadros debe notarse que el índice de refracción disminuye conforme progresa la reacción. Dicha disminución permite calcular el % de conversión empleando el modelo de Santos et al (2013). La conversión lograda se lista en la última columna de los cuadros. La Gráfica 56 muestra los resultados de los seis experimentos. Notar lo siguiente: a) la conversión lograda a 60 min varió en todos los casos, lo que demuestra el efecto que tuvieron los factores explorados, b) la mayoría de la conversión se logra en los primeros 10 a 15 min de reacción, b) la réplica del punto central dio resultados similares.

Gráfica 56. Conversión del aceite comercial en ésteres etílicos para los seis experimentos del diseño factorial



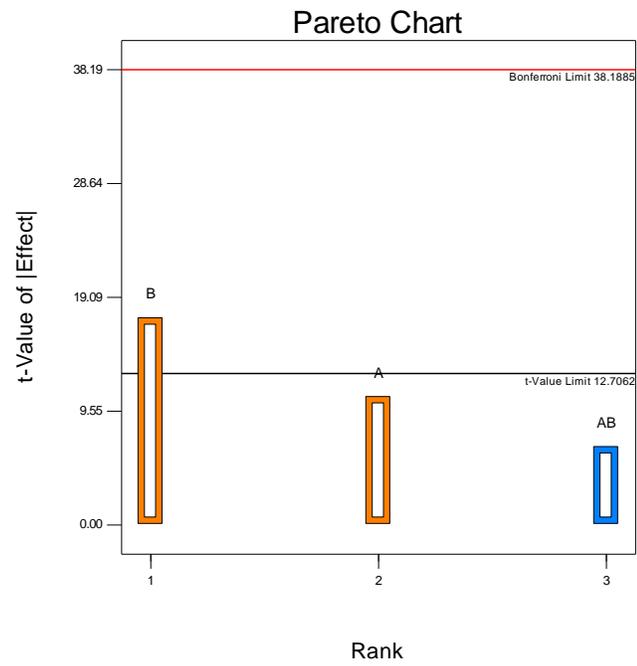
Fuente: FODECYT 003-2012

La Gráfica 57 muestra la magnitud de los efectos sobre la conversión a 60 min. Se observa claramente que el cambio en la concentración del catalizador fue relativamente el más significativo. La relación molar etanol/aceite y la interacción entre ambos factores tuvieron una menor influencia relativa sobre el resultado.

La Gráfica 58 muestra ahora la magnitud de los efectos sobre la conversión pero a los 5 min. En este caso los dos factores tienen una influencia significativa y la interacción entre ambos una relativamente menor.

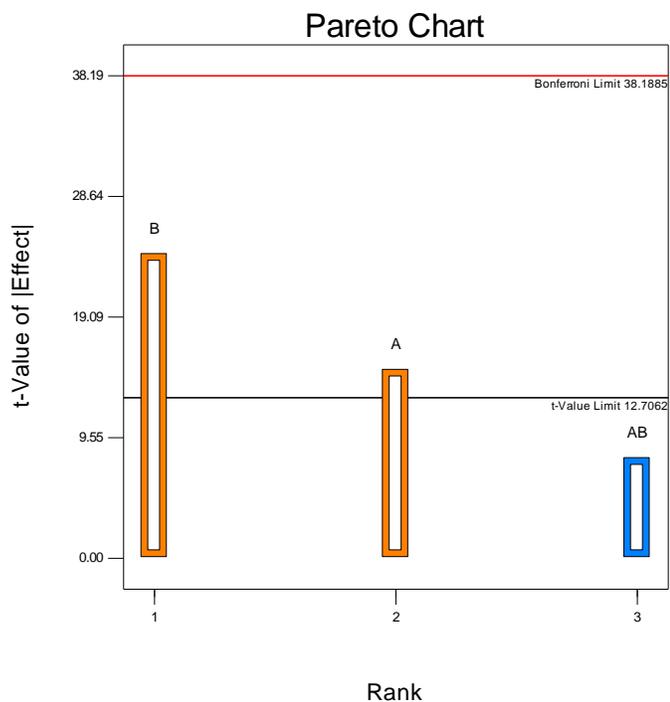
En ambos casos la conversión fue mayor al cambiar los factores de su nivel bajo al nivel alto, en otras palabras, la conversión aumento cuando inicialmente había mayor cantidad de etanol y de KOH.

Gráfica 57. Magnitud de los efectos al analizar la conversión lograda a los 60 min de reacción



Fuente: FODECYT 003-2012

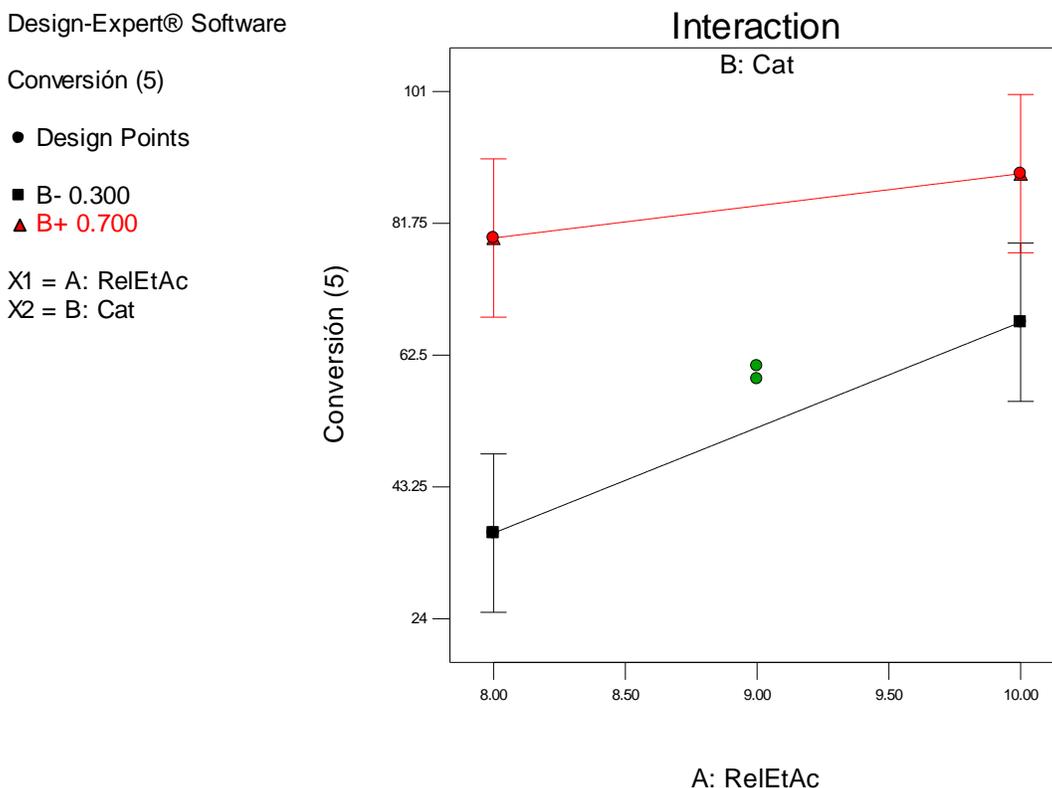
Gráfica 58. Magnitud de los efectos al analizar la conversión lograda a los 5 min de reacción



Fuente: FODECYT 003-2012

La Gráfica 59 muestra la interacción entre los dos factores. Se observa que la conversión aumentó cuando la relación molar de etanol: aceite se incrementó, pero la magnitud fue mayor cuando la concentración del catalizador era la menor.

Gráfica 59. Interacción de los factores a una conversión experimental de 5 min de reacción



Fuente: FODECYT 003-2012

La significancia de los factores queda corroborada por los resultados de ANDEVA mostrados en el Cuadro 30.

Cuadro 30. Análisis de variancia (ANDEVA)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado del Promedio	F	P
Modelo	1568.26	3	522.75	289.61	0.0432
A-Etanol: aceite	404.01	1	404.01	223.83	0.0425
B-Catalizador	1049.76	1	1049.76	581.58	0.0264
C-AB	114.49	1	114.49	63.43	0.0795
Error experimental	1.80	1	1.80		

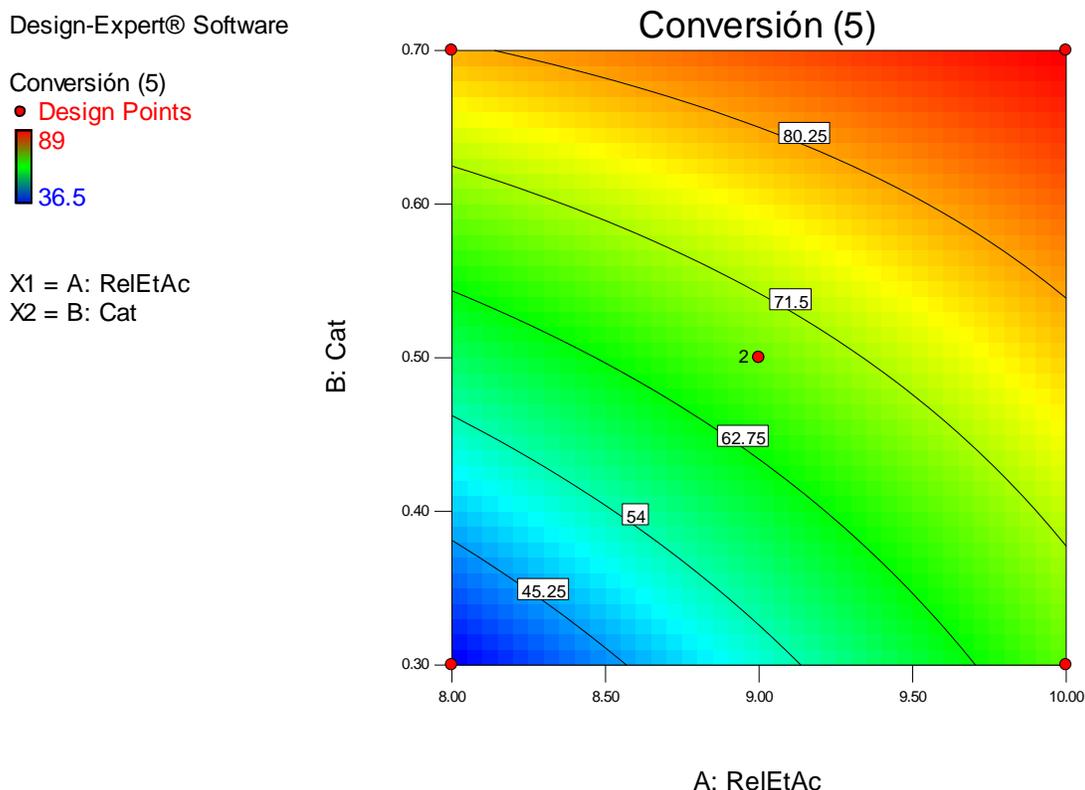
Fuente: FODECYT 003-2012

El modelo obtenido explica el 99.54 % de los datos (R^2 ajustado = 0.9954). La ecuación resultante que permite estimar la conversión a los 5 min de reacción es la siguiente, en donde Et:Ac es la relación molar de etanol: aceite y Cat es la concentración del catalizador.

$$\text{Conv}(5) = -183.225 + 23.425 \cdot \text{Et:Ac} + 321.75 \cdot \text{Cat} - 12.75 \cdot \text{Et:Ac} \cdot \text{Cat}$$

La simulación de la conversión predicha por la ecuación generada se presenta en la Gráfica 60. Se observa que la mayor conversión se logra en los niveles altos de los dos factores.

Gráfica 60. Simulación de la conversión a 5 min calculada por el modelo matemático generado



Fuente: FODECYT 003-2012

En base a los ensayos anteriores se realizó una prueba con 1.0 % de KOH (catalizador) y una relación molar etanol: aceite de 8. El reactor se operó por una hora a 40 °C, con agitación mecánica baja, empleando la probeta de ultrasonido a una amplitud de 60 %, con un ciclo repetitivo de operación de 3 seg seguido de un descanso de 10 seg.

El índice refracción inicial fue igual a 1.46732 y al final de la reacción de 1.45010, equivalente a un 87.5 % de conversión. Luego de unas horas de reposo el líquido se separó en dos fases, como se muestra en la Gráfica 61.

Gráfica 61. Separación de fases en el reactor al finalizar la reacción



Fuente: FODECYT 003-2012

Se separó la fase superior, se lavó con agua y se analizó por cromatografía de gases. El Cuadro 31 lista la distribución de ésteres de etilo obtenida. La suma no es igual al 100 % ya que se obtuvieron en menor cantidad ésteres de otros ácidos grasos y además el producto todavía mostraba cantidades pequeñas de glicerol y etanol. En las dos últimas columnas se han anotado rangos representativos de valores de los ácidos grasos presentes en los aceites de girasol y de soya (Feofilova et al, 2010). Puede observarse que la mezcla de estos dos aceites convertida a ésteres etílicos en este trabajo es similar en la distribución de los ácidos grasos.

Cuadro 31. Análisis de la distribución de ésteres de etilo

Ester	%	Aceite de girasol %	Aceite de soya %
Palmitato de etilo C16:0	13.21	3-10	7-14
Estearato de etilo C18:0	6.36	1-10	1-6
Oleato de etilo C18:1	8.35	14-65	19-30
Linoleato de etilo C18:2	51.82	44-69	44-62

Fuente: FODECYT 003-2012

III.1.2.2 Transesterificación *in situ* o reacción extractiva de residuo de café

El contenido de aceite en gramos % base seca en el residuo de café fue de 10.17 % al emplear hexano como solvente y de 19.99 % cuando se empleó etanol absoluto.

La distribución de ácidos grasos del aceite extraído con los dos solventes anteriores se muestra en el Cuadro 32. Se observa que la distribución de ácidos grasos es similar entre los dos aceites extraídos con diferentes solventes.

Cuadro 32. Análisis de la distribución de ácidos grasos en el aceite extraído empleando dos solventes el hexano y el etanol

Ácido graso	Hexano	Etanol
Palmitato C16:0	36.82	36.17
Estearato C18:0	7.20	7.19
Oleato C18:1	8.56	9.31
Linoleato C18:2	43.09	42.98
Linolenato C18:3	4.33	4.35

Fuente: FODECYT 003-2012

La composición obtenida de ésteres etílicos libres de etanol en las dos fases separadas por centrifugación se presenta en el Cuadro 33. Se observa que se produjeron los ésteres etílicos de los dos ácidos grasos mayoritarios del aceite extraído, el palmítico y el linoleico. Puede decirse que la extracción y reacción simultáneas resultó exitosa.

En el Anexo 5 se presenta el cromatograma que resume el análisis efectuado con las diferentes muestras.

Cuadro 33. Análisis de la distribución de ésteres de etilo en las fases separadas del aceite contenido en el residuo de la extracción de café

Ester	Fase aceitosa %	Fase líquida %
Palmitato de etilo C16:0	44.20	55.27
Linoleato de etilo C18:2	38.31	40.84

Fuente: FODECYT 003-2012

El peso de ésteres etílicos producidos fue de 0.69 gramos. La eficiencia de conversión en base a la cantidad de aceite inicial en el residuo de café extraído, fue de 33.76 %.

III.1.2.3 Transesterificación *in situ* o reacción extractiva de semillas de ajonjolí

El contenido de aceite en gramos % base seca en la semilla de ajonjolí fue de 60 % al emplear hexano como solvente y de 30 % cuando se empleó etanol absoluto.

La distribución de ácidos grasos del aceite extraído con los dos solventes anteriores se muestra en el Cuadro 34. Se observa que la distribución de ácidos grasos es similar entre los dos aceites extraídos con diferentes solventes.

Cuadro 34. Análisis de la distribución de ácidos grasos en el aceite extraído empleando dos solventes el hexano y el etanol

Ácido graso	Hexano	Etanol
Palmitato C16:0	10.39	9.50
Oleato C18:1	46.43	43.19
Linoleato C18:2	43.18	39.91

Fuente: FODECYT 003-2012

La composición obtenida de ésteres etílicos libres de etanol se presenta en el Cuadro 35. Se observa que la proporción de los ésteres etílicos fue similar a la proporción de los ácidos grasos en el aceite original. Puede decirse que la extracción y reacción simultáneas resultó exitosa.

En el Anexo 6 se presenta el cromatograma que resume el análisis efectuado con las diferentes muestras.

Cuadro 35. Análisis de la distribución de ésteres de etilo en las fases separadas del aceite contenido en el residuo de la extracción de café

Ester	Fase aceitosa %
Palmitato de etilo C16:0	9.36
Oleato C18:1	37.32
Linoleato de etilo C18:2	37.31

Fuente: FODECYT 003-2012

III.1.3 Estimación del costo de producción

Se tomó como base el estudio de análisis técnico económico elaborado por Apostolakou et al (2009) el cual se ha reproducido en el Anexo 7. El análisis de la estimación del costo de producción fue elaborado para una planta de una capacidad anual de 50,000 toneladas de biodiesel al año, operada por lotes, empleando aceite de colza, metanol y catálisis alcalina con metóxido de sodio. La inversión fija requerida fue estimada en M\$ 9.37. El costo de producción se estimó en \$ 1.175 por litro, equivalente a Q 34.24/ galón. El costo de las materias primas (aceite, metanol y catalítico) representó el 87 % del costo de producción.

El estudio base se adaptó a las condiciones locales utilizando algunos de los resultados experimentales del proyecto. Se listan a continuación algunas de las observaciones obtenidas.

- a) La capacidad de producción de biodiesel del estudio base es de 50,000 toneladas por año. De acuerdo con los autores del estudio, esa capacidad sería la mínima permisible para lograr una rentabilidad de acuerdo a los parámetros económicos existentes en los países de la Unión Europea.
- b) La capacidad de producción anterior equivale a M 57.4 de litros por año.
- c) En Guatemala dicha cantidad puede mezclarse en un 5% con diésel importado para llenar la demanda actual de 1,200 M de litros por año.
- d) Con esa proporción de mezcla no existe problema alguno con los motores de combustión por compresión o diésel.
- e) De acuerdo con el estudio es necesario procesar 50,800 Mg/ año de aceite refinado, suponiendo una conversión del 99 % y una recuperación final del 99 %. Cifras que a nuestro criterio son exigentes y difíciles de cumplir en la operación industrial diaria.

- f) En el país el principal cultivo de semilla oleaginosa es la palma y se estima que se cultivan alrededor de 130,000 ha con un rendimiento aproximado de aceite de 3.7 Mg/ha. Por lo tanto, sería necesario adicionar alrededor de 13,730 ha. La cifra anterior es cerca del 10 % del área actualmente cultivada, lo cual es factible.
- g) El otro cultivo de semilla oleaginosa es el ajonjolí, del cual se cultivan alrededor de 38,500 ha con un rendimiento de aceite de 0.45 Mg/ha. Por lo tanto tendrían que cultivarse 288, 890 ha, o sea 7.5 veces más del área actualmente cultivada.
- h) Lo anterior indicaría que es la palma la materia prima que debería considerarse. Sin embargo, podrían existir otros elementos de juicio. El cultivo de la palma ha causado en años recientes un rechazo social, entre otras causas, el deterioro de la biodiversidad y la contaminación ambiental. Por otro lado, el proceso del ajonjolí dejaría un valioso subproducto en el residuo sólido libre de aceite y enriquecido en proteína, el cual tendría demanda en la elaboración de concentrados para animales mono gástricos en sustitución de la soya actualmente importada, cuyo precio oscila entre US\$ 340 a 400 por tonelada.
- i) Las otras alternativas en el país serían a) fuentes de subproductos, como la semilla de hule y el residuo sólido de la extracción de café y b) el aceite vegetal usado reciclado de la industria de alimentos. Estas fuentes en el país se estima son relativamente pequeñas, se encuentran dispersas por lo que hay un costo de recolección y no cubrirían la demanda de aceite que requeriría la planta.
- j) Lo que es importante recalcar, como se mencionó en la sección del Marco Teórico, es que el proceso tendría que incluir una planta extractora del aceite de la semilla. Y aún más, podría también poseer tierra suficiente para cultivar la planta oleaginosa, de manera que en la estructura de costos se eliminarían los costos de los pasos intermedios, es decir, la venta de la semilla y la venta del aceite.
- k) La sustitución del metanol por etanol, como se propone en este trabajo, tiene, desde el punto económico, menos peso en el costo de producción. Aunque actualmente el costo del etanol es aproximadamente tres veces mayor que el del metanol, el aumento en el costo de producción por emplear etanol es únicamente alrededor de un 8 %. Por otro lado, el metanol tendría que ser totalmente importado y no es un producto sustentable dado que se produce de recursos fósiles.
- l) La alternativa investigada en el presente trabajo de extraer y reaccionar en forma simultánea el aceite extraído tendría un atractivo económico considerable, dado que incidiría específicamente en el costo del aceite. Como se demostró en este trabajo dicho proceso es técnicamente factible, sin embargo, a la fecha, y de acuerdo con nuestro conocimiento, no existe una planta comercial funcionando con este tipo de tecnología. Se cree sin embargo, que la situación cambiará en un cercano futuro.
- m) El estudio base no ha considerado la posible venta del glicerol, subproducto de la reacción.
- n) De hecho el concepto de un proceso, o como se ha denominado, una biorefinería, de producción de biodiesel que utilice el subproducto generado para mejorar la rentabilidad, ha sido estudiado previamente por Vlysidis et al (2011). Autores que propusieron la producción de ácido succínico a partir del glicerol producido de la transesterificación del aceite de colza, incluyendo también la venta de la torta rica en proteína resultante.

- o) En el presente estudio se ha considerado una materia prima oleaginosa diferente: el caso del aceite de origen microbiano, específicamente el de las levaduras oleaginosas. Esta fuente no convencional de aceite ha despertado interés tanto académico como económico.

Con el objeto de analizar la estructura de costos asociada a la producción de levaduras oleaginosas se utilizó como base el estudio de análisis técnico económico elaborado por Koutinas et al (2014) el cual se ha reproducido en el Anexo 8. El análisis de la estimación del costo de producción fue elaborado para una planta de una capacidad anual de 10,000 toneladas de biodiesel al año. La planta constaba de tres secciones: a) la producción de la levadura oleaginosa empleando glucosa y extracto de levadura como principales materias primas, b) la extracción del aceite de la biomasa de levadura empleando hexano como solvente, y c) la conversión del aceite a biodiesel, empleando metanol y catálisis alcalina con metóxido de sodio. La inversión fija requerida fue estimada en M\$ 113.32. El costo de producción se estimó en \$ 5.651 por litro, equivalente a Q 164.70/ galón. El costo de las materias primas (aceite, metanol y catalítico) representó el 58 % del costo de producción.

El estudio base se adaptó a las condiciones locales utilizando algunos de los resultados experimentales del proyecto. Se listan a continuación algunas de las observaciones obtenidas.

- a) Al estar la capacidad de la planta abajo del mínimo de 50,000 Mg/año la influencia que tiene sobre el costo de producción es alta y causa que el costo unitario de producción no sea competitivo en la estructura actual de precios de venta de los combustibles.
- b) La producción de 10,000 Mg/año podrían empelarse en el país para ofrecer una mezcla de aproximadamente 1% de biodiesel en diésel para llenar la demanda actual de 1,200 M de litros por año. La cifra anterior no es atractiva.
- c) La planta requiere aproximadamente 40,000 Mg/año de glucosa adquiridas a un costo de US\$ 400/ Mg. Es pertinente indicar que el precio actual de la glucosa granulada está entre 500 a 800 US\$/ Mg.
- d) Localmente la glucosa podría obtenerse si existiese una plantación comercial de sorgo dulce. En realidad, el jugo prensado del tallo de esta planta en la madurez contiene sacarosa, glucosa y fructosa en ese orden. Los ensayos llevados a cabo en este trabajo demostraron que las dos levaduras oleaginosas crecieron sin dificultad en dicho medio. La productividad anual del tallo estaría alrededor de las 100 Mg/ ha en base húmeda. En términos de azúcar la cifra estaría alrededor de 18 Mg/ ha. Por lo tanto el tamaño de la plantación del sorgo dulce sería alrededor de 2,200 ha, área equivalente a aproximadamente 1 % del área actual cultivada con caña de azúcar. Si se estima que el costo de producción de una hectárea de sorgo dulce y de la extracción y concentración del jugo del tallo en US\$ 500.00, el costo de la tonelada de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) estaría alrededor de US\$ 28.00.
- e) Lo anterior significaría un costo de producción del biodiesel de alrededor de Q 113. Una disminución de aproximadamente un 32 %. Aun así el costo unitario de producción no resulta competitivo en la estructura actual de precios de venta de los combustibles.
- f) Otro factor importante en la estructura de costos es el costo del equipo de producción de la levadura. Esto se origina por la lenta velocidad de crecimiento y la velocidad de acumulación de grasa dentro de la célula. En el estudio base se empleó la levadura

Rhodospiridium toruloides, con un rendimiento de biomasa de 106.5 g/L, con un contenido de aceite de 67.5 %, equivalente a una productividad de aceite de 0.54 g/Lh. Estas cifras son de las mejores informadas en la literatura. Por lo tanto resulta remoto poder disminuir los costos de inversión.

III.2 Discusión de resultados

III.2.1. Experimentos con levaduras

III.2.1.1 Azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa

Las pruebas iniciales del crecimiento de las levaduras oleaginosas en azúcares solubles tuvieron como objetivos: a) comprobar la tasa y el grado de asimilación de los mismos durante el crecimiento y b) establecer el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno para estimular el crecimiento.

La constante de crecimiento obtenida en las pruebas iniciales de dos medios de cultivo, glucosa enriquecida con nitrógeno orgánico y jugo de sorgo dulce enriquecido, tanto con nitrógeno orgánico como nitrógeno inorgánico, osciló entre 0.05 a 0.09 h⁻¹ para las dos levaduras ensayadas. Datos obtenidos de gráficas de crecimiento en trabajos reportados en la literatura sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Trichosporon* en glucosa, indican constantes de crecimiento entre 0.01 a 0.03 h⁻¹, (Zhu et al, 2008; Hu et al, 2011; Chen et al, 2012; Schulze et al, 2014) cifras inferiores a las obtenidas en esta experimentación. Por el contrario datos similares para *Yarrowia*, muestran constantes de crecimiento entre 0.10 a 0.11 h⁻¹, cifras ligeramente superiores a las acá observadas.

Por otro lado, los mejores rendimientos logrados de biomasa seca por carbohidrato consumido, iguales a 0.39 para *Trichosporon* en jugo de sorgo enriquecido con fosfato de amonio y de 0.29 para *Yarrowia* en glucosa enriquecida con nitrógeno orgánico, fueron cifras aceptables.

Cuando *Yarrowia* creció en jugo de sorgo, el consumo de azúcares reductores fue mayor que el consumo de sacarosa. Se conoce que esta levadura tiene problemas metabólicos para utilizar eficientemente la sacarosa (Sitepu et al, 2014b). Por el contrario, *Trichosporon* asimiló glucosa, sacarosa y fructosa en ese orden.

En estas pruebas iniciales se cuantificó el contenido de aceite de la biomasa seca de la levadura producida con el objeto de desarrollar la metodología de análisis. Las cifras obtenidas de aceite fueron relativamente bajas, pero como se explicó en el Marco Teórico de este informe, las levaduras oleaginosas durante el crecimiento en presencia de un exceso de nitrógeno en el medio no acumulan grasa intracelular (Sitepu et al, 2014a) por lo que el resultado obtenido era de esperarse.

El contenido de ácidos del aceite recuperado de la biomasa seca de *Trichosporon* se compara en el Cuadro 36 con análisis de otras cepas de *Trichosporon* informadas en la

literatura. Coincidieron los análisis en la distribución y proporción de los ácidos grasos presentes, aunque no en las cifras absolutas de los mismos. Esto último era de esperarse debido a la variación intrínseca entre cepas y por diferencias en el proceso empleado para su crecimiento. Se observa que el ácido oleico es predominante, seguido del palmítico, el esteárico y linoleico en proporción similar.

Cuadro 36. Contenido de ácidos grasos, %, en el aceite de *Trichosporon* comparado con el de otras cepas: *T. olaeginosus* (Zhang et al, 2014); *T. cutaneoum* (Chen et al, 2012; Hu et al, 2011) *T. dermatitis* (Huang et al, 2012) *T. guebophae* (Sitepu et al, 2013) *T. porosum* (Schulze et al, 2014) *T. capitatum* (Wu et al, 2011)

Ácido	Este trabajo	oleaginosus	cutaneoum	cutaneoum	dermatitis	guehohae	porosum	capitatum
Palmítico, C16:0	26.6	14.0	25.5	40.9	27.7	19.0	20.3	7.0
Palmitoleico, C16:1	2.4	8.6		0.9		0.7	0.3	1.0
Esteárico, C18:0	8.3	18.4	14.2	16.2	13.6	21.7	16.2	1.1
Oleico, C18:1	44.8	19.9	48.0	40.8	43.4	41.7	40.0	79.8
Linoleico, C18:2	8.9	13.6	6.8	1.1	10.0	13.8	18.2	8.0

Fuente: FODECYT 003-2012

Dos aspectos importantes en cuanto a la composición del medio empleando jugo de sorgo como fuente de carbono fueron: a) las dos levaduras mostraron una inhibición cuando la concentración del azúcar era alta. No se determinó el umbral de azúcar en donde ocurre esta inhibición pues solo se efectuó una prueba con un Brix inicial de 17.3.; y b) la cantidad de biomasa producida por las dos levaduras fue independiente si se empleaba una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico. Como se ejemplifica en detalle en los Anexos 1 y 2, investigadores previos han empleado ambas fuentes de nitrógeno, por separado, o en mezclas, sin ofrecer razonamientos específicos de su selección.

III.2.1.2 Hidrolizados de lignocelulosa

Se determinó que los mejores resultados se obtuvieron en los hidrolizados ácidos del bagazo de sorgo dulce empleando la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075. En 7 días de cultivo se obtuvo 2.77 g/L de biomas seca de levadura con un contenido de aceite de 28.27 %. Lo anterior equivale a 0.0047 g aceite por litro por hora de cultivo. La anterior cifra se encuentra entre los valores informados en el Anexo 2 en pruebas empleando *Yarrowia* en

hidrolizados ácidos (Tsigie et al 2011; Yu et al 2011). Recientemente, Chang et al (2015) informaron una productividad de 0.08 g/L.h empleando *Cryptococcus* sp. SM5S05 en un hidrolizado de olote de maíz.

En general, las productividades de aceite obtenidas con hidrolizados son más bajas que al emplear carbohidratos naturales. Por esta razón, se decidió buscar la posibilidad de un proceso consolidado para utilizar el jugo de sorgo dulce.

III.2.1.3 Proceso de dos etapas en secuencia

Como se explicó anteriormente el procedimiento de dos etapas en secuencia permitió producir dos biocombustibles, el etanol y el biodiesel, con la utilización de una misma materia prima, el jugo de sorgo dulce obtenido al prensar el tallo, en dos etapas consecutivas, empleando dos levaduras diferentes.

En la primera etapa, los dos diseños experimentales efectuados con jugos de sorgo dulce conteniendo entre 10 a 17.5 g de sólidos disueltos/100mL, medidos por el Brix, permitieron identificar a las levaduras CBS 381 y CBS 459 como excelentes productoras de etanol y consumidoras del azúcar del jugo de sorgo dulce, como también permitió establecer un efecto positivo de suplementar el jugo de sorgo dulce con nitrógeno inorgánico. Por otro lado, se identificaron las levaduras CBS 400 y CBS 422, como levaduras con menor producción de etanol y consumo de azúcares. Las fermentaciones no pueden calificarse como procesos de alta gravedad (VGH como se denomina en inglés), ya que estos se desarrollan a concentraciones cerca de o arriba de los 30 g de sólidos disueltos/100mL. Estas concentraciones no se obtienen con un jugo de sorgo prensado, es necesario adicionar azúcares o evaporar parte del agua para lograrlo. Por ejemplo, Bvochora et al, (2000) fermentaron un jugo de sorgo al cual le agregaron sacarosa hasta llegar a 34 g de sólidos disueltos/100mL, adicionando a su vez grano de sorgo malteado y sin maltear. La máxima cantidad de etanol fue de 13.26 g/100 mL en 48 h de fermentación. Yue et al, (2012) fermentaron un jugo de sorgo dulce evaporado hasta 30 g de azúcares/100mL. Adicionaron urea hasta obtener una concentración de N en el medio de 0.8 g/100mL. Fermentaron por 60 h y lograron una concentración de etanol de 13.5 g/100mL. En la Universidad de Khan Kae en Tailandia se ha llevado a cabo una extensa investigación sobre el tema (Laopaiboon et al, 2009; Khongsay et al, 2012, 2014; Deesuth et al, (2012). Han encontrado condiciones óptimas al fermentar un jugo evaporado con 29 g de azúcares/100mL, adicionando 9 g/L de extracto de levadura, con una producción de 13.28 g/L de etanol, un consumo de azúcares de 88 %, en un total de 72 h de fermentación.

Debe notarse que en estas referencias el objetivo fue buscar el consumo total de azúcares y su transformación a etanol. Por el contrario, en la estrategia de este trabajo, se buscaba que la levadura productora de etanol no consumiera el total del azúcar inicial, de manera que dicha azúcar pudiera ser empleada por la levadura oleaginosa para crecer y acumular aceite.

Los resultados obtenidos en este proyecto con las cuatro levaduras y jugo de sorgo a las más altas concentraciones de azúcares totales iniciales se resumen en el Cuadro 37. Nótese que las levaduras CBS381 y CBS 459 produjeron más etanol y no consumieron el 14 y el 7 % aproximadamente del total de los azúcares iniciales. Por otro lado, la levadura CBS422 produjo

la menor cantidad de etanol con el menor consumo de azúcar. Las levaduras más adecuadas para la primera etapa serían la CBS381 y la CBS 459.

Cuadro 37. Resumen de las pruebas de producción de etanol y consumo de azúcares empleando las cuatro levaduras a las condiciones más altas de azúcar total inicial

	Azúcar total inicial g/100mL	Etanol final g/100mL	Consumo de azúcares % del original
CBS459	15.36	7.26	92.66
CBS400	15.36	5.71	95.61
CBS381	12.36	7.13	85.34
CBS422	12.36	2.38	49.44

Fuente: FODECYT 003-2012

Estudios recientes han informado sobre el crecimiento de levaduras oleaginosas en jugo de sorgo dulce. Cui y Liang (2015) emplearon la levadura *Cryptococcus curvatus* para fermentar mieles de sorgo dulce desde 11.7 hasta 34.0 g/100 mL de azúcares iniciales. Las mieles se prepararon agregando sacarosa al jugo prensado. Al operar un fermentador de manera de un lote alimentado, produjeron 23.6 g de biomasa seca/100 mL, con un contenido de 50.8 % de lípidos en 72 h. Lo anterior resultó en una productividad de aceite de 0.167 g/Lh. Dicha cifra es aproximadamente cinco veces mayor que la obtenida en este proyecto con *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* en donde la productividad de aceite lograda fue de 0.035 g de aceite por litro de medio por hora.

Por otro lado, Economou et al (2010) y Matsakas et al (2014; 2015) han empleado tallos de sorgo dulce en fermentaciones al estado sólido con el hongo oleaginoso *Mortierella isabellina* y las levaduras oleaginosas *Lipomyces starkeyi* y *Rhodospiridium toruloides*. La producción de aceite con las levaduras estuvo entre 0.033 y 0.057 g/Lh. Datos inferiores a al logrado en este proyecto.

La producción de etanol y bio-aceite (para producir biodiesel) a partir de jugo de sorgo dulce prensado, no ha sido informada en la literatura científica previa, de acuerdo a nuestro conocimiento, por lo que puede calificarse como innovadora. Durante la realización del proyecto se tuvo conocimiento de una estrategia con el mismo objetivo, pero empleando diferente materia prima (Morikawa et al, 2014). El diagrama de flujo mostrado en la Gráfica 62 permite visualizar el proceso, en donde la paja de trigo se sometía a una hidrólisis con ácido diluido. El líquido obtenido se empleaba para producir bioaceite con la levadura *Rhodospiridium toruloides*, y el sólido para producir etanol con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Lograron obtener 0.8 g de biodiesel (FAME) y 10.1 g de etanol.

Gráfica 62. Separación de fases en el reactor al finalizar la reacción

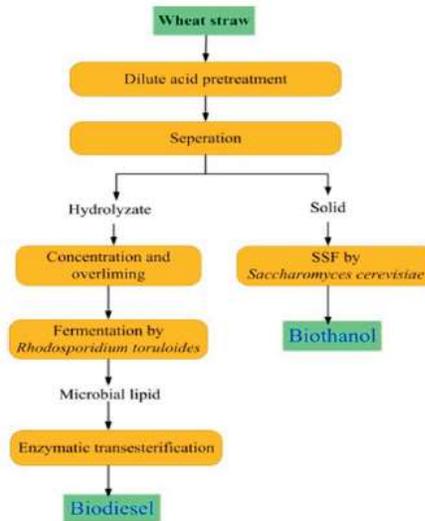


Fig. 1 Flow chart of the process to convert wheat straw to bioethanol and biodiesel.

Fuente: FODECYT 003-2012

III.2.2 Experimentos con aceites vegetales y semillas oleaginosas

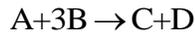
III.2.2.1 Aceite comercial

Los datos experimentales obtenidos demostraron que la mayoría de la conversión se lograba en los primeros 10 a 15 min de reacción. El modelo matemático obtenido por medio del diseño factorial de experimentos explicó el 99.54 % de los datos (R^2 ajustado = 0.9954). La ecuación resultante permite estimar la conversión a los 5 min de reacción en función de la relación inicial molar etanol: aceite, la concentración del catalítico expresada como % del aceite inicial empleado y de la interacción entre ambos factores. En esos experimentos la temperatura osciló entre 30 y 50 °C y la amplitud de la probeta de ultrasonido se mantuvo constante.

La conversión lograda de aproximadamente 88 % en las condiciones óptimas está entre los valores obtenidos por Georgogianni et al. (2008) con aceite de algodón y etanol empleando ultrasonido (Ver Anexo 3).

Los datos también se analizaron de acuerdo a la cinética de reacción en el período de mayor cambio, es decir hasta los 10 min. Empleando el método integral de análisis se analizó el modelos de reacción de segundo orden, el cual fue recomendado por Georgogianni et al. (2008) con el objeto de estimar la constante de reacción.

Empleando el razonamiento de Grant y Gude (2014) se tiene, en donde A representa a los triglicéridos y B al alcohol:



La ecuación de la cinética general para la ecuación mostrada es:

$$-\frac{dC_A}{dt} = kC_A^\alpha C_B^\beta$$

Las concentraciones de los reaccionantes en función del tiempo pueden expresarse en términos de la concentración inicial, subíndice 0, y el grado de conversión X, así:

$$\begin{aligned} C_A &= C_{A0}(1-X) \\ C_B &= C_{A0}(\theta_B - 3X) \\ \theta_B &= \frac{C_{B0}}{C_{A0}} \end{aligned}$$

Substituyendo las expresiones en la ecuación de la cinética general anterior, y luego de un poco de álgebra, se tiene:

$$\frac{dX}{dt} = kC_{A0}^{\alpha+\beta-1} (1-X)^\alpha (\theta_B - 3X)^\beta$$

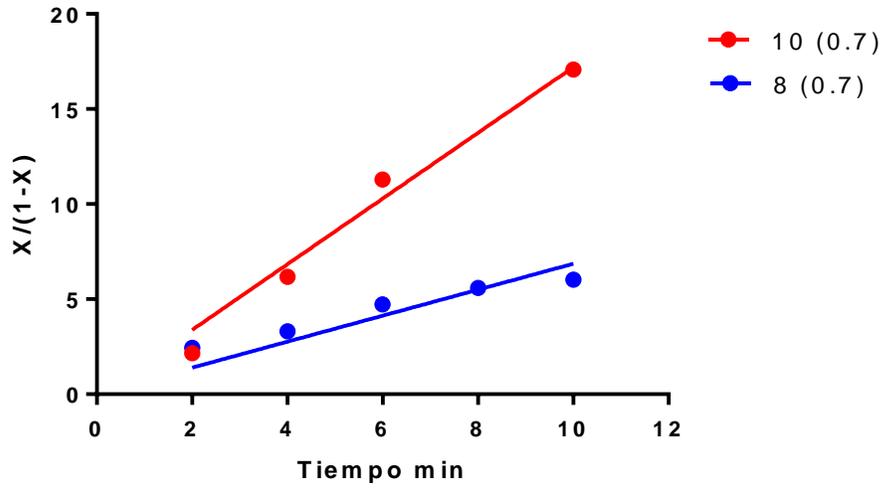
En los experimentos el alcohol se puso en exceso de manera que $\beta = 0$. Si se supone que el mecanismo de reacción es de segundo orden, $\alpha = 2$, por lo que la ecuación anterior puede integrarse respecto al tiempo, y luego de un poco de álgebra, se tiene:

$$\frac{X}{1-X} = kC_{A0}t$$

La relación anterior es un modelo lineal entre X y t, y significa que si se ajustan los datos experimentales, puede obtenerse el valor de la constante de reacción k.

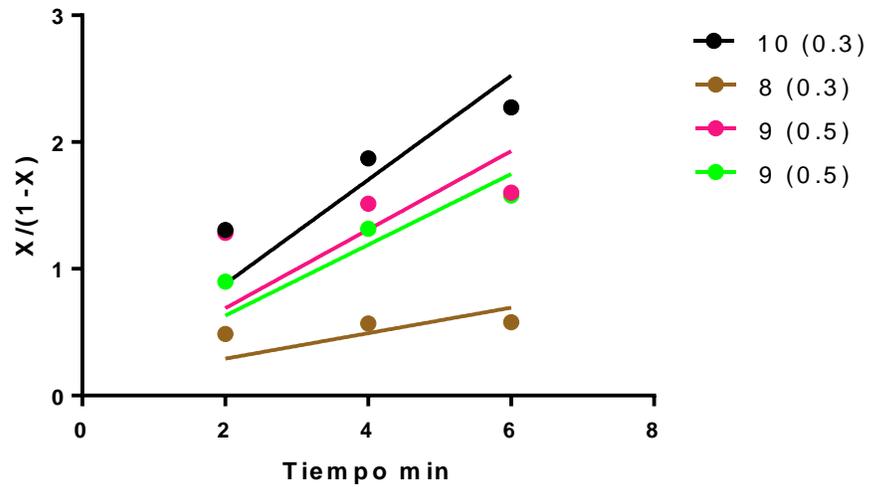
El resultado puede observarse en las Gráficas 63 y 64. La primera de ellas muestra el ajuste de los datos experimentales para las dos pruebas con la concentración mayor del catalizador en donde se lograron las mayores conversiones. La segunda gráfica, muestra el ajuste para las pruebas con un menor grado de reacción, en las que únicamente se utilizaron los primeros tres puntos experimentales.

Gráfica 63. Ajuste de los datos experimentales a un modelo de segundo orden para las pruebas con la mayor conversión



Fuente: FODECYT 003-2012

Gráfica 64. Ajuste de los datos experimentales a un modelo de segundo orden para las pruebas con la menor conversión



Fuente: FODECYT 003-2012

En el Cuadro 38 se presenta un resumen de los valores de la constante reacción de acuerdo con el ajuste de un modelo de segundo orden. Se observa lo siguiente: a) el valor estimado de la constante de reacción es significativo, b) la constante de reacción disminuye conforme disminuye la conversión lograda a los 60 min de reacción, y c) el ajuste de los datos al modelo de segundo orden se deteriora conforme el grado de conversión disminuye.

Cuadro 38. Valores experimentales de la constante de reacción en el modelo de segundo orden

Etanol: aceite (% KOH)	X (60 min)	k L/g min	R ²
10 (0.7)	97.7	1.7270 ± 0.08042	0.9903
8 (0.7)	88.8	0.6831 ± .05340	0.7812
10 (0.3)	74.8	0.4108 ± .05041	0.3692
9 (0.5)	69.4	0.3099 ± .06845	0.5013
9 (0.5)	66.4	0.2793 ± .03290	0.2410
8 (0.3)	38.0	0.1006 ± .02309	0.1691

Fuente: FODECYT 003-2012

III.2.2.2 Transesterificación *in situ* o reacción extractiva del residuo de café extraído

El residuo del café extraído de muestras de café originarias de once países productores de café mostró un contenido de aceite entre 7.0 y 12.4 % (Jenkins et al, 2014). El valor de 10.17 % obtenido en este trabajo empleando hexano como solvente está entre estos valores.

La distribución de ácidos grasos en el aceite de acuerdo con estudios de diferentes investigadores se muestra en el Cuadro 39. Se notan variaciones en la distribución pero todos los análisis concuerdan en que el ácido palmítico y el linoleico son mayoritarios. Lo anterior confirma los resultados similares obtenidos en este trabajo.

Cuadro 39. Resumen de la distribución de ácidos grasos en el aceite extraído del residuo de café

Ácido graso	Abdullah y Koc (2013)	Jenkins (2014)	Kondamudi (2008)	Oliveira (2006)	Rocha (2014)
Miristato C14:0				Traza	
Palmitato C16:0	27.8	32-51	51.4	34	35.9
Palmitoleico C16:1				Traza	
Estearato	6.24	7-8	8.3	7	7.5

C18:0					
Oleato C18:1	6.90	0-9		9	10.7
Linoleato C18:2	35.2	40-46	40.3	44	40.2
Linolenato C18:3	0.858				0.4
Behenico C20:0	2.07			0.3	
Arachidonico C20:4					2.6
Docosanoico C22:0				0.7	0.7

Fuente: FODECYT 003-2012

Dos publicaciones previas han empleado extracción del aceite del residuo de café conjuntamente con la aplicación de ultrasonido. Abdullah y Koc (2013) lograron extraer el 98 % del aceite en 30 min y redujeron la cantidad de hexano empleada. Rocha et al encontraron que una relación solvente-sólido de café igual a 4 mL por g, una temperatura de 60 °C y 45 min permitían maximizar la cantidad de aceite extraído. Por otro lado, no se ha reportado un trabajo de extracción reactiva o trans-esterificación *in situ* empleando el residuo extraído de café. Los datos preliminares informados en este trabajo son los primeros.

III.2.2.3 Transesterificación *in situ* o reacción extractiva del aceite en la semilla de ajonjolí

La semilla de ajonjolí es una de las semillas oleaginosas con mayor contenido de aceite, el cual oscila entre 37 y 63 % (Bart et al, 2010). La cifra de un 60 % reportada en este trabajo se encuentra entre estos valores. Es de notar la baja solubilidad encontrada cuando se empleó etanol como solvente.

La distribución de ácidos grasos en el aceite de acuerdo con varias fuentes se muestra en el Cuadro 40.

Cuadro 40. Distribución de ácidos grasos en el aceite de la semilla de ajonjolí

Ácido graso	Yen (1990)	Saydut et al (2008)	Bart et al (2010)
Palmitato C16:0	9.7	-	9.5
Estearato C18:0	5.4	-	4.4
Oleato C18:1	38.37	41.3	39.6
Linoleato C18:2	46.11	43.7	46.0

Fuente: FODECYT 003-2012

Los datos de este trabajo coinciden con los de la literatura y es de notar que este aceite es rico en grasos no saturados C18:1 y C18:2.

No se encontraron datos en la literatura de la trans-esterificación del aceite de ajonjolí con etanol o con la ayuda de ultrasonido. La única referencia es la Saydut et al (2008) quienes obtuvieron FAME con catálisis alcalina homogénea.

III.2.2.4 Aspecto económicos

Como se mencionó en las secciones de Marco Teórico y de Resultados se han efectuado una serie de estudios técnico económicos alrededor de diferentes estrategias de proceso para producir biodiesel (Bender, 1999; Zhang et al, 2003; Dorado et al, 2006; Haas et al, 2006, You et al, 2008; West et al, 2008; Sakai et al, 2009; Apostalakov et al, 2009, Marchetti 2011; de Carvalho Lopes et al, 2011; Jegannathan et al, 2011; Miller et al 2012). Los costos de producción reportados varían en un rango amplio debido a diferentes materias primas, a la estructura del proceso en sí y a las condiciones locales. Por ejemplo, Johnston y Holloway (2007) estimaron para los 10 países mayores productores de biodiesel costos de producción desde Q.14.28 hasta Q.49.83 por galón.

Se identificó al costo de la materia prima grasa en el proceso como el factor decisivo en fijar el costo de producción de los esteres éflicos o biodiesel. Por otro lado, se listaron una serie de anotaciones indicando las diferentes alternativas, en el ámbito nacional, para disminuir dicha cifra. Por ejemplo, la única materia prima capaz de surtir la demanda de aceite de la planta de biodiesel analizada resulto la palma. El costo actual de dicho aceite en el mercado internacional está alrededor de US\$ 600 por tonelada. La disminución de un 45 % en el costo del aceite empleado en el proceso tiene un efecto marcado en el costo de producción, el cual disminuiría hasta US\$ 0.58 por litro, o sean, Q 16.9 por galón.

Solo un estudio técnico-económico sobre la producción de biodiesel empleando levaduras oleaginosas se logró detectar en la literatura (Koutinas et al, 2014). En este estudio se constató que el costo de producción de biodiesel no es competitivo con la estructura de precios actuales de los combustibles. Los datos técnicos empleados por los autores fueron superiores a los logrados en este trabajo empleando *Trichosporon oleaginosus* y jugo de sorgo.

La alternativa propuesta en este trabajo de emplear jugo de sorgo de alta concentración de azúcar para producir en dos etapas consecutivas, utilizando dos distintas levaduras, pudiera paliar en parte el problema del costo de producción. Por un lado se tendrían dos productos para vender, el etanol y el biodiesel (FAEE). Por el otro es posible procesar la levadura productora de etanol y la levadura oleaginosa (libre de aceite) y vender la mezcla como una materia prima rica en proteína para la industria de concentrados destinados a animales mono-gástricos.

PARTE IV.

IV.1 CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones siguiendo el orden de ejecución de los experimentos, sin embargo, se indica los objetivos con los que están relacionadas.

IV.1.1 Conclusiones para cumplir el objetivo específico (b).

El objetivo dice lo siguiente: *encontrar y evaluar las condiciones de producción máxima de la biomasa de levadura en hidrolizados ácidos de hemicelulosa provenientes de bagazos de caña de azúcar o de sorgo dulce.*

- El crecimiento de *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* y *Yarrowia lipolytica CBS 2075* fue superior cuando se emplearon hidrolizados ácidos de bagazo de sorgo dulce. Las levaduras crecieron en frasco agitado por 168 h a 32 °C y 250 rpm.
- La levadura *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* creció más que la levadura *Yarrowia lipolytica CBS 2075* y el rendimiento de conversión a biomasa seca por unidad de azúcar inicial fue de 0.232.
- Sin embargo la levadura *Yarrowia lipolytica CBS 2075* contenía más del doble de aceite que la levadura *Trichosporon oleaginosus DSM 11815*. En 7 días de cultivo se obtuvo 2.77 g/L de biomasa seca de levadura con un contenido de aceite de 28.27 %. Lo anterior equivale a 0.0047 g aceite por litro por hora de cultivo. La anterior cifra se encuentra entre los valores informados en pruebas empleando *Yarrowia* en hidrolizados ácidos.

IV.1.2 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (e).

El objetivo dice lo siguiente: *obtener y evaluar valores óptimos que maximicen el rendimiento de biodiesel de los factores: relación inicial de etanol/biomasa, humedad inicial de biomasa, temperatura de reacción, tipo y concentración de catalizador empleando dos levaduras diferentes*

- El empleo del jugo de sorgo como materia prima para producir biomasa de levaduras ricas en aceite fue exitoso.
- Las dos levaduras anteriores, *Yarrowia lipolytica CBS 2075* y *Trichosporon oleaginosus DSM 11815* mostraron una velocidad inicial de crecimiento entre 0.01 y 0.09 h⁻¹ y rendimientos de biomasa seca por carbohidratos consumidos entre 0.29 y 0.39, cifras aceptables.
- Se encontró que fue necesario enriquecer el jugo de sorgo con una fuente de nitrógeno para lograr las cifras anteriores. Así mismo se constató experimentalmente que los resultados al emplear nitrógeno orgánico o nitrógeno inorgánico eran equivalentes.
- El enriquecimiento del jugo de sorgo con 1 g/L de fosfato de amonio fue satisfactorio.
- Las dos levaduras mostraron una inhibición cuando la concentración inicial del azúcar era alta. No se determinó el umbral de azúcar en donde ocurre esta inhibición.

- El contenido de aceite de la biomasa de la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 estuvo alrededor de 25 % y el de la levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 entre 17 y 28 %. La transformación del aceite a esteres metílicos se realizó exitosamente y el análisis por cromatografía reveló una mayor proporción del ester C18:1 (oleico) en la mezcla resultante.
- Se desarrolló una estrategia de proceso novel para producir del jugo de sorgo dulce con una alta concentración de azúcar dos productos, el etanol y la levadura rica en grasa.
- El proceso consistió en dos etapas en secuencia. En la primera se produjo etanol empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la segunda se creció *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 para producir biomasa rica en grasa.
- La levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 consumió mejor la sacarosa en el jugo de sorgo dulce que la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075.
- En la primera etapa se ensayaron cuatro levaduras con jugo de sorgo a las más altas concentraciones de azúcares totales iniciales. Las levaduras CBS381 y CBS 459 produjeron 7.13 y 7.26 g etanol %, respectivamente, y no consumieron el 14 y el 7 % aproximadamente del total de los azúcares iniciales. Por otro lado, la levadura CBS422 produjo la menor cantidad de etanol con el menor consumo de azúcar. Las levaduras más adecuadas para la primera etapa fueron la CBS381 y la CBS 459.
- En la segunda etapa en donde se creció la levadura *Trichosporon oleaginosus* DSM 11815 se obtuvo una productividad de aceite de 0.035 g de aceite por litro de medio por hora, lo cual comprobó la factibilidad de la estrategia desarrollada.

IV.1.3 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (c).

El objetivo dice lo siguiente: *definir y evaluar etapas de pretratamiento de las semillas de sorgo dulce y hule.*

- Dado el bajo contenido de aceite en la semilla de sorgo dulce, menos del 4.0 %, se empleó en el trabajo semilla de ajonjolí cuyo contenido de aceite estaba alrededor del 60 %.
- La dificultad de obtener semilla de hule obligó a seleccionar otro subproducto agro-industrial. En este caso se utilizó el desecho sólido de café previamente extraído para preparar la bebida.
- Fue necesario disminuir la humedad de la semilla de ajonjolí y del desecho sólido de café a valores abajo de 3.0 %, con el objeto de minimizar su efecto negativo sobre la reacción de trans-esterificación.
- La semilla de ajonjolí también fue sujeta a una molienda para reducir aún más el tamaño de partícula con el objeto de facilitar la subsiguiente extracción reactiva.

IV.1.4 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (d).

El objetivo dice lo siguiente: *obtener y evaluar valores óptimos que maximicen el rendimiento de biodiesel de los factores: relación inicial de etanol/biomasa, humedad inicial de biomasa, temperatura de reacción, tipo y concentración de catalizador empleando dos semillas oleaginosas diferentes (semilla de sorgo dulce y semilla de hule).*

- La optimización se llevó a cabo con un aceite comercial (mezcla de aceites de soya y girasol) por las razones expuestas en el inciso anterior.
- Se determinó por medio de un diseño factorial los efectos sobre la conversión del aceite a ésteres etílicos de ácidos grasos en función de la proporción molar inicial de aceite a etanol y de la concentración del catalizador, el KOH.
- Los dos factores tuvieron una influencia significativa sobre la conversión y la interacción entre ambos tuvo una importancia relativamente menor. La conversión fue mayor al cambiar los factores de su nivel bajo al nivel alto, en otras palabras, la conversión aumentó cuando inicialmente había mayor cantidad de etanol y de KOH.
- Se logró constatar la necesidad de emplear el ultrasonido como una ayuda física para lograr mejorar la interacción entre las fases y acelerar la reacción. El tiempo de reacción estimado para lograr la mayor conversión de un 88 % se estimó entre 10 a 15 min.
- Los datos obtenidos de la conversión respecto al tiempo fueron ajustados a un modelo de reacción de pseudo segundo orden. El ajuste fue mejor cuando se empleó una mayor cantidad de catalizador. Se estimó que la concentración de catalizador no debería pasar de 1.0 % en peso referido al contenido de aceite inicial.

IV.1.5 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (f):

El dice lo siguiente: *estimar costo de producción del biodiesel empleando los parámetros obtenidos.*

- El costo de producción de ésteres metílicos a partir de un aceite comercial fue de Q 34.24 por galón de producto, en una planta con una producción anual de biodiesel de 50,000 Mg. En Guatemala dicha cantidad puede mezclarse en un 5% con diésel importado para llenar la demanda actual de 1,200 M de litros por año. Se identificó en el proceso al costo de la materia prima grasa como el factor decisivo en fijar el costo de producción del biodiesel. Por otro lado, se listaron una serie de anotaciones indicando las diferentes alternativas, en el ámbito nacional, para disminuir dicha cifra. Por ejemplo, la única materia prima por el momento capaz de surtir la demanda de aceite de la planta de biodiesel analizada resultó ser la palma. El costo actual de dicho aceite en el mercado internacional está alrededor de US\$ 600 por tonelada. La disminución de un 45 % en el costo del aceite empleado en el proceso tiene un efecto marcado en el costo de producción, el cual disminuiría hasta Q 16.9 por galón.
- El costo de producción de ésteres etílicos a partir del aceite de una levadura oleaginosa no fue competitivo con la estructura de precios actuales de los combustibles. El costo principal estuvo asociado a la inversión fija en el proceso para producir la biomasa de la levadura oleaginosa, el cual fue relativamente elevado debido a la baja productividad del aceite. La alternativa propuesta en este trabajo de emplear jugo de sorgo de alta concentración de azúcar para producir en dos etapas consecutivas, utilizando dos distintas levaduras, pudiera paliar en parte el problema del costo de producción. Por un lado se tendrían dos productos para vender, el etanol y el biodiesel (FAEE). Por el otro es posible procesar la levadura productora de etanol y la levadura oleaginosa (libre de

aceite) y vender la mezcla como una materia prima rica en proteína para la industria de concentrados destinados a animales mono-gástricos.

IV.1.6 Conclusiones para cumplir con el objetivo específico (a):

El objetivo dice lo siguiente: *evaluar y optimizar el rendimiento de ésteres de etilo, para ser empleados como biodiesel, en la extracción etanólica acoplada a una reacción simultánea de la biomasa rica en grasa.*

- La extracción y reacción simultáneas realizadas con el desecho sólido de café y con la semilla de ajonjolí triturada, empleando etanol, KOH como catalítico y usando ultrasonido en pulsos como ayuda física para acelerar la extracción y la reacción simultáneas, resultaron exitosas.
- La proporción de 1 a 10 en g de material sólido a mL de etanol, y la proporción de 1% de KOH en base al peso inicial de aceite contenido en el sólido fueron apropiados.
- El tiempo empleado de 4 a 5 h y la operación del sistema de ultrasonido en forma de pulsos logró una conversión adecuada.
- Los ésteres etílicos identificados correspondían con la composición de ácidos grasos del aceite original en el sólido.

IV.2 RECOMENDACIONES

La experimentación realizada confirmó la factibilidad de emplear etanol en lugar de metanol en la producción de biodiesel. De igual forma, se llevó a cabo la extracción con etanol del aceite de una materia prima oleaginosa acoplada a la reacción de trans-esterificación para formar los ésteres etílicos. Sin embargo, las condiciones de operación deben de optimizarse en futuros trabajos, en los cuales deben de incluirse fuentes de aceite no tradicionales, que no provengan del uso extensivo de la tierra agrícola, tal como los microorganismos oleaginosos. Las levaduras empleadas en este trabajo, especialmente el *Trichosporon oleaginosus*, deben ser estudiadas con más detalle para acelerar su tasa de crecimiento y de acumulación de aceite.

Con el objeto de disminuir los costos de producción debe estudiarse más a fondo la alternativa desarrollada en este trabajo, la cual partiendo del jugo extraído del tallo del sorgo dulce, empleando dos levaduras distintas en etapas consecutivas, produce dos biocombustibles, el etanol y el biodiesel.

Este informe debería ser enviado a los Ministerios que se crea conveniente (se sugiere el MEM y el MAGA) y a SEGEPLAN, de manera que de su lectura puedan evaluar el potencial que presenta el sorgo dulce como materia prima para producir combustibles renovables en el país.

Específicamente debería considerarse como un producto multipropósito de posible desarrollo en zonas rurales del país. El desarrollo de este cultivo en esas zonas proveería una demanda de trabajo agrícola muy necesaria y se produciría con el sorgo dulce no sólo combustibles sino que también productos alimenticios para el ser humano del grano del sorgo y residuos vegetales para la alimentación animal.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkadir BA et al (2014) *In Situ* Transesterification of Rubber Seeds (*Hevea brasiliensis*) *Greener J Phys Sci* **4** (3): 38-44
- Abdullah M, A Bulent Koc (2013) Oil removal from waste coffee grounds using two-phase solvent extraction enhanced with ultrasonication *Renew Energ* **50**: 965-970
- Abghari A, S Chen (2014) *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts *Front Energ Res* **2**: 21
- Abishek MP, et al (2014) Algae Oil: A Sustainable Renewable Fuel of Future *Biotechnol Res Internat* **2014** Article ID 272814
- Abo El-Enin SA, et al (2013) In-situ transesterification of rapeseed and cost indicators for biodiesel production *Renew Sustain Energ Rev* **18**: 471-477
- Achten WM, et al (2007) *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? *Biof Bioprod Bioref* **1**: 283-291
- Achten WMJ, et al (2008) *Jatropha* bio-diesel production and use *Biomass Bioenerg* **32** (12): 1063-1084
- Ageitos JM et al (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 1219-1227
- Alcántara R, et al (2000) Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow *Biomass Bioenerg* **18** (6): 515-527
- Al-Hamamre Z, et al (2012) Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing *Fuel* **96**: 70-76
- Andre A, et al (2009) Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains *Eng Life Sci* **9** (6): 468-478
- Anastopoulos G, et al (2009) Transesterification of Vegetable Oils with Ethanol and Characterization of the Key Fuel Properties of Ethyl Esters *Energies* **2**: 362-376
- Apostolakou AA, et al (2009) Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils *Fuel Proces Technol* **90**: 1023-1031
- Armenta RE, et al (2007) Transesterification of Fish Oil to Produce Fatty Acid Ethyl Esters Using Ultrasonic Energy *J Am Oil Chem Soc* **84**: 1045-1052
- Ávila A, et al (2008) Cinética de la transesterificación de oleina de palma africana con etanol *Interciencia* **33** (3): 232-236
- Balat M (2011) Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work *Energ Conver Manag* **52**: 1479–1492
- Banerjee A, R Chakraborty (2009) Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for Biodiesel production: A review *Resour Conserv Recyc* **53**: 490-497
- Bankar AV, et al (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica* *Appl Microbiol Biotechnol* **84** (5): 847-865
- Bart JCJ, N Palmeri, S Cavallaro (2010) *Biodiesel science and technology: from soil to oil* CRC Press
- Bautista LF, et al (2009) Optimisation of FAME production from waste cooking oil for biodiesel use *Biomass Bioenerg* **33** (5): 862-872
- Becker K, HPS Makkar (2008) *Jathropa curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel *Lipid Technol* **20** (5): 104-107
- Bender M (1999) Economic feasibility review for community-scale farmer cooperatives for biodiesel *Biores Technol* **70**: 81-87

- Beopoulos A, et al (2008) Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica* *Appl Environ Microbiol* **74** (24): 7779-7789
- Beopoulos A, et al (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production *Prog Lipid Res* **48** (6): 375-387
- Beopoulos A, et al (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation *Biochimie* **91** (6): 692-696
- Beopoulos A, et al (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes *Appl Microbiol Biotechnol* **90** (4): 1193-1206
- Bhatti HN, et al (2008) Biodiesel production from waste tallow *Fuel* **87** (13-14): 2961-2966
- Blazek J, et al (2014) Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production *Nat Commun* **5**
- Boey P-L, et al (2011) Ultrasound aided in situ transesterification of crude palm oil adsorbed on spent bleaching clay *Energ Conver Manag* **52** (5): 2081-2084
- Bouaid A, et al (2007) A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design *Chem Eng J* **134** (1-3): 93-99
- Bvochora, J. M., JS Read, R Zvauya (2000) Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain *Ind Crops Prod* **11**: 11-17
- Canakci M (2007) The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks *Biores Technol* **98**: 183-190
- Canakci M, H Sanli (2008) Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 431-441
- Cao F, et al (2008) Biodiesel Production From High Acid Value Waste Frying Oil Catalyzed by Superacid Heteropolyacid *Biotechnol Bioeng* **101**: 93-100
- Cesar SA, S Ignacimuthu (2011) Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and Biodiesel: A review *Renew Sustain Energ Rev* **15** (9): 5176-5185
- Chang Y-H, K-S Chang, Ch-F Lee, Ch-L Hsu, Ch-W Huang, H-D Jang (2015) Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corcob hydrolysate as carbon source *Biomass Bioenerg* **72**: 95-103
- Charpe TW, VK Rathod (2011) Biodiesel production using waste frying oil *Waste Manag* **31** (1): 85-90
- Chen, X, et al (2009) Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds *Appl Biochem Biotechnol* **159**: 591-604
- Chen X-f., et al (2012) Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum* *Biotechnol Lett* **34**: 1025-1028
- Chen X-F, et al. (2013) Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate *Biores Technol* **143**: 18-24
- Cheirsilp B, Y Louhasakul (2013) Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel *Biores Technol* **142**: 329-337
- Chuck CJ, et al. (2014) Liquid transport fuels from microbial yeasts – current and future perspectives *Biofuels* **5** (3): 293-311
- Covrig C, L Bosch-Gual (2010) Assessing European biodiesel markets and capacities *Bioprod Bioref* **4**: 590-593

- Cui Y, Y Liang (2014) Direct transesterification of wet *Cryptococcus curvatus* cells to biodiesel through use of microwave irradiation *Appl Energ* **119**: 438-444
- Cui Y, Y Liang (2015) Sweet sorghum syrup as a renewable material for microbial lipid production *Biochem Eng J* **93**: 229-234
- Demirbas A (2007) Importance of biodiesel as transportation fuel *Energ Policy* **35** (9): 4661-4670
- Deesuth, O., P Laopaiboon, P Jaisil, L Laopaiboon (2012) Optimization of Nitrogen and Metal Ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design *Energies* **5**: 3178-3197
- De Carvalho Lopes, D, AJS Neto, PAR Martins (2011) Economic simulation of biodiesel production: SIMB-E tool *Energ Econom* **33**: 1138-1145
- Dias JM, et al (2009) Production of biodiesel from acid waste lard *Biores Technol* **100** (24): 6355-6361
- Dorado MP, F Cruz, JM Palomar, FJ López (2006) An approach to the economics of two vegetable oil-based biofuels in Spain *Renew Energ* **31**: 1231-1237
- Economou CN, A Makri, G Aggelis, S Pavlou, DV Vayenas (2010) Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil *Biores Technol* **101**: 1385-1388
- Encinar JM, et al (2007) Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization *Fuel Proces Technol* **88**: 513-522
- Enshaeieh M, et al (2013) Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M7 and *Candida* sp *J Cell Mol Res* **5**(1): 17-23
- Enweremadu C C, MM Mbarawa (2009) Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review *Renew Sustain Energ Rev* **13**(9): 2205-2224
- Fadhil A. B. and W. S. Abdulhad (2014) Transesterification of mustard (*Brassica nigra*) seed oil with ethanol: Purification of the crude ethyl ester with activated carbon produced from de-oiled cake *Energ Conver Manag* **77**: 495-503
- Felizardo P, et al (2006) Production of biodiesel from waste frying oils *Waste Manag* **26**: 487-494
- Feofilova E, et al (2010) Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review) *Appl Biochem Microbiol* **46** (4): 369-378
- Fontanille P, et al (2012) Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* *Biores Technol* **114**: 443-449
- Gao Q, et al (2014) Lipid fermentation of corn cob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* *Biores Technol* **152**: 552-556
- Georgogianni KG, et al (2008) Alkaline Conventional and in Situ Transesterification of Cottonseed Oil for the Production of Biodiesel *Energ Fuels* **22**: 2120-2115
- Grant GE, VG Gude (2014) Kinetics of Ultrasonic Transesterification of Waste Cooking Oil *Environ Prog Sustain Energ* **33**: 1051-1058
- Gürü M, et al (2009) Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive *Energ Conver Manag* **50** (3): 498-502
- Gürü M, et al (2010) Biodiesel production from waste chicken fat based sources and evaluation with Mg based additive in a diesel engine *Renew Energ* **35** (3): 637-643
- Haagensohn DM et al (2010) Implementing an In Situ Alkaline Transesterification Method for Canola Biodiesel Quality Screening *J Am Oil Chem Soc* **87**: 1351-1358

- Haas MJ (2005) Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock *Fuel Proces Technol* **86**: 1087– 1096
- Haas MJ et al (2006) A process model to estimate biodiesel production costs *Biores Technol* **97**: 671–678
- Hájek M et al (2012) Effect of phase separation temperature on ester yields from ethanolysis of rapeseed oil in the presence of NaOH and KOH as catalysts *Biores Technol* **110**: 288–291
- Hanna MA et al (2005) Biodiesel: current perspectives and future *J Scien Ind Res* **64**: 854-857
- Harrington KJ, D'Arcy-Evans C (1985a) Transesterification *in situ* of sunflower seed oil *Ind Eng Chem Prod Res Dev* **62**: 314-318
- Harrington KJ, C. D'Arcy-Evans (1985b) A Comparison of Conventional and *in situ* Methods of Transesterification of Seed Oil from a Series of Sunflower Cultivars *J Am Oil Chem Soc* **62**:1009–1013
- Hincapié G et al (2011) Conventional and *in situ* transesterification of castor seed oil for biodiesel production *Fuel* **90** (4): 1618-1623
- Hu C et al (2011) Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum* *Biotechnol Biof* **4** (1): 1-8
- Huang C et al (2009) Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans* *Biores Technol* **100** (19): 4535-4538
- Huang C et al (2011) Effects of aldehydes on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* *J Agricul Food Chem* **59** (9): 4606-4613
- Huang C et al (2012) Effects of Alcohol Compounds on the Growth and Lipid Accumulation of Oleaginous Yeast *Trichosporon fermentans* *PLoS ONE* **7** (10): e46975
- Huang C et al (2012) Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology *New Biotechnol* **29** (3): 372-378
- Huang C et al (2012) Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* *Biotechnol Biof* **5** (1): 4
- Huang C et al (2012) *In vivo* detoxification of furfural during lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* *Biotechnol Lett* **34**: 1637-1642
- Huang C et al (2012) Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs *Biores Technol* **110**: 711-714
- Huang C et al (2013) Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization *Biotechnol Adv* **31** (2): 129-139
- Huang C et al (2013) Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme* *Biomass Bioenerg* **49**: 273-278
- Ikwaagwu OE, et al (2000) Production of biodiesel using rubber [*Hevea brasiliensis* (Kunth. Muell.)] seed oil *Ind Crops Prod* **12** (1): 57-62
- Issariyakul T, et al (2007) Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system *Fuel Proces Technol* **88**: 429-436
- Jain S, MP Sharma (2010) Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: A review *Renew Sustain Energ Rev* **14**: 763-771
- Jegannathan KR, C Eng-Seng, P Ravindra (2011) Economic assessment of biodiesel production: comparison of alkali and biocatalyst processes *Renew Sustain Energ Rev* **15**: 745-751

- Jenkins RW, NA Stageman, CM Fortune, CJ Chuck (2014) Effect of the Type of Bean, Processing, and Geographical Location on the Biodiesel Produced from Waste Coffee Grounds *Energ Fuels* **28**: 1166-1174
- Johnston M, T Holloway (2007) A global comparison of national biodiesel potentials *Environ Sci Technol* **41**: 7967-7973
- Jose DFM, et al (2011) A multi-variant approach to optimize process parameters for biodiesel extraction from rubber seed oil *Appl Energ* **88** (6): 2056-2063
- Juszczak P, et al (2013) Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production *Biores Technol* **137**: 124-131
- Kant P, S Wu (2011) The Extraordinary Collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel *Environ Sci Technol* **45**: 7114-7115
- Kasim FH, AP Harvey (2011) Influence of various parameters on reactive extraction of *Jatropha curcas* L. for biodiesel production *Chem Eng J* **171** (3): 1373-1378
- Kaul S, et al (2010) Parametric Study of *Jatropha* Seeds for Biodiesel Production by Reactive Extraction *J Am Oil Chem Soc* **87**: 903-908
- Khan MA, et al (2010) Acid esterification of a high free fatty acid crude palm oil and crude rubber seed oil blend: Optimization and parametric analysis *Biomass Bioenerg* **34** (12): 1751-1756
- Khongsay, N., L Laopaiboon, P Jaisil, P Laopaiboon (2012) Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design *Energies* **5**: 561-576
- Khongsay, N., V-H Lin, P Laopaiboon, I Laopaiboon (2014) Improvement of very-high-gravity ethanol fermentation from sweet sorghum juice by controlling fermentation redox potential *J Taiwan Institute Chem Eng* **45**: 302-307
- Kildiran G, Ozgul-Yucel S, Tukay S (1996) In situ alcoholysis of soybean oil *J Am Oil Chem Soc* **73**: 225-228
- Kim M, DF Day (2011) Composition of sugarcane, energy cane and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**: 803-807
- Kiss AA, CS Bildea (2012) A review of biodiesel production by integrated reactive separation technologies *J Chem Technol Biotechnol* **87**: 861-879
- Koberg M, A Gedanken (2012) Direct Transesterification of Castor and *Jatropha* Seeds for FAME Production by Microwave and Ultrasound Radiation Using a SrO Catalyst *Bioenerg Res* **5**: 958-968
- Kondamudi N, SK Mohapatra, M Misra (2008) Spent coffee grounds as a versatile source of green energy *J Agric Food Chem* **56**: 11757-11760
- Kosa M, AJ Ragauskas (2011) Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research *Trends Biotechnol* **29** (2): 53-61
- Koutinas AA, et al (2014) Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production *Fuel* **116**: 566-577
- Kucek KT, et al (2007) Ethanolysis of Refined Soybean Oil Assisted by Sodium and Potassium Hydroxides *J Amer Oil Chem Soc* **84**: 385-392
- Kumar G, D Kumar (2013) Monitoring of base catalyzed ethanolysis of *Jatropha curcas* oil by reversed phase high performance liquid chromatography assisted by ultrasonication *J Environ Chem Eng* **1** (4): 962-966
- Kwon EE, et al (2013) Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds *Biores Technol* **136**: 475-480

- Lam MK, et al (2009) Life cycle assessment for the production of biodiesel: A case study in Malaysia for palm oil versus jatropha oil *Biof Bioprod Bioref* **3**: 601-612
- Lam MK, et al (2010) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review *Biotechnol Adv* **28** (4): 500-518
- Laopaiboon, L., S Nuanpeng, P Srinophakun, P Klanrit, P Laopaiboon (2009) Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations *Biores Technol* **100**: 4176-4182
- Leung DY, Y Guo (2006) Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production *Fuel Proces Technol* **87**: 883-890
- Li Q, et al (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production *Appl Microbiol Biotechnol* **80** (5): 749-756
- Li B-Z, V Balan, Y-J Yuan, BE Dale (2010) Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatments *Bioresour Technol* **101**: 1285-1292
- Li Y, et al (2010) Fatty acid methyl esters from soapstocks with potential use as biodiesel *Energ Conver Manag* **51** (11): 2307-2311
- Liang, Y (2012) Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation *Renew Energ* **40**: 130-136
- Lin L, et al (2011) Opportunities and challenges for biodiesel fuel *Appl Energ* **88** (4): 1020-1031
- Lin H, et al (2013) Mechanism for the disparity of the lipid production by *Trichosporon fermentans* grown on different sweetpotato vines hydrolysates *Ind Crops Pprod* **50**: 844-851
- Liu B, ZK Zhao (2007) Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass *J Chem Technol Biotechnol* **82**: 775-780
- Lu J, et al (2007) Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125 *Process Biochem* **42** (9): 1367-1370
- Maddikeri GL, et al (2012) Intensification Approaches for Biodiesel Synthesis from Waste Cooking Oil: A Review *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**: 14610-14628
- Makri A, et al (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures *Biores Technol* **101** (7): 2351-2358
- Mandal S, Mallik N (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 281-291
- Marchetti JM (2011) The effect of economic variables over a biodiesel production plant *Energ Conver Manag* **52**: 3227-3222
- Matsakas L, A-A Sterioti, U Rova, P Christakopoulos (2014) Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807 *Indust Crops Prod* **62**: 367-372
- Matsakas L, N Bonturi, EA Miranda, U Rova, P Christakopoulos (2015) High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides* *Biotechnol Biofuels* **8**, 6
- Meneghetti SMP, et al (2006) Ethanolysis of Castor and Cottonseed Oil: A Systematic Study Using Classical Catalysts *J Am Oil Chem Soc* **83**: 819-822
- Meng X, et al (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms *Renew Energ* **34** (1): 1-5

- Miller P, et al (2012) Optimum scale of feedstock processing for renewable diesel production *Biof, Bioprod Bioref* **6**: 188–204
- Moeller L, et al (2012) Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 1695-1702
- Morikawa Y, X Zhao, D Liu (2014) Biological co-production of ethanol and biodiesel from wheat straw: a case of dilute acid pretreatment *RSC Adv* **4**, 37878
- Nelson RG, MD Schrock (2006) Energetic and economic feasibility associated with the production, processing, and conversion of beef tallow to a substitute diesel fuel *Biomass Bioenerg* **30** (6): 584-591
- Ngo HL, et al (2007) Efficient Two-Step Synthesis of Biodiesel from Greases *Energ Fuels* **22** (1): 626-634
- Nicaud J-M (2012) *Yarrowia lipolytica* *Yeast* **29** (10): 409-418
- Oliveira LS, AS Franca, JCF Mendonca, MC Barros-Junior (2006) Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans *LWT - Food Science and Technology* **39** (3): 235-239
- Öner C, Ş Altun (2009) Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine *Appl Energ* **86** (10): 2114-2120
- Openshaw K (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise *Biomass Bioenerg* **19** (1): 1-15
- Özgül-Yücel S, S Türkay (2002) Variables Affecting the Yields of Methyl Esters Derived from in situ Esterification of Rice Bran Oil *J Am Oil Chem Soc* **79**: 611-614
- Paiva EJM, et al (2013) Non-edible babassu oil as a new source for energy production—a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound *Ultrason Sonochem* **20** (3): 833-838
- Papanikolaou S, G Aggelis (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture *Biores Technol* **82** (1): 43-49
- Papanikolaou S, et al (2007) Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica* *Electron J Biotechnol* **10** (3): 425-435
- Papanikolaou S, G Aggelis (2010) *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids *Eur J Lipid Sci Technol* **112** (6): 639-654
- Phan AN, TM Phan (2008) Biodiesel production from waste cooking oils *Fuel* **87** (17–18): 3490-3496
- Pinzi S, et al (2014) Latest trends in feedstocks for biodiesel production *Biof, Bioprod Bioref* **8** (1): 126-143
- Poli JS, et al (2014) Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production *Biores Technol* **161**: 320-326
- Prueksakorn K, et al (2010) Energy analysis of *Jatropha* plantation systems for biodiesel production in Thailand *Energ Sustain Develop* **14** (1): 1-5
- Qian J, et al (2008) In situ alkaline transesterification of cottonseed oil for production of biodiesel and nontoxic cottonseed meal *Biores Technol* **99** (18): 9009-9012
- Ragavan SN, DV Roy (2011) Transesterification of subber seed oil by sonication technique for the production of methyl esters *Biomass Conv Bioref* **1**: 105-110
- Ratledge C (2013) Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects *OCL* **20** (6): D602

- Rocha MVP, LJBL de Matos, LP de Lima, PMS Figueredo, IL Lucena, FAN Fernandes, LRB Goncalves (2014) Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds *Biores Technol* **167**: 343-348
- Rodrigues S, et al (2009) Optimization of the production of ethyl esters by ultrasound assisted reaction of soybean oil and ethanol *Braz J Chem Eng* **26** (2): 361-366
- Sabudak T, M Yildiz (2010) Biodiesel production from waste frying oils and its quality control *Waste Manag* **30** (5): 799-803
- Sakai, T, A Kawashima, T Koshikawa (2009) Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogenous and heterogenous alkaline catalysts *Biores Technol* **100**: 3268-3276
- Santos RCR, et al (2013) Monitoring the conversion of soybean oil to methyl or ethyl esters using the refractive index with correlation gas chromatography *Microchem J* **109**: 46-50
- Sarin A (2012) *Biodiesel: production and properties* Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- Satyanarayana M, C Muraleedharan (2011) Comparative studies of biodiesel production from rubber seed oil, coconut oil and palm oil including thermogravimetric analysis *Energ Sources Part A* **33**: 925-937
- Saydut A, MZ Duz, C Kaya, AB Kafadar, C Hamamci (2008) Transesterified sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil as a biodiesel fuel *Biores Technol* **99**: 6656-6660
- Schulze I, et al (2014) Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis* *ABM Express*
- Seidell B, et al (2006) Safety evaluation for a biodiesel process using prion-contaminated animal fat as a source *Environ Sci Pollut Res* **13** (2): 125-130
- Shahid EM, Y Jamal (2011) Production of biodiesel: A technical review *Renew Sustain Energ Rev* **15** (9): 4732-4745
- Shi S, et al (2011) Prospects for microbial biodiesel production *Biotechnol J* **6** (3): 277-285
- Shiu P-J, et al (2010) Biodiesel production from rice bran by a two-step in-situ process *Biores Technol* **101** (3): 984-989
- Shuit SH, et al (2010) Reactive extraction and in situ esterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel *Fuel* **89**: 527-530
- Shuit SH, et al (2010) Reactive Extraction of *Jatropha curcas* L. Seed for Production of Biodiesel: Process Optimization Study *Environ Sci Technol* **44**: 4361-4367
- Siler-Marinkovic S, Tomasevic A (1998) Transesterification of sunflower oil in situ *Fuel* **77**: 1389-1391
- Sitepu IR, et al (2013) Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species *Biores Technol* **144**: 360-369
- Sitepu IR, et al (2014a) Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production *Biotechnol Adv* **32** (7): 1336-1360
- Sitepu I, et al (2014b) Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species *J Ind Microbiol Biotechnol*
- Sriwongchai S, et al (2013) Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains *J Microbiol, Biotechnol Food Sci* **2** (5): 2344-2348
- Su E, D Wei (2014) Improvement in biodiesel production from soapstock oil by one-stage lipase catalyzed methanolysis *Energ Conver Manag* **88**: 60-65

- Tai M, G Stephanopoulos (2013) Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production *Metabol Eng* **15**: 1-9
- Tashtoush GM, et al (2004) Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel *Energ Conver Manag* **45** (17): 2697-2711
- Thevenieau F, J-M Nicaud (2013) Microorganisms as sources of oils *OCL* **20** (6): D603
- Thliveros P, et al (2014) Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass *Biores Technol* **157**: 181-187
- Tsigie YA, et al (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* grown in sugarcane bagasse hydrolysate *Biores Technol* **102** (19): 9216-9222
- Usta N, et al (2005) Combustion of biodiesel fuel produced from hazelnut soapstock/waste sunflower oil mixture in a Diesel engine *Energ Conver Manag* **46** (5): 741-755
- Vardon DR, et al (2013) Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar *ACS Sustainable Chem. Eng.* **1**: 1286–1294
- Velickovic AV, et al (2013) Application of the full factorial design to optimization of base-catalyzed sunflower oil ethanolysis *Fuel* **104**: 433-442
- Vlysidis A, et al (2011) A techno-economic analysis of biodiesel biorefineries: Assessment of integrated designs for the co-production of fuels and chemicals *Energ* **36**: 4671-4683
- Wang Y, et al (2007) Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process *Energ Conver Manag* **48** (1): 184-188
- West AH, et al (2008) Assessment of four biodiesel production processes using HYSYS.Plant *Biores Technol* **99** (14): 6587-6601
- Wu H, et al (2011) Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum* *Appl Energ* **88** (1): 138-142
- Xu J, et al (2013) Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation *Biof Bioprod Bioref* **7**: 65-77
- Yaakob Z, et al (2013) Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil *Renew Sustain Energ Rev* **18**: 184-193
- Yang R, et al (2011) Biodiesel production from rubber seed oil using poly (sodium acrylate) supporting NaOH as a water-resistant catalyst *Biores Technol* **102** (3): 2665-2671
- Yen G-C (1990) Influence of Seed Roasting Process on the Changes in Composition and Quality of Sesame (*Sesame indicum*) Oil *J Sci Food Agric* **50**: 563-570
- You Y-D, et al (2008) Economic Cost Analysis of Biodiesel Production: Case in Soybean Oil *Energ Fuels* **22**: 182-189
- Yu X, et al (2011) Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid *Biores Technol* **102** (10): 6134-6140
- Yue, G., J Yu, X Zhang, T Tan (2012). The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice *Biomass Bioenerg* **39**: 48-52
- Zeng J, et al (2009) Rapid In Situ Transesterification of Sunflower Oil *Ind Eng Chem Res* **48**: 850-956
- Zhan J, et al (2013) Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans* *Biores Technol* **135**: 622-629
- Zhang Y, et al (2003) Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis *Biores Technol* **90** (3): 229-240
- Zhang X, et al (2014) Lipid production from *Trichosporon oleaginosus* cultivated with pre-treated secondary wastewater sludge *Fuel* **134**: 274-282

- Zheng S, et al (2006) Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil *Biomass Bioenerg* **30**: 267-272
- Zhao C-H, et al (2010) Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials *Metabol Eng* **12** (6): 510-517
- Zhou W, et al (2003) Ethyl Esters from the Single-Phase Base-Catalyzed Ethanolysis of Vegetable Oils *J Am Oil Chem Soc* **80** (4): 367-371
- Zhu LY, et al (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation *Biores Technol* **99** (16): 7881-7885
- Zhu Y, et al (2011) The influence of seed and oil storage on the acid levels of rubber seed oil, derived from *Hevea brasiliensis* grown in Xishuangbanna, China *Energ* **36**: 5403-5408

IV.4 ANEXOS

ANEXO 1

Ejemplos de experimentos empleando *Trichosporon* para producir aceite

Levadura	Cultivo	Medio	Biomasa seca g/L	Aceite % base seca	Productividad de aceite g/L h	Rendimiento de aceite g/100 g glucosa
T.cutaneum CGMCC 2.1374 ^a	Frascos pH 5.0, 130 rpm, 30 °C, 96 h	Glucosa 50 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L KH ₂ PO ₄ 1 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L	2.75	39.8	0.011	10.1
T.cutaneum CH002 ^b	Frascos pH 6.0, 160 rpm, 28 °C, 192 h	Hidrolizado acido de olote detoxificado: Glucosa 2.9 g/L Xilosa 37.9 g/L Arabinosa 4.9 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.3 g/L CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.003 g/L MnSO ₄ ·H ₂ O 0.003 g/L KCl 0.4 g/L	22.9	35.9	0.043	10.4
T.cutaneum ACCC 20271 ^c	Frascos pH 5.0, 180 rpm, 30 °C, 120 h	Hidrolizado acido de olote KH ₂ PO ₄ 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L	38.4	32.1	0.010	12.3
T.cutaneum AS 2.571 ^d	Fermentador 3 L, pH 6.0, 200 rpm, 30 °C, 80 h	Mezcla glucosa 47 g/L xilosa 23 g/L Extracto levadura 0.75 g/L NH ₄ Cl 0.75 g/L MgCl ₂ ·6H ₂ O 1g/L Na ₂ SO ₄ 0.1 g/L KH ₂ PO ₄ 11.8 g/L K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O 3.7 g/L Elementos traza	22.0	59.1	0.16	17.0
T.cutaneum AS 2.571 ^d	Fermentador 3 L, pH 6.0, 200 rpm, 30 °C, 96.5 h	Hidrolizado acido de olote detoxificado Azucres 60 g/L	19.3	39.2	0.078	7.6
T. dermatis CH007 ^e	Frascos pH 7.0, 150 rpm, 28 °C, 216 h	Hidrolizado enzimático de olote Glucosa 35 g/L Xilosa 16 g/L Celobiosa 8 g/L	24.4	40.1	0.045	9.8
T.	Frascos pH	Hidrolizado acido de olote	20.4	37.8	0.032	7.7

coremiiforme CH005 ^f	7.0, 150 rpm, 28 °C, 240 h	detoxificado				
<i>T. fermentans</i> CICC 1368 ^g	Frascos pH 6.5, 160 rpm, 25 °C, 264 h	Hidrolizado ácido de paja de arroz detoxificado Xilosa 84.3 g/L Arabinosa 17.1 g/L Glucosa 15.5 g/L Extracto levadura 0.5 g/L Peptona 1.8 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O 0.4 g/L MnSO ₄ .H ₂ O 0.003 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O 0.0001 g/L	28.6	40.1	0.043	10.4
<i>T. fermentans</i> CICC1368 ^h	Frascos pH 5.5, 200 rpm, 30 °C, 288 h	Extracto acuoso de tallos de camote hidrolizado enzimáticamente Azúcares 39.13 g/L	28.0	77.9	0.076	21.5
<i>T. porosum</i> DSM 27194 ⁱ	Fermentador 2.5 L, pH 5.0, 600 rpm, 25 °C, 1 vvm 161 h	Glucosa Extracto levadura 0.2 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O 4.72 g/L Citrato Na.2H ₂ O 0.1 g/L	49.9	34.1	0.106	11.0
<i>T. porosum</i> DSM 27194 ⁱ	Fermentador 2.5 L, pH 5.0, 600 rpm, 25 °C, 1 vvm 161 h	Xilosa Extracto levadura 0.2 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O 4.72 g/L Citrato Na.2H ₂ O 0.1 g/L	41.5	33.4	0.086	12.0
<i>T. capitatum</i> AS 2.1385 ^j	Frascos pH 5.0, 160 rpm, 28 °C, 216 h	Melazas pre-tratadas con 10 % de azúcares	17.3	37.6	0.030	6.5
<i>T. fermentans</i> CICC1368 ^k	Frascos pH 5.5, 200 rpm, 30 °C, 216 h	Extracto acuoso de tallos de camote hidrolizado enzimáticamente Hidrolizado ácido de paja de trigo detoxificado Azúcares 90 g/L	30.1	53.0	0.074	22.8
<i>T. fermentans</i> CICC 1368 ^l	Frascos pH 6.0, 160 rpm, 25 °C, 168 h	Melazas pre-tratadas con 10 % de azúcares con 15 % de azúcares	36.4	35.3	0.076	8.5
<i>T. oleiginosus</i> (ATCC 20509) ^m	Frascos pH 6.5, 170 rpm, 28 °C, 48 h	Lodo activado tratado térmicamente (30 sólidos solubles)	20.4	35.2	0.150	23.9
<i>T. fermentans</i> CICC 1368	Frascos 160 rpm, 25 °C, 240 h	Hidrolizado ácido de paja de arroz 103 g/L EL 0.5 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O 0.4 g/L KH ₂ PO ₄ 2.0 g/L MnSO ₄ .H ₂ O 0.004 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O 0.0001 g/L	31.0	39.0	0.050	11.7

Fuente: Fodecyt 003-2012

- ^a Chen et al, 2012
- ^b Chen et al, 2013
- ^c Gao et al, 2014
- ^d Hu et al, 2011
- ^e Huang et al, 2012
- ^f Huang et al, 2013
- ^g Huang et al, 2009
- ^h Lin et al, 2013
- ⁱ Schulze et al, 2014
- ^j Wu et al, 2011
- ^k Zhan et al, 2013
- ^l Zhu et al, 2008
- ^m Zhang et al (2014)

ANEXO 2

Ejemplos de experimentos empleando *Yarrowia* para producir aceite

Cepa	Substrato (g/L)	Cultivo	Biomasa g/L	Aceite %	Productividad g/L h	Aceite/substrato g/100g
Y lipolytica ACA-YC 5033 ^a	Glicerol (120) pH 6.0	Frascos 28 °C 180 rpm 375 h	6.5	30.76	0.005	31
Y lipolytica M7 ^b	Glucosa (15) (NH ₄)SO ₄ (5) KH ₂ PO ₄ (1) MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.5) EL (0.5) pH 6.0	Frascos 25 °C 200 rpm 96 h	15.6	31.15	0.051	31
Y. lipolytica MUCL 28849 ^c	Glucosa (80) KH ₂ PO ₄ (3) Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O (3) (NH ₄) ₂ SO ₄ (3) MgSO ₄ ·7H ₂ O (1) ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0.04) FeSO ₄ ·7H ₂ O (.016) MnSO ₄ ·H ₂ O (.0038) CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.023) CoCl ₂ ·6H ₂ O (.0005) CuSO ₄ ·5H ₂ O (.0009) Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (0.00006) H ₃ BO ₃ (0.003) 1.0 mL/L vitaminas pH 5.6	Reactor 30 °C 800 rpm 1 vvm 48 h	43.38	36.73	0.332	20
	Glicerol (80) igual		42.23	38.15	0.336	20
	Acido acético (12) igual		5.98	30.76	0.038	15
Y. lipolytica S6 ^d	Glicerol crudo (25) EL (1) Bactopeptona (.75) MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.5) (NH ₄) ₂ SO ₄ (10) KH ₂ PO ₄ (0.125) pH 3.5	Reactor 30 °C 550 rpm 1 vvm 11 h	12.3	16.0	0.018	8
Y. lipolytica	Glicerol (27.8)	Reactor	4.68	22.30	0.013	8

ACA-DC 50109 ^e	KH ₂ PO ₄ (7) Na ₂ HPO ₄ (2.5) MgSO ₄ ·7H ₂ O (1.5) CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.15) ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0.02) MnSO ₄ ·H ₂ O (0.06) (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5) EL (0.5)	28 °C pO ₂ >30% saturation 80 h				
	Glicerol (104.9) igual		6.71	20.41	0.017	5
Y. lipolytica LGAM S(7) _{1f}	Estearina (20) (NH ₄) ₂ SO ₄ (5) EL (2) pH 6.0	Reactor 28 °C 650 rpm 0.3 vvm 200 h	30.5	16.0	0.024	24.4
Y. lipolytica LGAM S(7) _{1g}	Glicerol (50) KH ₂ PO ₄ (7) Na ₂ HPO ₄ (2.5) MgSO ₄ ·7H ₂ O (1.5) CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.15) FeCl ₃ ·6H ₂ O (0.15) ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0.02) MnSO ₄ ·H ₂ O (0.06) (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5) EL (0.5) pH 6.0	Reactor continuo 28 °C 500 rpm 1.8 vvm	8.0	43.2	0.105	8.7
Y. lipolytica DSM 70561 ^h	Glicerol (50) (NH ₄)NO ₃ (5)	Frascos 28 °C 180 rpm 96 h	3.54	35.54	0.010	5.39
Y. lipolytica JDC 335 ^h	igual	igual	3.56	46.16	0.013	7.51
Y. lipolytica (MTYL065) ⁱ	Glucosa (90) (NH ₄) ₂ SO ₄ (2) EL (1) Base nitrogenada (1.5) pH 6.8	Reactor 28 °C 250 rpm 2.5 vvm 120 h	27.0	61.7	0.139	19.5
Y. lipolytica Po1g ^j	Hidrolizado acido de bagazo de cana detoxificado Azucares reductores (20) EL (5) Peptona (5) pH 6.5	Frascos 26 °C 160 rpm 96 h	11.42	58.5	0.070	33.4
Y. lipolytica ATCC 20460 ^k	Hidrolizado acido de paja de trigo Azucares	Frascos 28 °C 200 rpm	7.8	4.6	0.0002	1.23

	reductores (29.2) MgSO ₄ 7H ₂ O (0.4) KH ₂ PO ₄ (0.2) MnSO ₄ H ₂ O (0.03) CuSO ₄ 5H ₂ O (.0001) EL (1.5) pH 5.5	144 h				
Y. lipolytica ACA-DC 50109 ^l	Inulina (50) (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.37) EL (0.35)	Frascos 28 °C 160 rpm 78 h	11.6	46.3	0.069	10.7
		Reactor 28 °C 250 rpm 6.7 vvm 80 h	14.3	50.6	0.090	27.3
Y. lipolytica QU21 ^m	Glicerol crudo (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.1) KH ₂ PO ₄ (0.1) MgCl ₂ 6H ₂ O (0.4)	Frascos 28 °C 150 rpm 96 h	4.92	30.1	0.015	7

Fuente: Fodecyt 003-2012

^a Andre et al (2009)

^b Enshaeieh et al (2013)

^c Fontanille et al (2012)

^d Juszczuk et al (2013)

^e Makkri et al (2010)

^f Papanikolaou et al (2007)

^g Papanikolaou et al (2002)

^h Sriwongchai et al (2013)

ⁱ Tai y Stephanopoulos (2013)

^j Tsigie et al (2011)

^k Yu et al (2011)

^l Zhao et al (2010)

^m Poli et al (2014)

ANEXO 3

Ejemplos de experimentos empleando etanol

Referencia	Aceite	Etanol: aceite molar	Catalizador % aceite peso	Temperatura °C	Conversión % (tiempo min)
Zhou et al 2003	Girasol	25:1	1.4 (KOH)	23	98.5 (30)
Meneghetti et al (2006)	Algodón	6:1	2.0 (NaOH)	80	88 (60)
Armenta et al (2007) ^a	Pescado	6:1	1.0 (KOH)	60	96.8 (60)
Bouaid et al (2007)	Girasol	7:1	1.5 (KOH)	32	93.6 (60)
Encinar et al (2007)	Aceite de rechazo	12:1	1.0 (KOH)	60	72 (60)
Kucek et al (2007)	Soya	12:1	0.3 (NaOH)	70	97.2 (60)
Ávila et al (2008)	Palma	6:1	1.3 (KOH)	50	88.2 (100)
Georgogianni et al. (2008)	Algodón	7:1	1.0 (NaOH)	80	65 (60)
			1.5 (NaOH)		68 (60) ^a
			2.0 (NaOH)		81 (60)
					77 (60) ^a
					86 (60)
					90 (60) ^a
Anastopoulos et al (2009)	Oliva Colza Aceite de rechazo	12:1	1.0 (NaOH)	80	81.4 (150)
Rodrigues et al (2009) ^a	Soya	10.2:1	0.35 (NaOH)	29	91.8 (30)
Hájek et al (2012)	Colza	6.7:1	1.11 (KOH)	25	91.1 (180)
Kumar y Kumar (2013)	Jathropa	4:1	0.75 (KOH)	-	97.8 (10)
Paiva et al (2013)	Babassu	9:1	1.0 (KOH)	30	96.7 (60)
Velickovic et al (2013)	Girasol	12:1	1.25 (NaOH)	75	97.6 (5)
Fadhil et al (2014)	Mostaza	8:1	0.90 (KOH)	60	94.0 (60)

^a Ultrasonido

Fuente: FODECYT 003-2012

ANEXO 4

Resultados de los seis experimentos del diseño factorial 22 con repetición del punto central de la reacción de transesterificación del etanol con un aceite comercial de una mezcla de aceites de soya y girasol bajo efectos de ultrasonido.

Experimento 1

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46664		
1	2	1.45386	0.01278	68.41
2	4	1.45033	0.01631	86.07
3	6	1.44917	0.01747	91.87
4	10	1.44865	0.01799	94.47
5	15	1.44846	0.01818	95.42
6	20	1.44825	0.01839	96.47
7	25	1.44829	0.01835	96.27
8	30	1.44835	0.01829	95.97
9	35	1.44825	0.01839	96.47
10	40	1.44824	0.01840	96.52
11	60	1.44800	0.01864	97.72

Fuente: FODECYT 003-2012

Experimento 2

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46664		
1	2	1.45621	0.01043	56.66
2	4	1.45451	0.01213	65.16
3	6	1.45365	0.01299	69.46
4	8	1.45326	0.01338	71.41
5	10	1.45314	0.01350	72.02
6	15	1.45293	0.01371	73.07
7	20	1.45310	0.01354	72.22
8	25	1.45280	0.01384	73.72
9	30	1.45267	0.01397	74.37
10	35	1.45302	0.01362	72.62
11	40	1.45283	0.01381	73.57
12	60	1.45258	0.01406	74.82

Fuente: FODECYT 003-2012

Experimento 3

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46693		
1	2	1.45335	0.01358	70.96
2	4	1.45219	0.01474	76.77
3	6	1.45104	0.01589	82.52
4	8	1.45058	0.01635	84.82
5	10	1.45039	0.01654	85.77
6	15	1.45017	0.01676	86.87
7	20	1.45020	0.01673	86.72
8	25	1.45011	0.01682	87.17
9	30	1.45065	0.01628	84.47
10	40	1.44990	0.01703	88.22
11	60	1.44978	0.01715	88.82

Fuente: FODECYT 003-2012

Experimento 4

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46697		
1	2	1.45630	0.01067	56.21
2	4	1.45550	0.01147	60.21
3	6	1.45523	0.01174	61.56
4	8	1.45529	0.01168	61.26
5	10	1.45521	0.01176	61.66
6	15	1.45526	0.01171	61.41
7	22	1.45510	0.01187	62.21
8	25	1.45500	0.01197	62.71
9	30	1.45515	0.01182	61.96
10	40	1.45495	0.01202	62.96
11	60	1.45367	0.01330	69.36

Fuente: FODECYT 003-2012

Experimento 5

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46751		
1	2	1.45808	0.00943	47.31
2	4	1.45618	0.01133	56.81
3	6	1.45530	0.01221	61.21
4	8	1.45488	0.01263	63.31
5	10	1.45454	0.01297	65.01
6	15	1.45444	0.01307	65.51
7	20	1.45477	0.01274	63.86
8	25	1.45434	0.01317	66.01
9	30	1.45432	0.01319	66.11
10	40	1.45420	0.01331	66.71
11	60	1.45426	0.01325	66.41

Fuente: FODECYT 003-2012

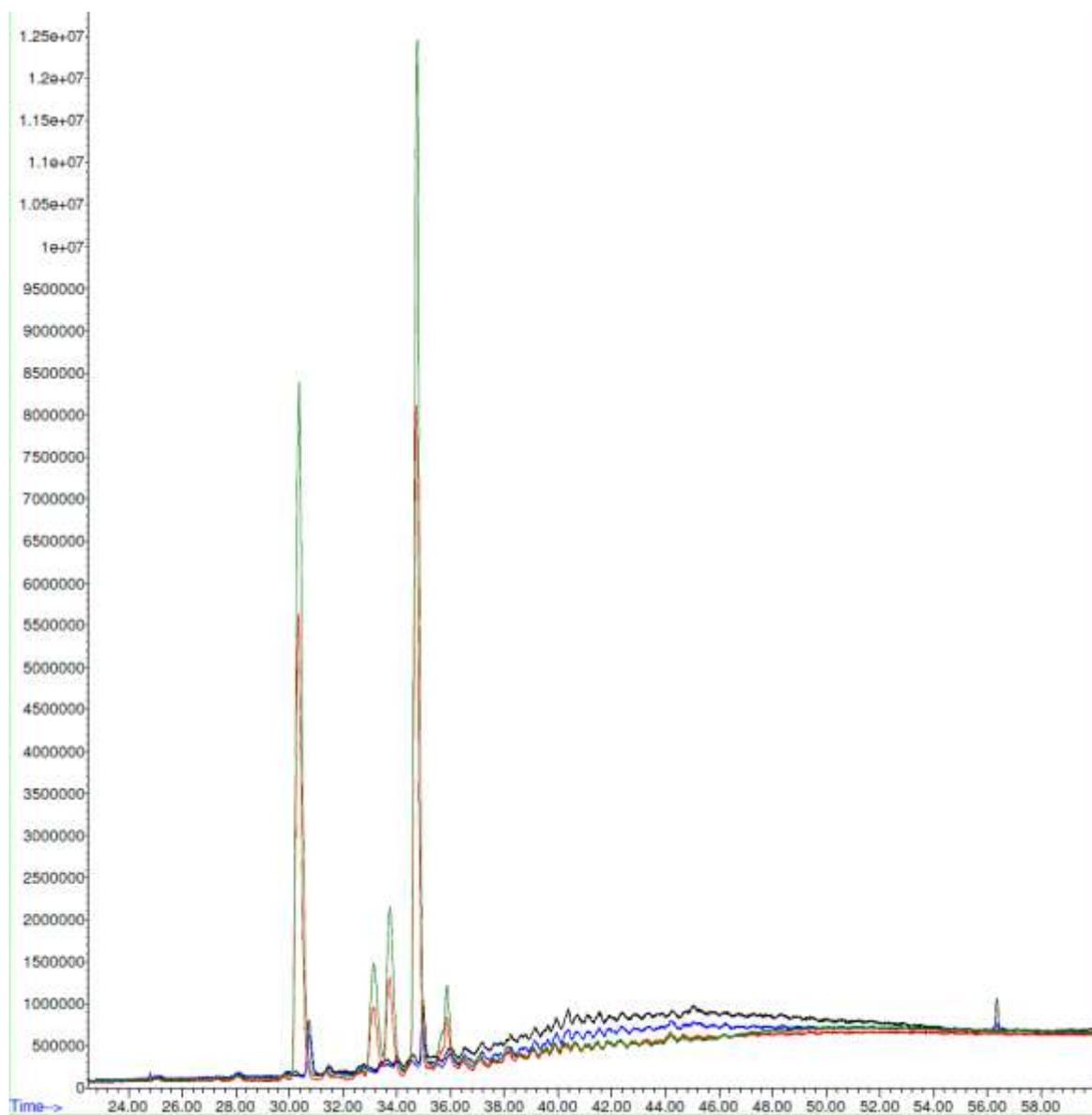
Experimento 6

Muestra	Tiempo, min	Índice de refracción	Disminución del índice de refracción	Conversión %
0		1.46691		
1	2	1.46099	0.00592	32.76
2	4	1.46029	0.00662	36.26
3	6	1.46020	0.00671	36.71
4	8	1.46014	0.00677	37.01
5	10	1.46017	0.00674	36.86
6	15	1.46011	0.00680	37.16
7	20	1.46014	0.00677	37.01
8	25	1.46014	0.00677	37.01
9	30	1.46011	0.00680	37.16
10	40	1.45999	0.00692	37.76
11	60	1.45995	0.00696	37.96

Fuente: FODECYT 003-2012

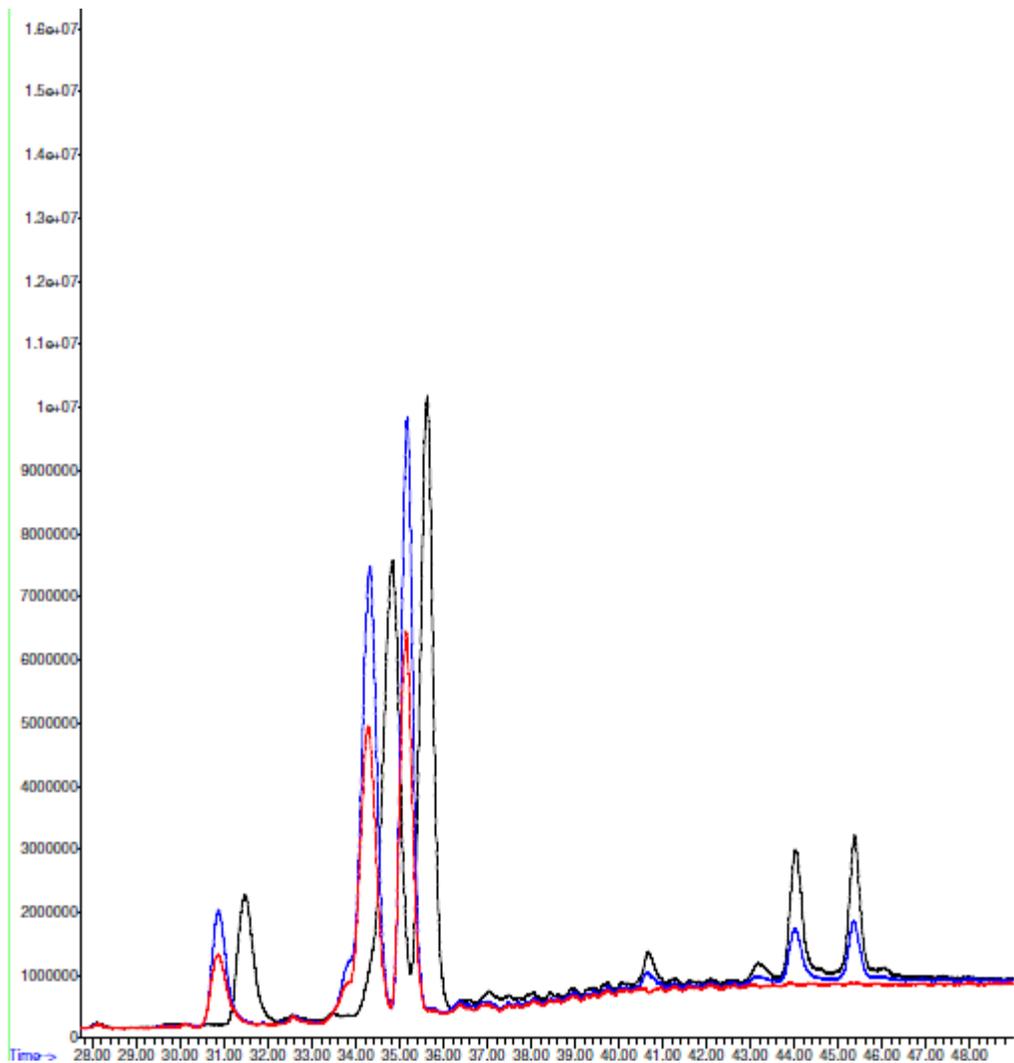
ANEXO 5

Cromatograma de la distribución de ácidos grasos del aceite del residuo extraído del café y de los ésteres etílicos formados por la extracción reactiva (transesterificación *in situ*). Trazo en rojo: aceite extraído con hexano. Trazo en verde: aceite extraído con etanol. Trazos en negro y azul: ésteres etílicos



ANEXO 6

Cromatograma de la distribución de ácidos grasos del aceite de semilla de ajonjolí y de los ésteres etílicos formados por la extracción reactiva (transesterificación *in situ*). Trazo en rojo: aceite extraído con hexano. Trazo en azul: aceite extraído con etanol. Trazo en negro: ésteres etílicos



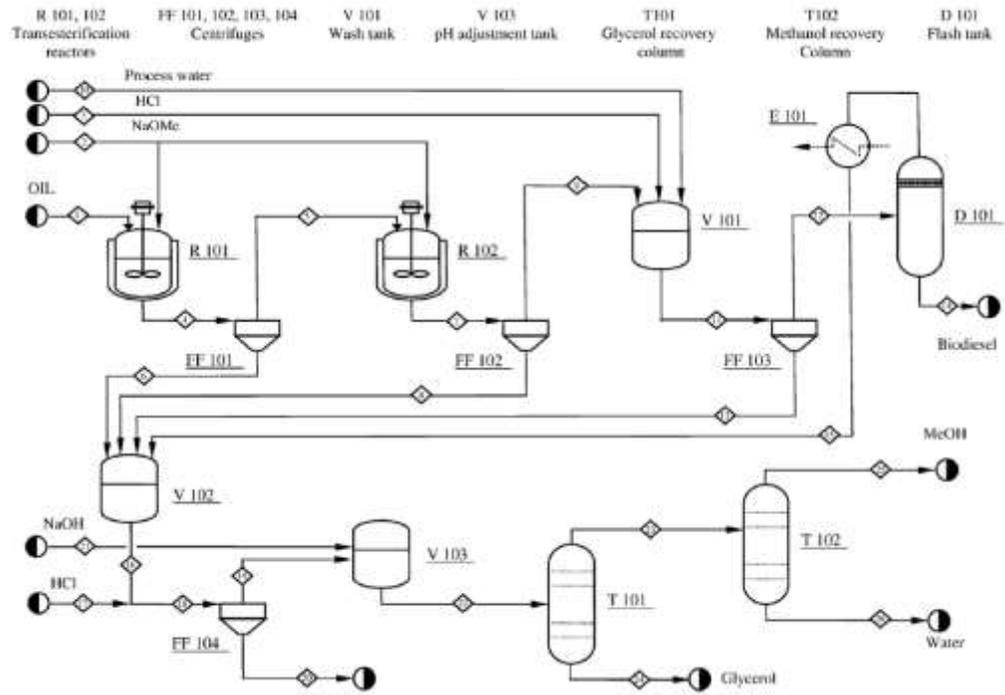
ANEXO 7

Análisis técnico económico de la producción de biodiesel de aceite de colza y metanol (Apostolakou et al, 2009)

Resumen

Capacidad
50,000 Mg/año (57,471 m ³ o sean 57.471 millones de litros)
Requerimientos materias primas
Aceite de colza: 50,800 Mg/año
Metanol: 5,400 Mg/año
Modo de operación
Por lotes
Costo fijo de inversión
M\$ 9.37
Costo de producción
\$ 67.53/ 50 kg
\$ 1.3506/ kg
\$ 1.175/ L

Diagrama de Flujo



Costo fijo de inversión

	Costo M\$	%
Reactores(dos)	0.561	5.99
Centrífugas (cuatro)	0.319	3.40
Tanques de proceso (tres)	0.240	2.56
Tanque de evaporación instantánea (uno)	0.043	0.46
Columnas de destilación (dos)	0.289	3.08
Intercambiadores de calor en proceso y columnas (cinco)	0.484	5.17
Tanques de almacenamiento de materias primas y productos (cuatro)	2.402	25.64
Costo de equipo	4.338	46.30
Costo de equipo instalado ^a	5.206	55.56
Costo fijo de inversión ^b	9.37	100.00

^a Estimado en 1.2 por el costo de equipo

^b Estimado en 1.8 por el costo del equipo instalado

Costos de producción

	M\$	% del costo de producción	M\$	% del costo de producción
Costos variables				
Materias primas ^a	57.900	87.86		
Materiales ^b	0.094	0.14		
Servicios de proceso ^c	0.910	1.38		
Total de costos variables			58.904	87.23
Costos fijos				
Mantenimiento ^d	0.940	1.43		
Mano de obra ^e	0.600	0.91		
Laboratorio ^f	0.120	0.18		
Supervisión ^f	0.120	0.18		
Overhead ^g	0.300	0.45		
Interés del capital ^h	1.406	2.13		
Seguro, impuestos, regalías ⁱ	0.375	0.57		
Total de costos fijos			3.861	5.71
Costos directos de producción			62.765	92.94
Overhead general y gastos de investigación ^j	3.140	4.765		
Costo de producción			67.53	100.00

^a Incluye el costo del aceite vegetal (colza con un precio de \$ 1,100/Mg, o sea, M\$55.866), el metanol (con un precio de \$300/Mg, o sea 1.62), el catalítico, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio

^b Estimado como el 1 % del costo fijo de inversión

^c Los servicios incluidos son la electricidad y el vapor

^d Estimado como el 10 % del costo fijo de inversión

^e Se estiman 15 operarios a un costo de \$40,000 por año por operario

^f En ambos casos se estima como un 20 % del costo de mano de obra

^g Se estima como un 50 % del costo de mano de obra

^h Se estima como un 15 % del costo fijo de inversión

ⁱ Se estima como un 4 % del costo fijo de inversión

^j Se estima como un 5 % de los costos directos de producción

ANEXO 8

Análisis técnico económico de la producción levadura oleaginosa, extracción del aceite y conversión a biodiesel (Koutinas et al, 2014)

Resumen

Capacidad
10,000 Mg/año (11,494 m ³ o sean 11.494 millones de litros)
Requerimientos materias primas
Glucosa: 42,081 Mg/año
Metanol: 1,086 Mg/año
Modo de operación
Por lotes
Costo fijo de inversión
M\$ 113.32
Costo de producción
\$ 64.95/ 10 kg
\$ 6.495/ kg
\$ 5.651/ L

Diagramas de flujo: producción de la levadura, extracción del aceite de la levadura, conversión del aceite a biodiesel

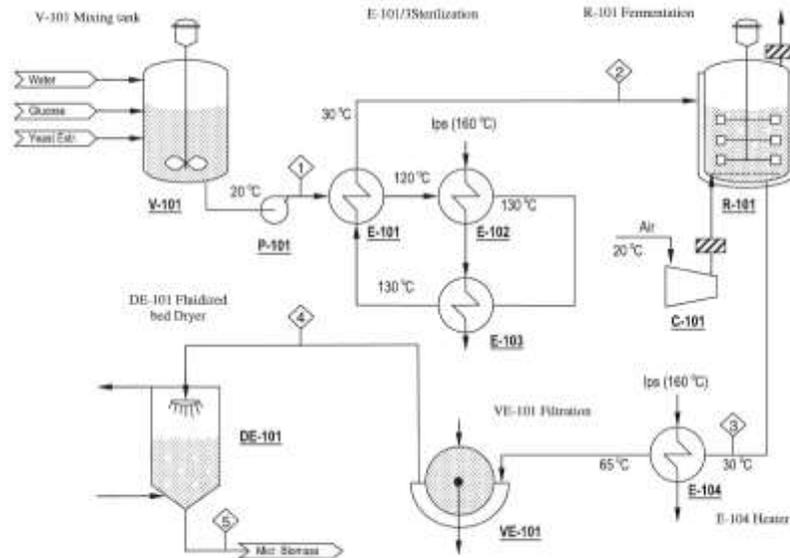


Fig. 1. Process flow diagram for the MO production process.

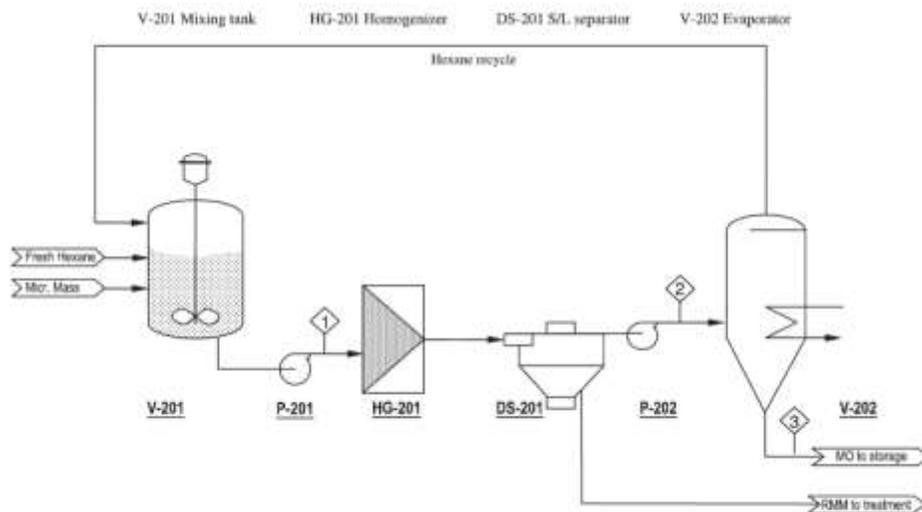


Fig. 2. Process flow diagram for the MO extraction process.

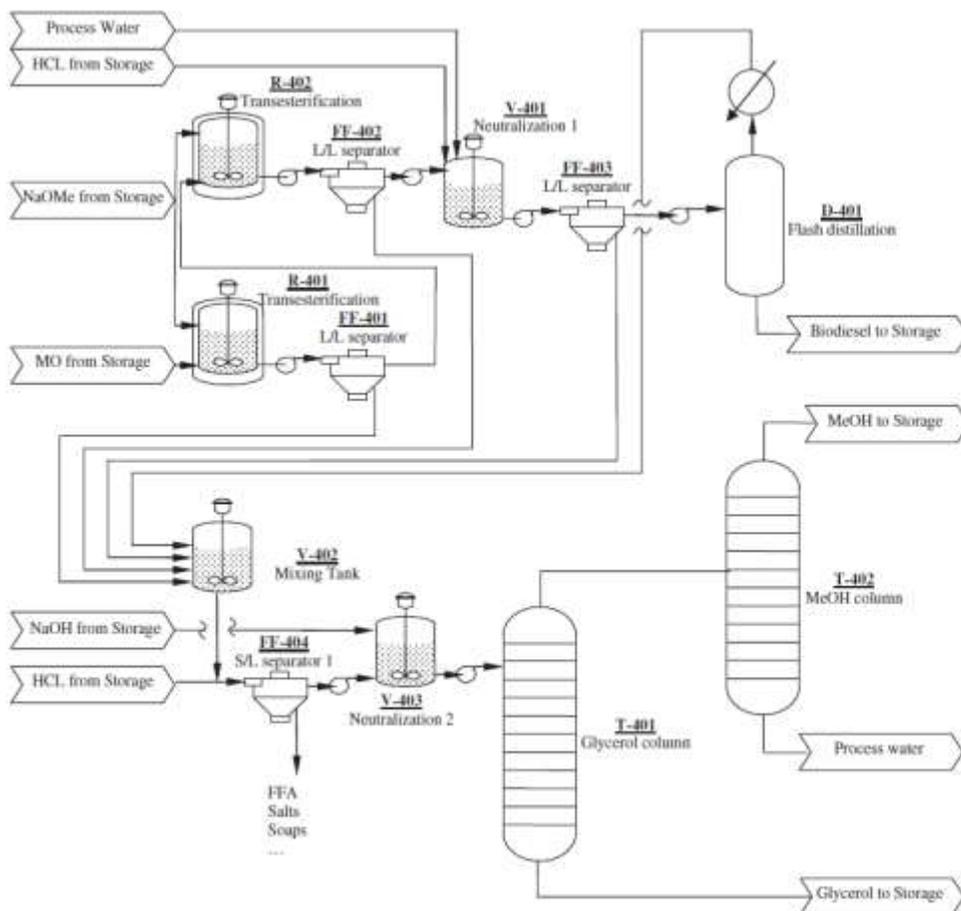


Fig. 4. Process flow diagram for the process of biodiesel production via transesterification of the MO (indirect process).

Costo fijo de inversión

Equipo	Costo M\$
Fermentadores	43.2
Reactores	0.268
Compresores	11.9
Centrífugas	0.229
Filtro	0.522
Secador	0.250
Homogenizador	0.375
Decantador-Separador	0.155
Evaporador de un efecto	0.306
Tanque de vaporización instantánea	0.013

Columnas de destilación	0.224
Intercambiadores de calor	2.685
Tanques de proceso y almacenamiento	2.470
Costo de equipo	62.60
Costo de equipo instalado ^a	62.96
Costo fijo de inversión ^b	113.32

^a Estimado en 1.2 por el costo de equipo

^b Estimado en 1.8 por el costo del equipo instalado

Costo de producción

	M\$	M\$	%
Costos variables			
Materias primas ^a	21.233		
Materiales ^b	1.13		
Servicios de proceso ^c	15.169		
Total de costos variables		37.532	57.79
Costos fijos			
Mantenimiento ^d	1.13		
Mano de obra ^e	0.875		
Laboratorio ^f	0.175		
Supervisión ^f	0.175		
Overhead ^g	0.438		
Interés del capital ^h	16.998		
Seguros, impuestos y regalías ⁱ	4.533		
Total de costos fijos		24.324	37.45
Costos directos de producción		61.856	95.24
Overhead general y gastos de investigación ^j			
	3.09		
Costo de producción		64.95	100.00

- ^a Incluye el costo de la glucosa (\$ 400/Mg) el extracto de levadura (\$ 400/Mg), el metanol (\$ 420/Mg), hexano (\$ 410/Mg), NaOH (\$ 2,600/Mg) y HCl (\$ 70/Mg)
- ^b Estimado como el 1 % del costo fijo de inversión
- ^c Los servicios incluidos son la electricidad, el vapor y el agua de enfriamiento.
- ^d Estimado como el 1 % del costo fijo de inversión
- ^e Se estiman 35 operarios a un costo de \$25,000 por año por operario
- ^f En ambos casos se estima como un 20 % del costo de mano de obra
- ^g Se estima como un 50 % del costo de mano de obra
- ^h Se estima como un 15 % del costo fijo de inversión
- ⁱ Se estima como un 4 % del costo fijo de inversión
- ^j Se estima como un 5 % de los costos directos de producción

V.1. INFORME FINANCIERO

AD-R-0013							
FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA							
LINEA: FODECYT							
Nombre del Proyecto:		<i>"Determinación, evaluación y optimización de la producción de biodiesel empleando la extracción acoplada a una reacción simultánea de biomasa rica en grasa"</i>					
Numero del Proyecto:		03-2012					
Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:		ING. CARLOS EDMUNDO ROLZ ASTURIAS					
Monto Autorizado:		Q310,125.00		Orden de Inicio: 02/07/2012			
Plazo en meses:		24 meses		1a. PRÓRROGA		01/07/2014 al 30/11/2014	
Fecha de Inicio y Finalización:		02/07/2012 al 30/06/2014					
Grupo	Renglon	Nombre del Gasto	Asignación Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar
				Menos (-)	Mas (+)		
1		SERVICIOS NO PERSONALES					
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 140,125.00			Q 117,625.00	Q 22,500.00
	189	Otros estudios y/o servicios (Evaluación externa de impacto)	Q 8,000.00				Q 8,000.00
2		MATERIALES Y SUMINISTROS					
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 30,000.00			Q 11,993.17	Q 18,006.83
	295	Útiles menores, médico-quirúrgicos y de laboratorio	Q 30,000.00	Q 13,305.00			Q 16,695.00
	298	Accesorios y repuestos en general	Q 7,000.00		Q 11,850.00	Q 18,850.00	Q -
	299	Otros materiales y suministros	Q 5,000.00				Q 5,000.00
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES					
	321	Maquinaria y equipo de producción	Q 90,000.00	Q 90,000.00			Q -
	323	Equipo médico-sanitario y de laboratorio			Q 91,455.00	Q 91,455.00	Q -
			Q 310,125.00	Q 103,305.00	Q 103,305.00	Q 239,923.17	Q 70,201.83
MONTO AUTORIZADO			Q 310,125.00			Disponibilidad Q 93,389.33	
(-) EJECUTADO			Q 216,735.67				
SUBTOTAL			Q 93,389.33				
(-) CAJA CHICA			Q -				
TOTAL POR EJECUTAR			Q 93,389.33				