

UNIVERSIDAD DE MANIZALES

FACULTAD DE CIENCIAS CONTABLES ECONOMICAS Y ADMINISTRATIVAS

MAESTRÍA EN DESARROLLO SOSTENIBLE Y MEDIO AMBIENTE

ACTA DE EVALUACION DE TESIS

El jueves 20 de agosto de 2015 en la Universidad de Manizales, se reunió el comité de evaluación de tesis, para calificar la tesis de grado de:

JORGE AUGUSTO HERNÁNDEZ MORA

Titulada: " Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con Saccharomyces cerevisiae y simulación del proceso a escala industrial". Adscrita a la Línea de Investigación Biosistemas Integradas cohorte VIII virtual bajo la dirección y asesoría de Walter Murillo Arango PhD y evaluada por Jhon Fredy Betancur Pérez PhD.

De acuerdo con lo anterior, los representantes del Comité de Evaluación y Jurados deciden considerar la tesis como:

APROBADA: <input checked="" type="checkbox"/>	RECHAZADA: <input type="checkbox"/>	APROBADA CON MODIFICACIONES: <input type="checkbox"/>
SOBRESALIENTE: <input type="checkbox"/>	MERITORIA: <input type="checkbox"/>	LAUREADA: <input type="checkbox"/>

OBSERVACIONES: *Es un BUEN TRABAJO, LOGROS EN SIMULACION AUNQUE CORTO EN EXPERIMENTACION. EL TRABAJO COMO MAESTRANTE ES MUY INTERESANTE. Y DE APORTES A LA INVESTIGACION.*

Carlos Arturo Betancur Pérez
 Nombre: _____

Jhon Fredy Betancur P.
 Nombre: *Jhon Fredy Betancur P.*

Irma Soto Vallejo

Irma Soto Vallejo
 Directora Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente



Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial

Jorge Augusto Hernández Mora

Universidad de Manizales
Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas
Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente
Manizales, Colombia
2015

Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial

Jorge Augusto Hernández Mora

Trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente

Director: Walter Murillo Arango
Doctor, en Ciencias Químicas

Línea de Investigación:
Biosistemas Integrados

Universidad de Manizales
Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas
Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente
Manizales, Colombia
2015

A Dios por otorgarme la fortaleza y la guía para superar las adversidades que se presentaron en este camino.

A mi padre que siempre me impulsaba a salir adelante con su constante motivación, a mi madre que con su apoyo y oraciones me brindaba la confianza para alcanzar mis metas y a mi familia por siempre estar presente cuando necesité su ayuda.

Jorge Hernández

Resumen

Como resultado del creciente mercado del biodiesel, se ha producido un aumento en la oferta de glicerina obtenida, lo cual ha impulsado la investigación de alternativas sostenibles de su aprovechamiento y conversión en productos de mayor valor agregado. En esta investigación, se evaluó la producción de etanol a partir de la glicerina por fermentación microbiana anaeróbica por medio de una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. En escala de laboratorio, se determinó la mayor producción de biomasa a una concentración de glicerina de 2,8 %v/v y el mayor rendimiento de etanol a 20 %v/v de glicerina y 10 %v/v de inóculo, con una conversión de aproximadamente 17%. Estos resultados se llevaron a escala industrial, por medio del software de simulación ASPEN HYSYS® para una planta de producción de 700 m³/año de etanol, para solucionar la necesidad que existe de encontrar y desarrollar tecnologías que permitan darle uso a la gran oferta disponible de glicerina.

Palabras clave: Aprovechamiento de subproductos, biocombustibles, fermentación microbiana, glicerina, procesos industriales.

Abstract

As result of the growing biodiesel market, there has been an increased supply of glycerin derived, which has prompted the search for sustainable alternatives for their use and conversion into higher value-added products. In this investigation, ethanol production was evaluated from glycerin by anaerobic microbial fermentation using a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. In laboratory scale, the higher biomass production was determined at a concentration of 2.8% v/v glycerol and the higher yield of ethanol at 20 %v/v glycerol and 10 %v/v inoculum, with a conversion about 17%. These results led to industrial scale, through simulation software ASPEN HYSYS® for a production of 700 m³/year of ethanol, to solve the need that exists to find and develop technologies that allow give great use to the available supply of glycerin.

Keywords: byproduct usage, biofuels, microbial fermentation, glycerin, industrial processes.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XI
Lista de Símbolos y abreviaturas	13
Introducción	15
1. Diseño Teórico	18
1.1 Título de la Investigación	18
1.2 Pregunta de Investigación	18
1.3 Descripción del Área Problemática	18
1.4 Justificación	22
1.4.1 Objetivo General	27
1.4.2 Objetivos Específicos	27
2. Referente Teórico	28
3. Diseño Metodológico	33
3.1 Tipo de Investigación	33
3.2 Procedimiento.....	33
3.3 Diseño Experimental.....	36
4. Resultados y Discusión	37
4.1 Comportamiento cinético	37
4.2 Determinación de Etanol.....	42
4.3 Simulación del proceso a escala industrial.....	47
5. Conclusiones y recomendaciones	59
5.1 Conclusiones	59
5.2 Recomendaciones	60
6. Bibliografía	61
A. Anexo: Evidencias fotográficas del proyecto.	69
B. Método de Winnick para la determinación de contenido de etanol	72

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Distribución del Porcentaje de Mezcla de Biodiesel en Colombia.....	19
Figura 1-2: Producción estimada de glicerina cruda en diferentes países	21
Figura 1-3: Producción y venta de etanol	26
Figura 2-1: Producción y venta de etanol	29
Figura 4-1: Comportamiento cinético de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> a 37°C	37
Figura 4-2: Comportamiento cinético de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> a temperatura ambiente (20 - 25°C).....	38
Figura 4-3: Crecimiento de Biomasa a diferentes temperaturas y concentraciones de glicerina	39
Figura 4-4: Velocidad específica de crecimiento a concentración de glicerina 2,8% v/v. 41	
Figura 4-5: Comportamiento cinético de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> a temperatura ambiente	43
Figura 4-6: Rendimiento de etanol a diferentes concentraciones de inóculo	43
Figura 4-7: Rendimiento de etanol a diferentes concentraciones de glicerina e inóculo .44	
Figura 4-8: Rendimiento de etanol por los diferentes tratamientos realizados.....	45
Figura 4-9: Degradación de la glucosa por la vía de la piruvato descarboxilasa.....	46
Figura 4-10: Simulación de la producción de etanol a escala industrial.....	49
Figura 4-11: Plano de reactor de fermentación	55
Figura 4-12: Plano de Intercambiador de Calor.....	56
Figura 4-13: Plano Columna de Destilación	57

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación.....	41
Tabla 4-2: Contenido de etanol a diferentes concentraciones de glicerina e inóculo	42
Tabla 4-3: Balances de materia de producción de etanol.....	53
Tabla 4-3: (Continuación) Balances de materia de producción de etanol	53
Tabla 4-3: (Continuación) Balances de materia de producción de etanol	54
Tabla 4-3: (Continuación) Balances de materia de producción de etanol	54

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
%v/v	Porcentaje Volumen/Volumen	Porcentaje	
®	Marca Registrada	1	
B10	Mezcla de combustible Diesel 90% - Biodiesel 10%	1	
B5	Mezcla de combustible Diesel 95% - Biodiesel 5%	1	
G	Potencia 10 ⁹	Giga	
G	Unidad de Masa	Gramos	
g/l	Unidad de Densidad	Gramos/Litros	
kg/día	Unidad de Flujo másico	Kilogramos por día	
KPa	Unidad de Presión	Kilo Pascales	
Ln	Logaritmo Natural		
l/día	Unidad de Flujo Volumétrico	Litros/día	
l/h	Unidad de Flujo Volumétrico	Litros/hora	
ml	Unidad de Volumen	Mililitros	
msnm		Metros sobre el nivel del mar	
°C	Unidad de Temperatura	Grados Centígrados	
P	Presión	KPa	$\frac{F}{A}$
pH	Medida de acidez o alcalinidad	1	
T	Temperatura	°C	
Td	Tiempo de Duplicación	h ⁻¹	Ec. 4.5
USP	United States Pharmacopeia	1	
vvm	Unidad de velocidad de flujo de aire	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μ	Velocidad Especifica de crecimiento	Células/h	Ec. 4.4
Δ	Delta	1	

Subíndices

Subíndice	Término
N	Cantidad de Átomos

Superíndices

Superíndice	Término
N	Exponente, potencia

Introducción

La demanda de combustible se ha incrementado en todo el mundo en los últimos años, en Colombia, de acuerdo a proyecciones de la Unidad de Planeación Minero Energética (2014) la demanda de barriles diarios de combustible de gasolina ascenderá anualmente en un 3% aproximadamente. A su vez, las reservas de petróleo a nivel global han disminuido, Mohr *et al*, (2015) sugieren que la producción de combustibles fósiles en el mundo puede alcanzar su punto máximo antes de 2025 y disminuir rápidamente a partir de entonces. Además de la disminución drástica de las reservas, la volatilidad de precios, a nivel ambiental existe una preocupación mundial por el incremento de la concentración de gases de invernadero, producto de la combustión de materiales fósiles, tales como CO₂, SO₂ y NO_x causantes de la contaminación atmosférica. La acumulación de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero en la atmósfera antes mencionados, se cree que son los responsables del cambio climático, que se prevé que tendrán consecuencias globales desastrosas para la vida del planeta (Jegannathan, *et al*. 2009).

Por tal motivo, se ha dirigido un aumento en la investigación de fuentes alternativas de combustible como los biocombustibles que incluyen etanol, diesel, butanol, etc. a partir de recursos renovables, como caña de azúcar, palma de aceite, biomasa y otros subproductos agrícolas, un factor clave, ya que Colombia es un país que posee las características geográficas y climáticas necesarias para la producción de biocombustibles, como el biodiesel a partir de aceite de palma y el etanol a partir de caña de azúcar (Moncada *et al*. 2014).

De acuerdo a cifras de la Federación Colombiana de Biocombustibles, la producción de biodiesel ha aumentado significativamente en los últimos años, en el año 2014 se produjeron 518152 toneladas de biodiesel. No obstante, el proceso convencional de transesterificación de aceites para la obtención de biodiesel da como resultado la glicerina como producto secundario, en un 10% aproximadamente con respecto a la cantidad de aceite utilizado.

Este aumento de la producción de biodiesel como una alternativa al petróleo, ha generado una acumulación de glicerina, aproximadamente 50000 toneladas anuales de glicerina en Colombia, si no se le da un manejo adecuado, muy pronto se convertirá en un problema de tipo ambiental, debido a la acumulación de este subproducto. Y asimismo, en una oportunidad económica, ya que al reutilizar la glicerina como materia prima en otro proceso, se fortalecerá la cadena productiva de la palma de aceite.

La utilización de la glicerina cruda tiene una amplia gama de posibilidades ya es una de las sustancias químicas más versátiles y valiosas, y tiene una amplia variedad de usos y aplicaciones. Actualmente, se puede utilizar como energético. La combustión de glicerina con gasolina reduce las emisiones de SO₂ hasta seis veces menos que las producidas por la gasolina pura. Además, las concentraciones de NO_x en los gases de combustión caen en el rango de 250-280 mg/m³ y la emisión de partículas también disminuye significativamente (Striugas *et al.* 2008). De igual forma, Skoulou *et al.* (2012) sugieren que la pirólisis combinada de glicerina cruda con la biomasa produce un combustible gaseoso rico en H₂. Otra alternativa de la utilización de la glicerina es la producción de biogás de forma anaeróbica en biodigestores. Por su alto contenido de carbono fácilmente degradable, presenta propiedades favorables para la digestión en procesos productivos por lotes y continuos (Fountoulakis *et al.* 2010).

Asimismo, a partir de la mezcla de glicerina, con diferentes sustratos por medio de un proceso de fermentación y separación, se pueden obtener diferentes productos como etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (Yu *et al.*, 2010a), por *Enterobacter aerogens* (Nwachukwu *et al.* 2012) y por *Escherichia coli* (Trinh & Srienc, 2009). Otro producto que se puede obtener es el 1,3-Propanodiol, un compuesto orgánico simple usado como insumo para múltiples aplicaciones industriales, obtenido por diferentes especies de bacterias, tales como la *Klebsiella pneumonie* (Zhao *et al.*, 2006), *Citrobacter freundii* (Metsoviti *et al.* 2013) y *Clostridium spp.* (Kubiak *et al.*, 2012). Además, la glicerina puede ser utilizada como materia prima para la producción de hidrógeno mediante procesos microbianos (Sarma *et al.*, 2012). De manera similar, se ha desarrollado la obtención de ácido succínico por la fermentación de glicerina por medio de *Actinobacillus succiniciproducens* en biorreactores por lotes (Vlysidis *et al.*, 2011).

La glicerina también puede incorporarse con éxito en la alimentación animal como suplemento, sin afectar la digestión y el tránsito intestinal de cerdos de engorde (Kovács *et al.*, 2011), y la absorción de nutrientes en aves de corral (Kim *et al.*, 2013). Igualmente, en el caso del ganado vacuno Holstein, permanecen constantes el consumo de alimento, la producción y la composición de la leche con la adición de glicerina a la dieta de alimentación (Wang *et al.*, 2009). De la misma manera, al añadir glicerina al suelo, se obtiene una respuesta positiva significativa de los parámetros microbianos que causa un efecto beneficioso sobre la calidad del suelo para el crecimiento de las plantas. (Alotaibi & Schoneau, 2011).

De igual forma, a partir de esta sobreproducción, la glicerina se ha convertido en una materia prima ideal para producir compuestos reducidos a través de la fermentación anaeróbica por medio de microorganismos que puede utilizar la glicerina como fuente de carbono para la obtención de diversos productos. La glicerina para el desarrollo del proyecto fue provista por la empresa Ecodiesel S.A., dedicada a la producción de biodiesel a partir de aceite de palma.

La presente investigación se planteó simular un sistema a escala industrial para la producción de etanol por medios fermentativos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glicerina, subproducto de la producción de biodiesel, en base al comportamiento cinético del microorganismo. Utilizando glicerina como sustrato, mediante curvas de crecimiento. Posteriormente, una fase anaerobia permitió producir etanol a escala de laboratorio y de esta manera, se modeló el sistema de producción de etanol a escala industrial a través del Software de Simulación ASPEN PLUS®.

1. Diseño Teórico

1.1 Título de la Investigación

Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial

1.2 Pregunta de Investigación

¿Cómo utilizar la glicerina obtenida como subproducto en la producción de biodiesel, para la producción sostenible de etanol a escala industrial por medios fermentativos a partir de una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*?

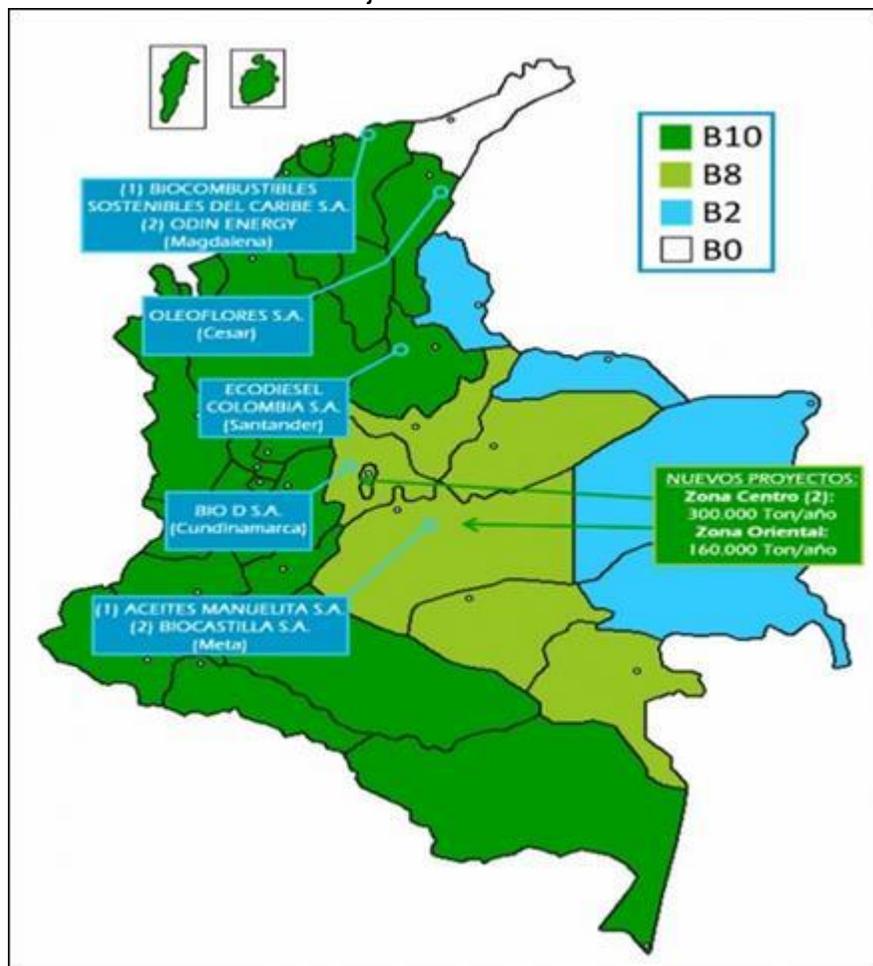
1.3 Descripción del Área Problemática

Durante años la base de la industrialización de los países, ha sido el uso masivo de combustibles fósiles. Esta gran dependencia respecto al uso de combustibles fósiles ha generado históricamente dos tipos de preocupaciones, en primer lugar, la preocupación por los impactos ambientales de la combustión masiva de combustibles fósiles y, sobre todo, sus efectos en el cambio climático y en segundo lugar, la inestabilidad de los precios de dichos combustibles y la incertidumbre del agotamiento de los pozos petroleros, que han despertado un interés mundial en la investigación de nuevas fuentes de energía de carácter renovable que solucionen estos problemas. Bajo ésta y otras argumentaciones de tipo técnico, social y económico es como surgen los biocombustibles como el biodiesel y el etanol (Mangoyana *et al.*, 2013).

A partir de lo anterior, numerosos países como USA, China, Japón, Brasil, la Unión Europea han implementado una legislación que obliga a las refinerías a la producción y comercialización de combustible que contenga cantidades legisladas de biocombustible para disminuir las emisiones atmosféricas, en mezclas con derivado de petróleo y que además proveen un incremento gradual de tales cantidades para los próximos años.

Es así, como en nuestro país, a la ley 939 de 2004, regulo en su momento que para el periodo 2008 – 2009, se iniciará la utilización de biocombustible tipo biodiesel en el parque automotor mediante el esquema B5 (Diesel 95% - Biodiesel 5%) según ABC de Biodiesel de palma, y el incremento de B10 (Diesel 90% - Biodiesel 10%) en años posteriores. La figura 1-1 es la distribución actual de las mezclas de biodiesel y diesel común, correspondiente al 1 de mayo de 2014.

Figura 1-1: Distribución del Porcentaje de Mezcla de Biodiesel en Colombia



Fuente: FedeBiocombustibles, 2014.

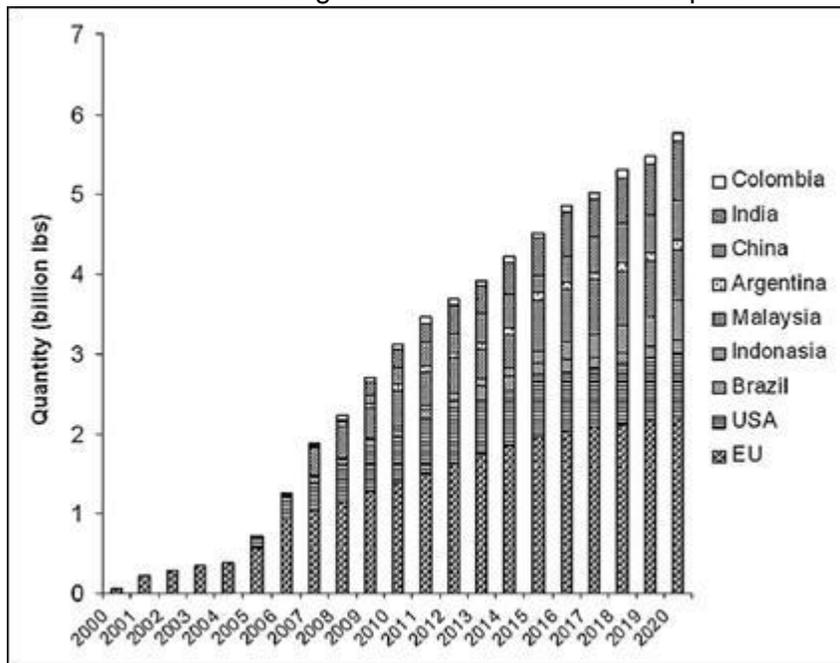
Cabe destacar, que el proceso convencional de transesterificación de aceites para la obtención de biodiesel da como resultado la glicerina como producto secundario, en un 10% aproximadamente con respecto a la cantidad de aceite utilizado, (Demirbas, 2009),

lo que en concordancia con el creciente mercado de este sector, también produce un aumento en la oferta de glicerina. Como la producción de biodiesel ha aumentado, la producción de glicerina ha crecido y se ha saturado el mercado (Sabourin-Provost & Hallenbeck, 2009). Este mercado relativamente estable ha sido alterado drásticamente por la llegada de biodiesel.

Cantidades crecientes de glicerina comenzaron a inundar el mercado mundial y los precios comenzaron a caer, llegando a los valores históricos más bajos, debido a la producción de combustibles renovables impulsada por los subsidios, exenciones fiscales, y los mandatos de uso. Cuando se refina a una sustancia químicamente pura, como la glicerina, puede ser un muy valioso subproducto del proceso de producción de biodiesel, con cientos de usos. Sin embargo, la purificación, es costosa y generalmente fuera del rango de viabilidad económica para la pequeña y mediana industria de biodiesel. (Quispe *et al*, 2013).

De esta forma, el precio se ha reducido en un factor de 10 en los últimos años. La gran cantidad de glicerina en gran parte derivado del aceite de palma en países como Malasia e Indonesia (los mayores productores de glicerina) jugó además en el precio de glicerol de caer a 33 centavos de dólar por kilogramo o menos. De manera similar, en 2011, el precio del glicerol crudo en USA es tan baja, de 2 a 5 centavos de dólar por libra (de 4 a 11 centavos por kilogramo), según Pagliaro *et al*, 2007.

De esta forma, la figura 1-2 muestra la producción de glicerina cruda estimada resultante de la producción de biodiesel en distintos países. Se evidencia que la producción estimada de glicerina alcanzaría 5,8 mil millones libras en 2020. Esto se debe a la demanda de biodiesel que se proyecta a los 8 mil millones de galones en 2020. También se observa que la producción de glicerina fue muy baja, es decir, menos de mil millones libras antes de 2006 y en su mayoría producidos por la Unión Europea. Después de 2006, la producción de glicerina incrementó rápidamente y muchos otros países como EE.UU., Indonesia, Malasia, China y la India comenzaron a producir glicerina. (Ayoub & Abdullah, 2013). Otros países con producción de glicerina serían Malasia, India, China, Indonesia, Brasil, Argentina y Colombia.

Figura 1-2: Producción estimada de glicerina cruda en diferentes países

Fuente: Ayoub & Abdullah (2012).

En el caso particular de Colombia, este subproducto, significa una gran cantidad de glicerina, aproximadamente 50000 toneladas de glicerina al año, convirtiéndose en un problema de disposición de material, muy a pesar de las numerosas aplicaciones industriales que presenta la glicerina. Por lo tanto, hoy en día ante el incremento de la demanda de biodiesel, existe el temor de que esta producción genere una superabundancia de glicerina, con el consiguiente problema de gestión o eliminación del mismo (Da Silva, et al., 2009).

De igual forma, esta cantidad de glicerina a largo plazo va a generar un problema de almacenamiento y de tipo ambiental por la disposición de este subproducto de la planta de producción de biodiesel a partir de aceite de palma, que en su estado crudo, contiene impurezas y residuos de materia prima.

Actualmente se conocen distintas aplicaciones posibles para la glicerina y sus derivados, que se comercializan según sus grados de calidad; pero lo cierto es que no existen aún propuestas de usos definidas para la glicerina obtenida como subproducto

del biodiesel, debido a que en general, ésta no cumple el estándar mínimo de calidad, (Hasheminejad *et al*, 2011)

Consecuentemente, es necesario evaluar nuevas alternativas de uso de la glicerina de baja calidad de una forma sostenible, siendo utilizada como energético en la combustión directa, pirolisis, producción de etanol, biogás e hidrógeno, aditivo de combustibles; Como suplemento alimenticio y como insumo para la industria química en la obtención de ácido succínico o 1,3 Propanodiol, y de fertilizantes, generando con ello un valor agregado a la producción de biodiesel. (Leoneti *et al*, 2012).

Otro factor a tener en cuenta, es la emisión de gases de efecto de invernadero producidos por los combustibles fósiles. Los principales subproductos generados a partir de la ignición de combustibles son óxidos de carbono (CO y CO₂), óxidos de azufre (SO₂ y SO₃) y los óxidos de nitrógeno (NO y NO₂, denotados por NO_x). Las emisiones de CO₂ están directamente relacionada con el efecto invernadero. Una de las consecuencias negativas de SO₂ es la lluvia ácida (a la que contribuye NO_x). La combustión de materiales tales como metales pesados y toxinas produce otros componentes peligrosos que son perjudiciales para el medio ambiente incluso en concentraciones pequeñas, (Coronado *et al*, 2014).

En Colombia, según el Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero - INGEI 1990 – 2008, este fenómeno se evidencia de nuevo en el año 2009 en el que las emisiones han alcanzado el máximo valor de la serie temporal con 72653 Gg de CO₂ – eq. En promedio, el 90% de las emisiones de gases de efecto invernadero de este sector son a causa de CO₂, mientras que el CH₄ y el N₂O tienen una participación más baja de 9% y 1% respectivamente.

1.4 Justificación

En base a la gran oferta de glicerina, como subproducto de la producción de biodiesel, es importante ser más eficientes energéticamente y con respecto a este escenario de producción, se pueden obtener dos biocombustibles: biodiesel (a base de aceites

vegetales) y etanol (a través de la fermentación del subproducto), donde en comparación con las materias primas lignocelulósicas, la producción de etanol a base de glicerina se considera más barata porque no es necesario someter la materia prima a pretratamiento.

La fermentación anaeróbica de glicerina por microorganismos y el aprovechamiento de este proceso metabólico para convertir gran cantidad de glicerina de bajo costo en productos de mayor valor. Se presta especial atención a los productos cuya síntesis de glicerina sería ventajoso en comparación con su producción a partir de azúcares comunes. (Yazdani & González, 2007).

Para garantizar la viabilidad a largo plazo de biorrefinerías, es esencial ir más allá de la plataforma basada en carbohidratos y desarrollar tecnologías que complementan capaces de producir combustibles y productos químicos a partir de una amplia gama de materiales disponibles como la glicerina, un compuesto disponible y barato, generado durante la producción del biodiesel. El alto grado de reducción de átomos de carbono de la glicerina le confiere la capacidad de producir combustibles y productos químicos reducidos en mayores rendimientos en comparación con el uso de carbohidratos (Clomburg & González, 2013).

Por esta razón, se ha motivado la investigación de otras estrategias de recuperación de recursos, siendo una opción la bioconversión del glicerina a compuestos de alto valor a través de fermentación microbiana anaeróbica dado que el glicerina no solo es económica y abundante sino que por su mayor grado de reducción de azúcares ofrece la oportunidad de obtener productos químicos reducidos como el succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrógeno, etc., con mayores rendimientos que los obtenidos usando azúcares, lo que representa una vía prometedora para lograr la viabilidad económica en la industria de los biocombustibles (Wang *et al*, 2001).

Asimismo, la glicerina se ha convertido en una materia prima ideal para producir compuestos reducidos a través de la fermentación anaeróbica. Yazdani & González (2007), identificaron las condiciones medioambientales que permiten la fermentación de glicerina en *Escherichia coli*, junto con las vías y los mecanismos que median este

proceso para la conversión eficiente de glicerina en bruto en etanol a un costo menor que los procesos tradicionales que utilizan la caña de azúcar.

No obstante, las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos.

De igual manera, la elevada tasa de crecimiento obtenida bajo condiciones aeróbicas facilita el escalado del inóculo hasta las condiciones de cantidad de biomasa requerida para iniciar el proceso de fermentación, además de la fácil consecución de cepas de levadura a nivel comercial y su menor costo en comparación con cepas bacterianas (Cardona & Orrego, 2009). Cárdenas *et al.* (2006), evaluaron la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* en dos medios de cultivo con glicerina USP (G1A y G1B) y un medio con glicerina proveniente de la producción del biodiesel. Se pudo observar que las cepas nativas presentaron una productividad 1,6 veces superior cuando fueron cultivadas en el medio G1B y un rendimiento de 1,3-PD 128% más alto con el medio G1B. La cepa nativa IBUN13A incrementó su productividad en un 28% en un medio con glicerina industrial.

En este sentido, este proyecto busca contribuir con la solución del problema que se presenta por dificultades en el manejo de un subproducto de la planta de producción de biodiesel a partir de aceite de palma, como la glicerina, que en su estado crudo, contiene impurezas y residuos de materia prima, por lo tanto, la glicerina no tiene muchas aplicaciones industriales o son consideradas de muy bajo valor comercial.

De igual forma, el manejo adecuado de este subproducto, de acuerdo a una alternativa más viable de aprovechamiento, impactará positivamente el desarrollo tecnológico del proceso productivo, impulsando la investigación en el sector agrícola palmicultor como medio para la mejora continua de los procesos de la cadena productiva.

Asimismo, con biomasa residual, se generaría un biocombustible de segunda generación, con los beneficios ambientales que conlleva el uso del etanol, como la

disminución de las emisiones producidas durante la combustión a lo largo del ciclo de vida del combustible, las cuales incluyen todas aquellas producidas en las diferentes etapas de producción, transporte, procesamiento y utilización. (Siles *et al*, 2009).

La principal ventaja de la producción de biocombustibles de segunda generación a partir de materias primas no comestibles, como la glicerina subproducto del proceso de producción de biodiesel, es que no existe competencia directa con materias primas utilizadas en la alimentación, lo que se asocia a los biocombustibles de primera generación, (Singh P. & Singh A. 2011). Como bien dice Larson (2008), las características básicas de las materias primas tienen potencial para reducir los costos, y la energía significativa y beneficios ambientales para la mayoría de los biocombustibles de segunda generación.

De igual manera, Da Silva *et al.* (2009), destaca que el exceso de glicerina generada puede convertirse en un problema medioambiental, ya que no se puede eliminar en el medio ambiente. Una de las posibles aplicaciones es su uso como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano en microbiología industrial.

Yazdani & González (2007), afirman que corrientes ricas en glicerina generadas en grandes cantidades por la industria de los biocombustibles, especialmente en la producción de biodiesel, presenta una excelente oportunidad para establecer biorrefinerías. La fermentación anaeróbica de glicerina por medios fermentativos y el aprovechamiento de este proceso metabólico para convertir abundantes cantidades de glicerina de bajo precio en productos de mayor valor agregado, creando así un camino para la viabilidad de la industria de los biocombustibles.

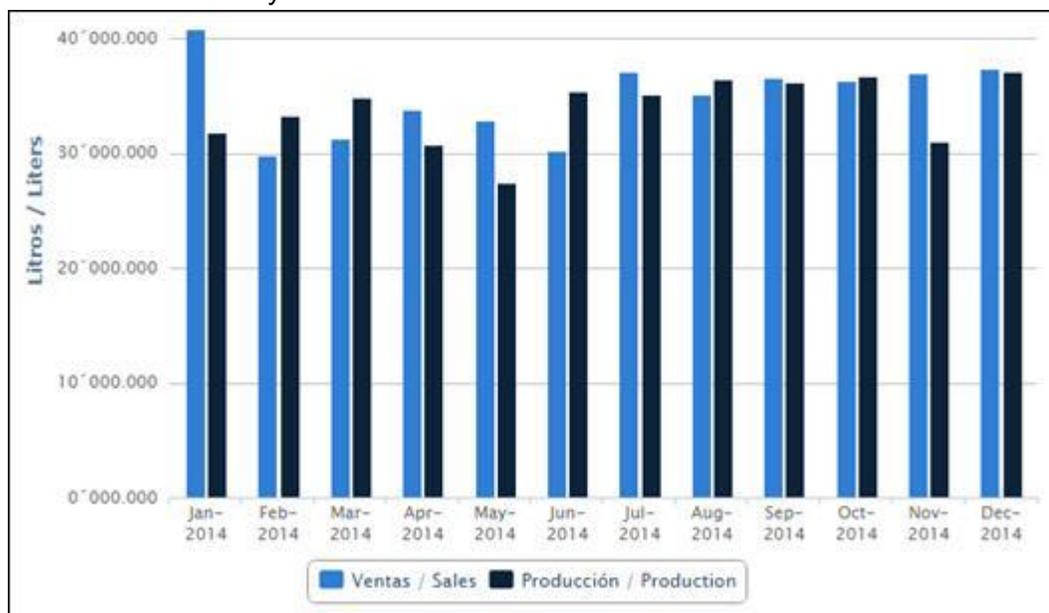
De esta forma, la utilización del etanol, causa el mejoramiento del medio ambiente, exactamente en la calidad de los gases generados por la combustión, el etanol emana menos cantidad de material particulado que el combustible corriente y menos óxidos de nitrógeno y azufre, lo que reduce notablemente la contaminación del aire y los efectos nocivos generados al medio ambiente por la utilización de combustibles fósiles.

De acuerdo con la Federación Colombiana de Biocombustibles, con la mezcla de solo 10% de etanol con la gasolina, se disminuyen en 27 por ciento las emisiones de monóxido de carbono en carros nuevos, 45% en carros típicos colombianos de 7-8 años de uso y 20 por ciento de hidrocarburos no quemados a nuestra atmósfera, con las positivas consecuencias para la salud humana y ambiental.

De igual forma, las ventas de etanol para el año 2014, superaron en 11503000 litros la producción de etanol en Colombia según Federación Colombiana de Biocombustibles, de acuerdo a la figura 1-3, por lo tanto, de realizar el montaje de la planta de producción de etanol a partir de glicerina, existe la posibilidad de cubrir ese requerimiento en la producción.

Actualmente en el territorio nacional, la distribución del porcentaje de mezcla de etanol - gasolina, corresponde a un 8%, excepto en departamentos como La Guajira, Norte de Santander y Arauca, sin embargo, se espera un incremento gradual en la mezcla para los próximos años, de acuerdo al decreto 4892 del 2011, Por el cual se dictan disposiciones aplicables al uso de alcoholes carburantes y biocombustibles para vehículos automotores, siendo una oportunidad para la producción de etanol.

Figura 1-3: Producción y venta de etanol



Fuente: Fedebiocombustibles, 2015.

Dicho sistema servirá como punto de partida para el desarrollo de otras investigaciones relacionadas con el tema y sus resultados aportarán al conocimiento sobre la producción de biocombustibles líquidos a partir de glicerina, contribuyendo así a la aplicación de intervenciones eficaces y eficientes por parte de las empresas productoras de biodiesel y etanol.

Este trabajo busca realizar una simulación del proceso a escala industrial de la producción de etanol, por medios fermentativos a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en base a un trabajo de laboratorio para encontrar la concentración óptima de glicerina para el crecimiento de los microorganismos y el software de simulación ASPEN HYSYS® para calcular las propiedades fisicoquímicas y equipos necesarios para escalar el proceso, en base a 10.000 l/día de glicerina como materia prima, obtenida de la producción de 100.000 l/día de biodiesel, que es el tamaño de plantas más común en Colombia.

1.4.1 Objetivo General

Simular la producción de etanol a escala industrial por medios fermentativos utilizando una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* usando glicerina, subproducto de biodiesel, a partir de datos cinéticos bajo condiciones experimentales a escala de laboratorio.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el comportamiento cinético de *Saccharomyces cerevisiae* en la glicerina mediante curvas de crecimiento.
- Producir etanol a partir de *Sacharomyces cerevisiae* a escala de laboratorio utilizando glicerina, subproducto de biodiesel.
- Modelar el sistema de producción de etanol a partir de glicerina, por medio del Software de Simulación ASPEN PLUS® a escala industrial.

2. Referente Teórico

El biodiesel es un combustible sustituto del gasoil para motores diesel, normalmente producido partiendo de materias primas agrícolas (aceites vegetales y/o animales) y alcohol (metanol/etanol), los cuales a su vez, también pueden obtenerse del procesamiento de residuos agrícolas (Jegannathan *et al.*, 2011). De la producción de biodiesel se genera glicerina cruda como subproducto, lo que significa una gran cantidad de glicerina cuando la escala productiva aumenta, convirtiéndose en un problema de disposición de material, muy a pesar de las numerosas aplicaciones industriales que presenta la glicerina (Singhabhandhu y Tezuka, 2010).

El proceso convencional de transesterificación de aceites para la obtención de biodiesel da como resultado la formación de glicerina como producto secundario, aproximadamente en un 10% con respecto a las materias primas utilizadas. (Demirbas, 2008).

La glicerina, o 1, 2,3-Propanotriol, es un alcohol simple, con muchos usos en la industria cosmética, pintura, alimentación, tabaco, farmacéutica, pulpa y papel, industrias textiles y de cuero o como materia prima para la producción de diversos productos químicos (Wang *et al.*, 2001). La glicerina no es tóxica para la salud humana y para el medio ambiente (U.S. Food and Drug Administration, 1979).

Físicamente, la glicerina es un líquido claro, soluble en agua, casi incoloro, inodoro, viscoso, higroscópico con un punto de ebullición alto. Químicamente, es un alcohol trivalente, capaz de reaccionar como un alcohol, sin embargo, estable en la mayoría de condiciones. La glicerina se puede utilizar como una fuente renovable para productos biodegradables y también encontrar aplicaciones en procesos de refinería. Puede tener un gran valor ambiental para la sociedad moderna que favorezca la independencia de fuentes combustible de materias primas fósiles, (Yang *et al.*, 2013).

Una de las posibles aplicaciones de la glicerina, subproducto del proceso de producción de biodiesel, es su uso como fuente de carbono y energía para el crecimiento

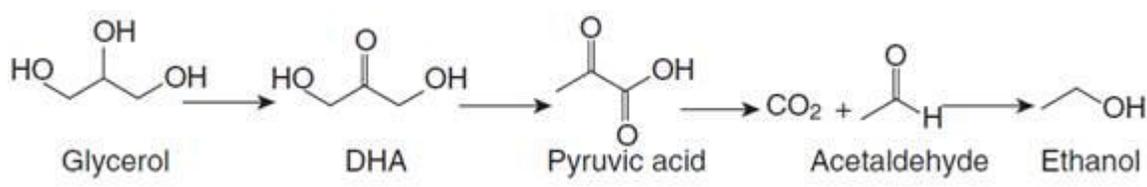
microbiano en microbiología industrial, destacando la bioconversión de la glicerina en productos químicos valiosos, tales como 1,3-propanodiol, dihidroxiacetona, etanol, succinato, etc. (Clomburg & González, 2013).

De igual forma, la glicerina también se puede utilizar para la producción de etanol por medios fermentativos. Los recursos biológicos renovables están disponibles a nivel mundial en forma de biomasa agrícola residual y otros residuos, que se puede transformar en biocombustibles líquidos como etanol y biodiesel (Nigam P. & Singh A., 2011).

De igual forma, diversas especies de levaduras pueden participar en las fermentaciones espontáneas, pero las especies del género *Saccharomyces*, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, desempeñan un papel importante en la producción de bebidas fermentadas, alimentos e industria (Dequin & Casaregola, 2011).

De acuerdo a Pinto & De Araujo (2014) la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza la vía glucolítica general para la mayoría de su producción de energía. Los hidratos de carbono se convierten en ácido pirúvico, que se descarboxila a acetaldehído, y luego en etanol. A partir de glicerina, la vía implica la formación de dihidroxiacetona (DHA) y ácido pirúvico, de acuerdo a la Figura 2-1.

Figura 2-1: Producción y venta de etanol



Fuente: Pinto y De Araujo, 2014

En la Fermentación, un proceso típico se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del

proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos. (Crueger, 1993).

Es importante tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente ligadas e integradas ya que es indispensable que el proceso sea optimizado globalmente. Cada etapa debe considerar la importancia e influencia de los procesos y operaciones anteriores y también de los siguientes para poder cumplir con ese concepto de integración.

El Etanol es un compuesto inflamable que no tiene color y tiene olor característico de los alcoholes. Se puede producir a partir de cultivos como el maíz, la papa, la remolacha, la yuca, el sorgo y la caña, ya que estos contienen carbohidratos que fermentan y se transforman en alcohol. Asimismo, el etanol es un combustible oxigenado que contiene 35% de oxígeno, lo que reduce de partículas y óxidos de nitrógeno (NOx) procedentes de la combustión. El uso de combustible mezclado con etanol para los automóviles puede reducir significativamente el consumo de petróleo y las emisiones de gases de efecto invernadero (Wang *et al.*, 1999).

De manera similar, el etanol tiene un mayor número de octano (108), límites de inflamabilidad más amplios, mayor velocidad de llama y calor de vaporización. Estas propiedades permiten una mayor relación de compresión y más corto tiempo de combustión, que conducen a ventajas teóricas de eficiencia sobre la gasolina en un motor de combustión interna, de acuerdo a Balat & Balat, (2009).

Por tal motivo, el etanol se puede mezclar con la gasolina para utilizarse en los vehículos convencionales, según la Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. En nuestro país, se promulgó la ley 693 de 2001, la cual establece que en septiembre del año 2005, las ciudades con más de 500 mil habitantes, como Bogotá, Cali, Medellín y Barranquilla, deberán utilizar gasolina en una mezcla 10% de etanol.

Estudios preliminares (Al-Hasan, 2003) muestran que la gasolina sin plomo mezclada con etanol aumenta la potencia de frenado, el torque del motor, la eficiencia térmica de freno y el consumo de combustible, mientras que disminuye el consumo de combustible específico del freno y la relación de aire - combustible. Las concentraciones de CO y emisiones de hidrocarburos no quemados (HC) disminuyen, mientras que el CO₂ aumenta. El etanol al 20 %v/v de mezcla de combustible presentó los mejores resultados para todos los parámetros medidos en todos los regímenes del motor. De igual forma, Longfei et al, (2012) mostraron que los combustibles con altas proporciones de etanol generaron más hollín que los combustibles con pequeños porcentajes de mezcla de etanol.

En 2012, Kasavi *et al.*, evaluaron cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriales por su sostenibilidad para uso los procesos de producción de etanol. El crecimiento y el rendimiento de producción de etanol, se valoró en diversos residuos agroindustriales (incluyendo pasta de azúcar de remolacha, almidón y melaza de remolacha azucarera) y residuos biológicos (como la zanahoria, tomate y patatas). Análisis de componentes principales de los parámetros de fermentación relacionados con el crecimiento y la producción de las 5 cepas cultivadas en glucosa, demostraron la superioridad de una de las cepas (Y9) en términos de su rápido crecimiento y los rendimientos más altos de etanol.

De igual forma, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fue metabólicamente diseñada para mejorar la producción de etanol a partir de glicerina. Las altas tasas de utilización de glicerina se lograron por la sobreexpresión simultánea de glicerina deshidrogenasa (gcy) y dihidroxiacetona quinasa (Dak). La producción de etanol en general en la cepa YPH499 (pGcyaDak, pGupCas) fue 3,4 veces más que en la cepa salvaje, con alrededor de 2.4 g/l etanol producido (Yu *et al.*, 2010a). En estudios posteriores (Yu *et al.*, 2010b), demostraron la posibilidad de proporcionar protección contra la presión osmótica al mismo tiempo aumentar etanol y la reducción de la producción de glicerina en cepas de *S. cerevisiae* utilizando glicerina como fuente de carbono. Asimismo, Ochoa - Estopier *et al.* (2011), demuestra que el crecimiento sucesivo de la *S. cerevisiae* CBS 8066, CEN.PK 113-7D en glicerina como única fuente de carbono mejoró considerablemente la producción de etanol desde 0,01 hasta 0,2 h⁻¹.

De manera similar, la glicerina cruda se puede convertir por medio de cepas de *Escherichia coli* en etanol, aprovechando el alto contenido de carbono, permitiendo así la producción de etanol y subproductos como hidrógeno y formiato (Yazdani & González, 2008). La producción óptima de etanol depende de la disponibilidad de oxígeno que regula las dos vías, aeróbica y anaeróbica, que compiten por la biomasa y la producción de etanol. El acoplamiento entre el crecimiento celular y la producción de etanol se activa a través de dilución en serie de la cepa diseñada, que resultó en cepas con mejores rendimientos y productividades de etanol. En medio definido, la cepa evolucionada de *Escherichia coli* pudo convertir 40 g/litro de glicerina a etanol en 48 horas con un rendimiento teórico del 90% (Trinh & Srienc, 2009). Murarka *et al.*, 2008 demostraron que aproximadamente el 20% del carbono incorporado en la fracción de proteína de la biomasa del metabolismo de la *E. coli* para la producción de etanol se originó a partir de la glicerina presente.

Otro microorganismo utilizado en la producción de etanol, a partir de glicerina, es la bacteria *Enterobacter aerogens*. Reungsang *et al.* (2013) determinaron que el pH inicial, la temperatura, la concentración del extracto de levadura y la concentración de glicerol tenían un efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) en la producción de etanol e hidrógeno por *Enterobacter aerogens*. Nwachukwu *et al.* (2012) crearon una cepa de *E. aerogens* capaz de soportar altas concentraciones de glicerina y resistir la inhibición de etanol para obtener 1,02 mol etanol / mol glicerol.

3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación de este estudio es de enfoque cuantitativo experimental debido a la utilización de tres grupos experimentales y un grupo control en la fase de obtención del etanol, además de la manipulación de las variables independientes como Concentración del sustrato, temperatura de fermentación.

A nivel de laboratorio se estudió la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en glicerina purificada (Ver Anexo A) por medio de ensayos repetitivos de las curvas de crecimiento determinando parámetros cinéticos indispensables como tiempos de duplicación (td) y velocidades específicas de crecimiento (μ), variación de pH y concentración de etanol.

Posteriormente, se recolectó la información obtenida de los datos a escala laboratorio, se procedió a ingresar los valores en un software de simulación de procesos *Aspen HYSYS*®, a fin de correlacionar dichas variables a un proceso de escala industrial.

3.2 Procedimiento

Las fases del proyecto fueron:

FASE 1. Activación y establecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* panaria (Muestra comercial). Se utilizó como material de partida, 1 gramo de la levadura seca, reconstituida en 50 ml de solución de sacarosa al 10% estéril, procurando su homogenización y a una temperatura constante de 37°C. Transcurridos de 15 minutos se tomará una muestra y se sembrara por agotamiento en Agar Sabouraud, y se incubó a 37°C durante 48 horas, para el establecimiento de la cepa madre de este microorganismo; seguido a este periodo de

tiempo se realizó un recuento en cámara de Neubauer para evaluar la pureza de la misma.

FASE 2. Determinación del comportamiento cinético de *Saccharomyces cerevisiae*. La determinación del comportamiento cinético del microorganismo en estudio se realizó mediante curvas de crecimiento, para lo cual se recurrió al caldo extracto de levadura (CEL) como medio control (T0), y se utilizó un medio a base de glicerina USP a tres diferentes concentraciones designándose como (T1), (T2) y (T3), quedando conformado el diseño experimental por cuatro tratamientos los cuales se realizaron por triplicado para comparar estadísticamente de los resultados, bajo condiciones de temperatura ambiente, 1 vvm de aireación (volumen de aire/volumen de medio/minuto) y volumen de trabajo de 800 ml. La inoculación del medio de cultivo se realizó en base a un porcentaje del 4% respecto al volumen final de trabajo de cada montaje, dicho porcentaje se utilizó tanto para las curvas de crecimiento como para los procesos fermentativos en los reactores de 2 litros. Para reducir o eliminar la fase de latencia o adaptación del microorganismo se trabajará con un periodo de preinóculo consistente en 8 a 12 horas de adaptación en el medio de cultivo a evaluar (glicerina). La glicerina utilizada estaba compuesta por 80,13% glicerina, 10% agua y 9,87% impurezas.

En el monitoreo de las primeras 12 horas de trabajo se establecieron intervalos de tres horas. Luego de este tiempo, se realizaron otros monitoreos hasta completar 36 horas del mismo. Se evaluaron las concentraciones de biomasa por recuento directo en cámara de Neubauer. Estas mediciones permitieron determinar las variables cinéticas como velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y rendimiento de etanol.

FASE 3. Establecimiento condiciones de proceso para la optimización del medio de cultivo y estandarización de la fermentación. La producción de etanol conllevó dos etapas, una aerobia y otra anaerobia o fermentativa, de estas la primera se analizó en la fase anterior, lo que permitió determinar los tiempos y condiciones necesarios en dicha etapa. Para la fase fermentativa o anaerobia, se evaluaron dos temperaturas de proceso, se realizó a temperatura ambiente en un rango de 20 a 25°C y de 37°C, según

los datos bibliográficos, la temperatura para el crecimiento óptimo de *Saccharomyces cerevisiae* (Folch-Mallol *et al*, 2004).

FASE 4. Rendimiento de producción de etanol a partir de glicerina cruda. El contenido de etanol se realizó mediante el método de Winnick (Ver Anexo B), para diferentes concentraciones de glicerina e inóculo. Se utilizó la celda de Conway, donde el etanol presente en la muestra en una de las cámaras de la unidad sellada, origina su difusión hacia la segunda cámara o compartimiento. La oxidación de etanol a ácido acético ocurre por la presencia de dicromato de potasio en ácido sulfúrico; el exceso de dicromato que queda sin reaccionar se mide por la reacción con yoduro de potasio para formar yodo que se valora con tiosulfato de sodio en presencia de almidón como indicador, que permite la determinación de la cantidad de etanol presente en cada muestra.

Luego de cuantificar los porcentajes de etanol en cada tratamiento se procedió a analizar estos resultados mediante un análisis ANOVA multifactorial, el cual permitió determinar las diferencias entre los tratamientos según el porcentaje de etanol producido, además de realizar una prueba de múltiples rangos Tukey 5%, que indicó cual de los tratamientos evaluados generó la mayor producción de etanol bajo las condiciones evaluadas y que condiciones incidieron positiva o negativamente en la producción de dicho metabolito. Todo se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

FASE 5. Simulación de la producción de etanol a escala industrial. Luego de recolectada la información obtenida de los datos a escala laboratorio, se ingresaron los valores en el software de simulación de procesos Aspen HYSYS®, a fin de correlacionar dichas variables a un proceso de escala industrial, obteniendo datos de los flujos de entrada y salida, las condiciones de operación y las operaciones unitarias necesarias de la producción de etanol por medios fermentativos a partir de glicerina.

La simulación se realizó en estado estacionario, en base a una planta de producción de biodiesel de 100.000 litros/día, que es la capacidad de producción más frecuente en las

plantas de biodiesel en Colombia, de la cual, se generan 10.000 kg/día de glicerina cruda generada.

3.3 Diseño Experimental

Como primera aproximación al estudio experimental del proceso de producción de etanol se realizó una exploración experimental a escala laboratorio tomando muestras de diferentes concentraciones de glicerina obtenida como subproducto en la planta de producción de biodiesel, para medir el crecimiento de biomasa. A partir de los resultados (Figura 4-1 y 4-2), se pudo inferir acerca de algunos parámetros importantes en el proceso de producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, como cuando se aumenta la concentración de glicerina, el crecimiento de la levadura disminuye.

El diseño experimental consistió en un diseño factorial, que es el tipo de experimento más empleado en ingeniería y producción, donde se controlan diversos factores e investigan sus efectos a dos o más niveles y se ensayan todas las posibles combinaciones de los dos niveles de los dos factores (Juran & Godfrey, 2001). El diseño factorial fue 3^2 (3 niveles 2 variables operacionales) conformado por un medio de cultivo a 3 concentraciones diferentes, bajo 3 concentraciones de glicerina para condiciones de temperatura ambiente en un rango de 20 a 25°C y de 37°C realizados por triplicado para analizar estadísticamente los resultados, para un total de 54 montajes, con reactores de 800 ml.

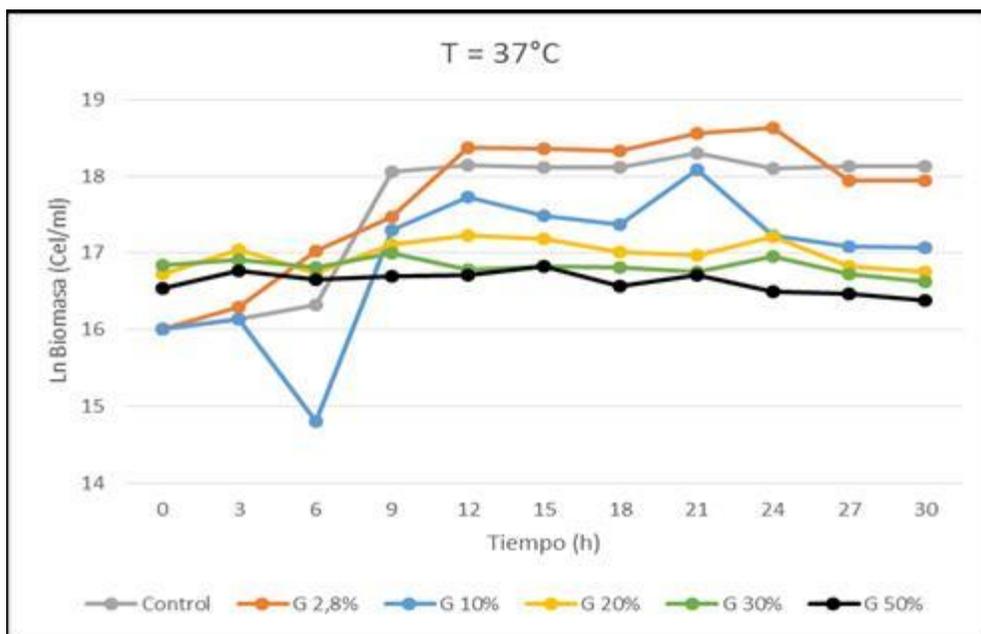
4. Resultados y Discusión

4.1 Comportamiento cinético

La bioconversión de la glicerina añade un valor significativo a la productividad de la industria de biodiesel. Este trabajo expuso un posible proceso de producción biotecnológica basado en glicerina, que demuestra que este producto químico simple es una nueva fuente de carbono abundante, y es prometedora para microbiología industrial y las biorrefinerías.

Se determinó la fase exponencial de cada uno de los tratamientos para evaluar el comportamiento cinético de la *Saccharomyces Cerevisiae* en la fase aerobia utilizando la glicerina como sustrato, de acuerdo a la figura 4-1, se determinó el crecimiento de biomasa para diferentes concentraciones de glicerina, presentando un mayor crecimiento de biomasa, superior a la cepa control, en aquel reactor con glicerina al 2.8% e inóculo al 10% a temperatura de 37°C.

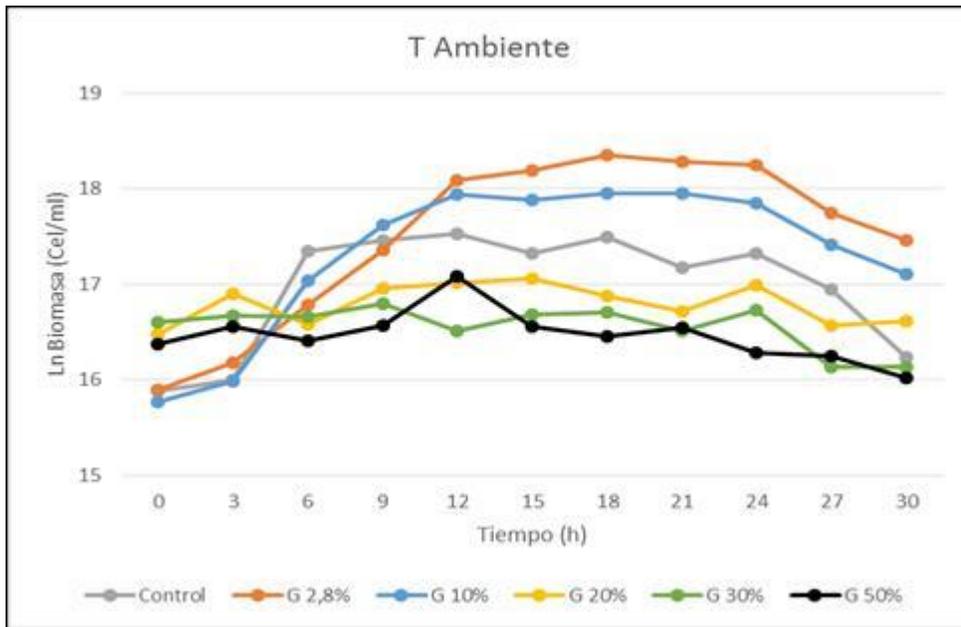
Figura 4-1: Comportamiento cinético de *Saccharomyces Cerevisiae* a 37°C



Fuente: Autor

De manera similar en la figura 4-2, se determinó el crecimiento de biomasa para diferentes concentraciones de glicerina a temperatura ambiente, presentando un mayor crecimiento de biomasa, superior a la cepa control, en aquellos reactores con glicerina al 2.8 %v/v y 10% v/v e inóculo al 10%.

Figura 4-2: Comportamiento cinético de *Saccharomyces Cerevisiae* a temperatura ambiente (20 - 25°C)

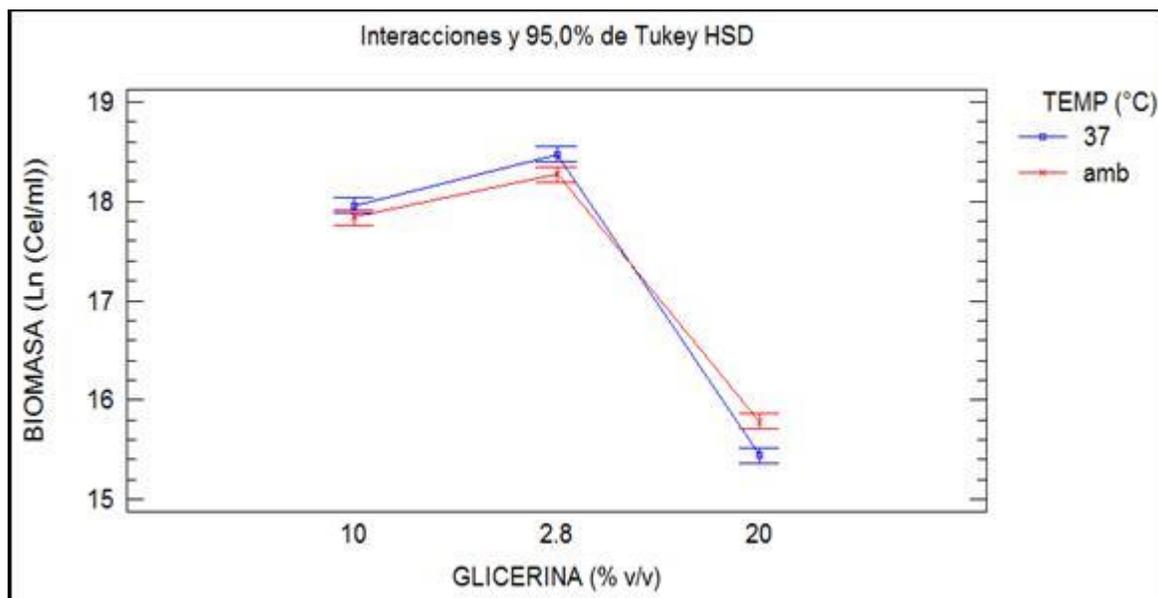


Fuente: Autor

De los resultados obtenidos inicialmente (Figura 4-1 y 4-2), se observa que para diferentes concentraciones de glicerina, tanto a temperatura de 37°C como a temperatura ambiente, el mayor crecimiento de biomasa se presentó en el tratamiento que tenía una concentración de 2,8 %v/v, para la fase aerobia, que fue el único que en ambas temperaturas reflejó un crecimiento exponencial superior a 1×10^6 células/ml, y para concentraciones altas como de 30 %v/v, 50%v/v presenta una inhibición por sustrato. Caso similar ocurre en la investigación realizada por Lin *et al.* (2012) cuya máxima conversión de azúcar en una incubación de 72 horas fue 48,0%, 59,9%, 28,3%, 13,7%, y 3,7% a 20, 40, 80, 160 y 300 kg/m³ de glucosa, respectivamente, lo que ilustra que el aumento de la concentración inicial de glucosa puede disminuir la eficiencia de conversión de etanol.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se trabajó con las concentraciones que arrojaron un mayor contenido de crecimiento de biomasa para la fase aerobia. De esta manera, se evaluó el crecimiento de biomasa a las temperaturas analizadas, de acuerdo a la figura 4-3.

Figura 4-3: Crecimiento de Biomasa a diferentes temperaturas y concentraciones de glicerina



Fuente: Autor

Al realizar la correlación de estos datos para diferentes temperaturas y concentraciones de glicerina (Figura 4-3), se observa que los parámetros se entrecruzan y por lo tanto, no existe una diferencia significativa entre las dos temperaturas analizadas, a 37°C y a temperatura ambiente (Temperatura entre 20 y 25°C para la ciudad Cúcuta que está a 320 msnm) de lo que conlleva a que en el proceso a escala industrial no se tenga en cuenta un calentamiento y el crecimiento de biomasa se lleve a temperatura ambiente.

Para analizar los resultados de crecimiento, se evaluó el comportamiento cinético de la *Saccharomyces cerevisiae* en glicerina a una concentración de 2,8 %v/v, para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ), de acuerdo a la Ecuación de

Monod (Ver Ecuación 4.1) y los tiempos de duplicación (Ver Ecuación 4.2) que es la concentración que reflejaba el mayor crecimiento de biomasa.

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_F - \text{Ln } X_O}{\Delta t} \quad (4.1)$$

$$td = \frac{\text{Ln } 2}{\mu} \quad (4.2)$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento

Ln : Logaritmo Natural

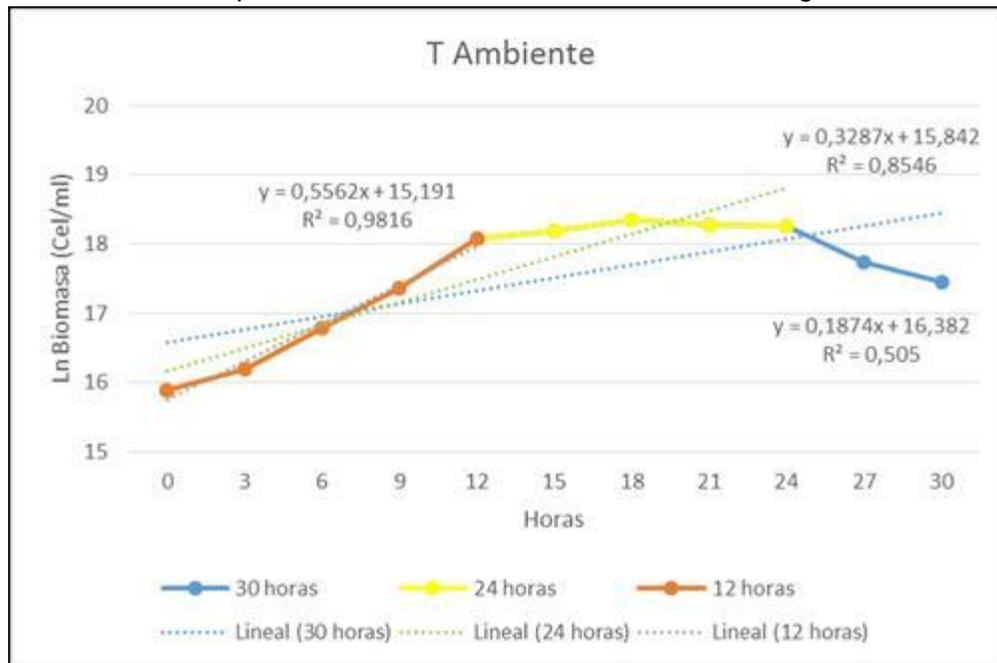
X_F : Concentración final

X_O : Concentración inicial

Δt : Tiempo final - Tiempo inicial

td : Tiempo de duplicación

De esta forma, se calculó la velocidad específica de crecimiento para diferentes periodos de tiempo que reflejaban un crecimiento exponencial de biomasa, para una concentración de glicerina de 2,8% a temperatura ambiente, de acuerdo a la figura 4-4.

Figura 4-4: Velocidad específica de crecimiento a concentración de glicerina 2,8% v/v

Fuente: Autor

A partir de la figura 4-4, se calculó la velocidad específica de crecimiento por método gráfico correspondiente a la pendiente de la recta y los tiempos de duplicación en la tabla 4-1.

Tabla 4-1: Velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación

	12 Horas	24 Horas	30 Horas
Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	0,5562	0,3287	0,1874
Tiempos de duplicación (h)	1,25	2,11	3,70

De acuerdo a la figura 4-4 y la tabla 4-1 se determinó que el periodo de aerobiosis de crecimiento de biomasa es de 12 horas, ya que presenta la mayor velocidad específica de crecimiento y el menor tiempo de duplicación, lo que indica que existe una mayor cantidad de células en menor tiempo, y por la tanto, una mayor cantidad de etanol ya que tienen más capacidad de metabolizar el sustrato en el que crece la levadura, evitando el estrés del microorganismo, ya que tanto en la naturaleza, en el laboratorio,

como en procesos industriales, *S. cerevisiae* puede atravesar por diferentes situaciones adversas para su crecimiento, siendo las más importantes condiciones de estrés térmico, osmótico y oxidativo (Folch-Mallol *et al*, 2004).

4.2 Determinación de Etanol

A partir de los resultados, se estableció el contenido de etanol por triplicado mediante el método de Winnick (Tabla 4-2), para diferentes tratamientos conformados por diferentes concentraciones de glicerina e inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* para la fase anaerobia.

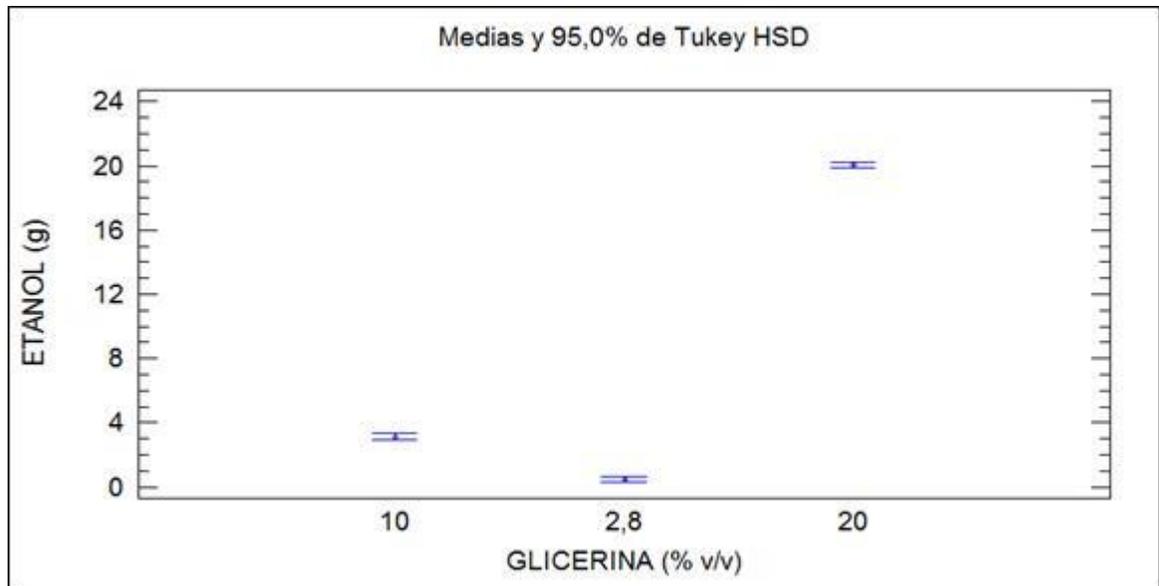
Tabla 4-2: Contenido de etanol a diferentes concentraciones de glicerina e inóculo para la fase anaerobia

Muestra	Glicerina %	Inóculo %	mg Etanol/ml Glicerina		g Etanol		% Conversión	
			Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
T 1	2,8	10	36,06	4,04	0,81	0,09	3,61	0,40
T 2	2,8	5	9,98	1,33	0,22	0,03	1,00	0,13
T 3	2,8	1	17,65	4,04	0,40	0,09	1,76	0,40
T 4	10	10	40,67	2,66	3,25	0,21	4,07	0,27
T 5	10	5	41,05	2,90	3,28	0,23	4,11	0,29
T 6	10	1	36,06	5,19	2,89	0,42	3,61	0,52
T 7	20	10	176,87	2,40	28,30	0,38	17,69	0,24
T 8	20	5	108,96	2,66	17,43	0,43	10,90	0,27
T 9	20	1	89,78	3,05	14,36	0,49	8,98	0,30

Estos resultados se analizaron mediante un análisis ANOVA multifactorial, junto con una prueba de múltiples rangos Tukey 5%, mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

Se evaluó inicialmente, la variación de la producción de etanol respecto a la cantidad de glicerina utilizada como sustrato a diferentes concentraciones (2,8% v/v; 10% v/v; 20% v/v) en la fase anaerobia, de acuerdo a la figura 4-5:

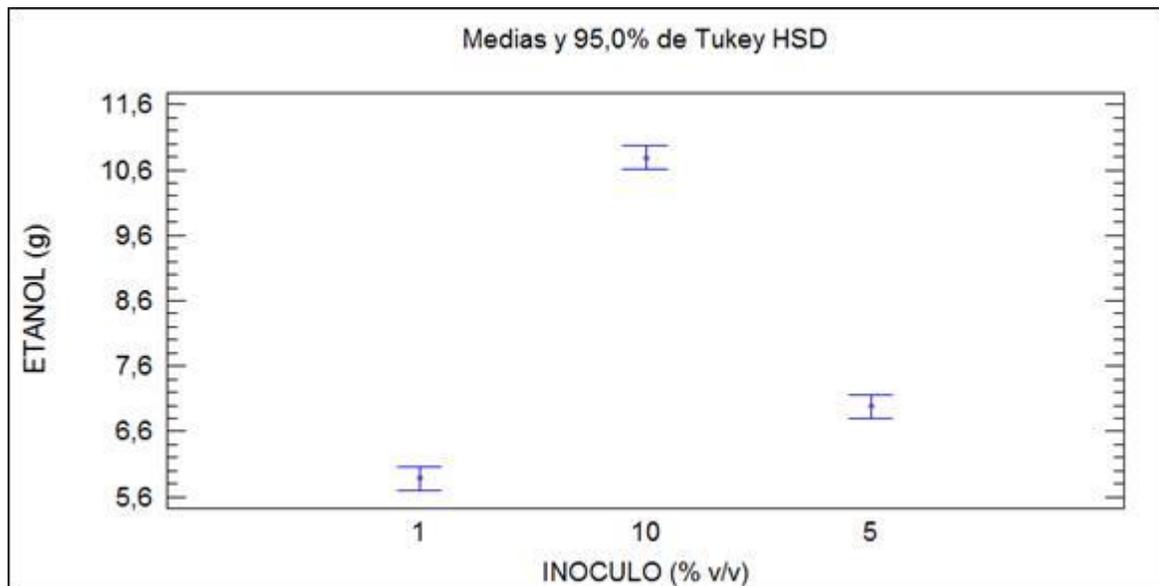
Figura 4-5: Comportamiento cinético de *Saccharomyces Cerevisiae* a temperatura ambiente



Fuente: Autor

De manera similar, la figura 4-6 presenta como afecta la cantidad de inóculo (1% v/v; 5% v/v; 10% v/v) la cantidad de etanol producido en la fase anaerobia.

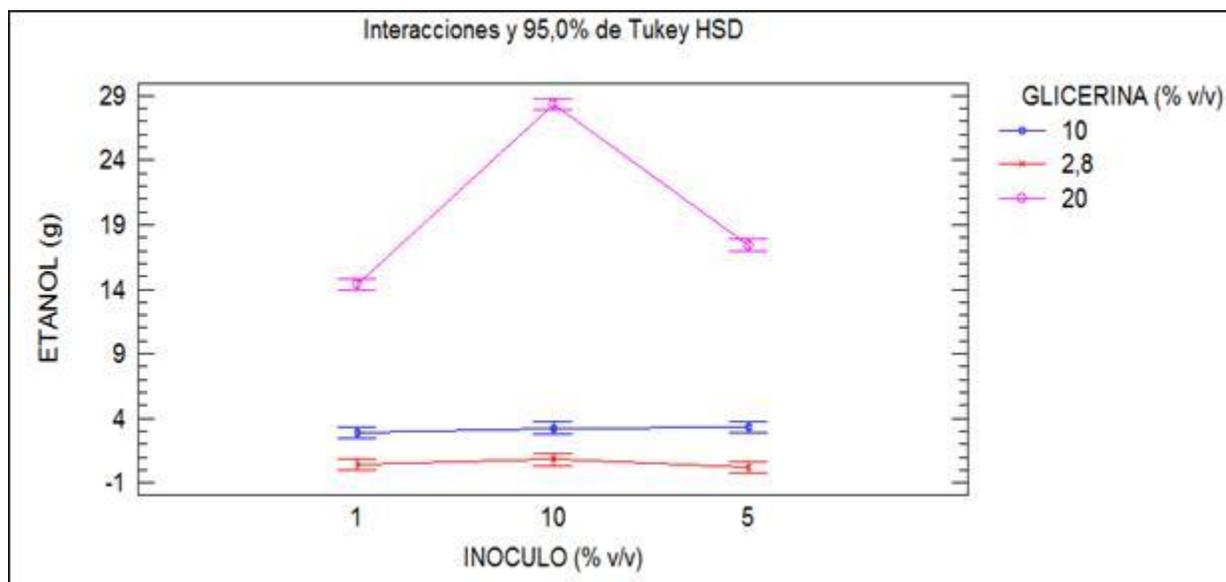
Figura 4-6: Rendimiento de etanol a diferentes concentraciones de inóculo



Fuente: Autor

Asimismo, la figura 4-7 presenta la correlación de variables como glicerina e inóculo, la cantidad de etanol producido, se observó que los mejores resultados se presentan a una concentración de 20% de glicerina y 10% de inóculo.

Figura 4-7: Rendimiento de etanol a diferentes concentraciones de glicerina e inóculo



Fuente: Autor

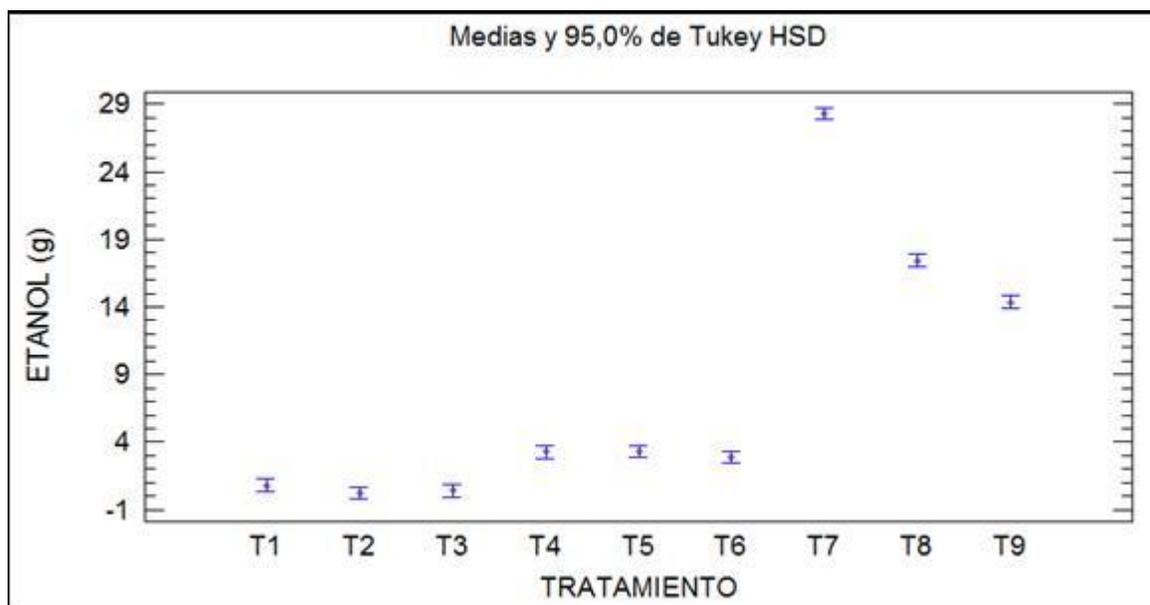
El análisis ANOVA descompone la variabilidad del etanol en contribuciones debidas a las variables independientes (Glicerina e Inóculo). Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de las variables independientes. Puesto que los 3 valores-P son menores que 0,05, estas variables por separado y la interacción entre ellas tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de etanol con un 95,0% de nivel de confianza.

La concentración de glicerina al 2,8 %v/v de acuerdo a la comparación del contenido de carbonos de la molécula de glucosa con respecto a la de glicerina, observando un resultado favorable en el crecimiento. Esto es concordante, con los resultados obtenidos por Yu *et al.* (2010a), que muestran un incremento de 2,4 g/L a 4,4 g/L de etanol bajo condiciones microaeróbicas por disminución en la cantidad de glicerina utilizada. Resultados similares presentaron Guo *et al.* (2009), que evaluaron el crecimiento de dos cepas modificadas de *S. cerevisiae* en glicerina, obteniendo un aumento de 6,83% y

7,41% en la producción de etanol con una disminución de glicerina (relativo al sustrato consumido) de 4,29% y 7,95% respectivamente.

De igual forma, la figura 4-8 refleja que el mejor resultado de los tratamientos utilizados (Tabla 4-2) es T7 para la producción de etanol correspondiente a una concentración de 20% de glicerina y 10% de inóculo para la fase anaerobia

Figura 4-8: Rendimiento de etanol por los diferentes tratamientos realizados.



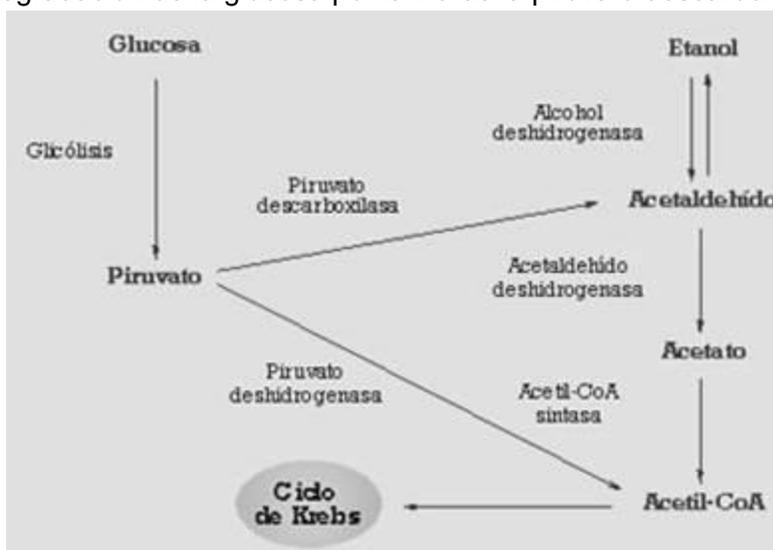
Fuente: Autor

La producción de etanol crece con el aumento en la concentración de glicerina (Figura 4-7 y 4-8), se observó que realizar un aumento progresivo en la concentración de glicerina de 10 %v/v y posteriormente a 20 %v/v se obtienen mayores cantidades de etanol en la fase anaerobia, por ello se descarta una inhibición en la producción de etanol de la cepa por exceso de sustrato y se sugiere, que bajo condiciones de alta concentración de glicerina y en presencia de oxígeno, estas cepas convierten su metabolismo respiratorio a metabolismo fermentativo conocido como Efecto Crabtree (Peña & Arango, 2008).

El efecto Crabtree se ha descrito en *S. cerevisiae* y un número limitado de otras levaduras, establece que en presencia de cantidades de glucosa relativamente bajas, e

incluso en presencia de oxígeno, gran parte del azúcar consumido se destina a la producción de etanol mediante la vía fermentativa (Lei *et al*, 2001). Este fenómeno se debe a que en presencia de glucosa se alcanzan grandes concentraciones de piruvato intracelular, lo que favorece su degradación por la vía de la piruvato descarboxilasa, un enzima con gran capacidad de carga, en lugar del complejo piruvato deshidrogenasa, que lleva directamente a acetil-CoA, de acuerdo a la figura 4-9. Puesto que la capacidad de las reacciones posteriores que permitirían la transformación del acetaldehído formado por la piruvato descarboxilasa en acetil-CoA es limitada, esto favorece finalmente la formación de etanol aún en condiciones aeróbicas (González *et al*, 2007).

Figura 4-9: Degradación de la glucosa por la vía de la piruvato descarboxilasa



Fuente: González *et al*, 2007

La mayor producción de etanol se presenta para una cantidad de inóculo de 10 %v/v (Figura 4-7), asimismo el mejor tratamiento para este caso, fue el Tratamiento 7, aquel reactor que contenía 20% de glicerina y 10 de inóculo, obteniendo que casi un 40% de la glicerina, junto con la peptona suministrada al proceso se consumían en el desarrollo del microorganismo, aproximadamente el 17% de la glicerina alimentada se convertía en etanol, y la restante puede ser recirculada al proceso de fermentación.

4.3 Simulación del proceso a escala industrial

A partir de los análisis de laboratorio obtenidos, se extrapolaron los resultados a escala industrial, utilizando la glicerina obtenida como subproducto del proceso de producción de biodiesel. La simulación se realizó en el software de simulación ASPEN HYSYS® en estado estacionario, para 10.000 kg/día de glicerina cruda generada en base a una planta de producción de biodiesel de 100.000 litros/día, de acuerdo a la figura 4-10.

Esta consideración es interesante, debido a que en términos generales para la mayoría de los procesos industriales, el costo de la materia prima representa cerca de 50% de los costes totales de producción. Sin embargo, la glicerina cruda en la producción de etanol representa sólo el 30% de los costes totales, debido a su bajo precio en el mercado internacional (Posada *et al.*, 2010). De igual forma, esta producción sería sustentada, al incremento del consumo de etanol, ya que según la Federación Colombiana de Biocombustibles (Fedebiocombustibles), las ventas durante 2014 fueron de 418,5 millones de litros, lo que significa un aumento de 6,3% frente a las ventas registradas en 2013 (393,8 millones de litros).

Como separadores sólido/líquido se usaron separadores simples, disponibles en la librería de ASPEN HYSYS®. Para evitar problemas de presencia de sólidos en las unidades de operación aguas abajo, dichos equipos se especificaron para efectuar una separación perfecta y sustancias puras, es decir, para que la corriente líquida de salida no contuviera sólidos y otros compuestos.

El software ASPEN HYSYS® permitió simular el proceso de acuerdo a las distintas operaciones unitarias, propiedades fisicoquímicas, los balances de materia y energía utilizadas para obtener una producción de 81litros/h de etanol equivalente a una producción de 700 m³/año considerando 360 días de operación, teniendo en cuenta, los planos de los equipos requeridos para el montaje de la planta.

En lo referente a materiales de construcción, las condiciones de proceso permiten, para la mayoría de equipos de ambos procesos, utilizar acero al carbón. El proceso de

producción cuenta con 12 equipos, correspondiente a 3 mezcladores, 3 reactores para fermentación, 1 intercambiador de calor y 5 unidades de separación, de acuerdo al siguiente proceso:

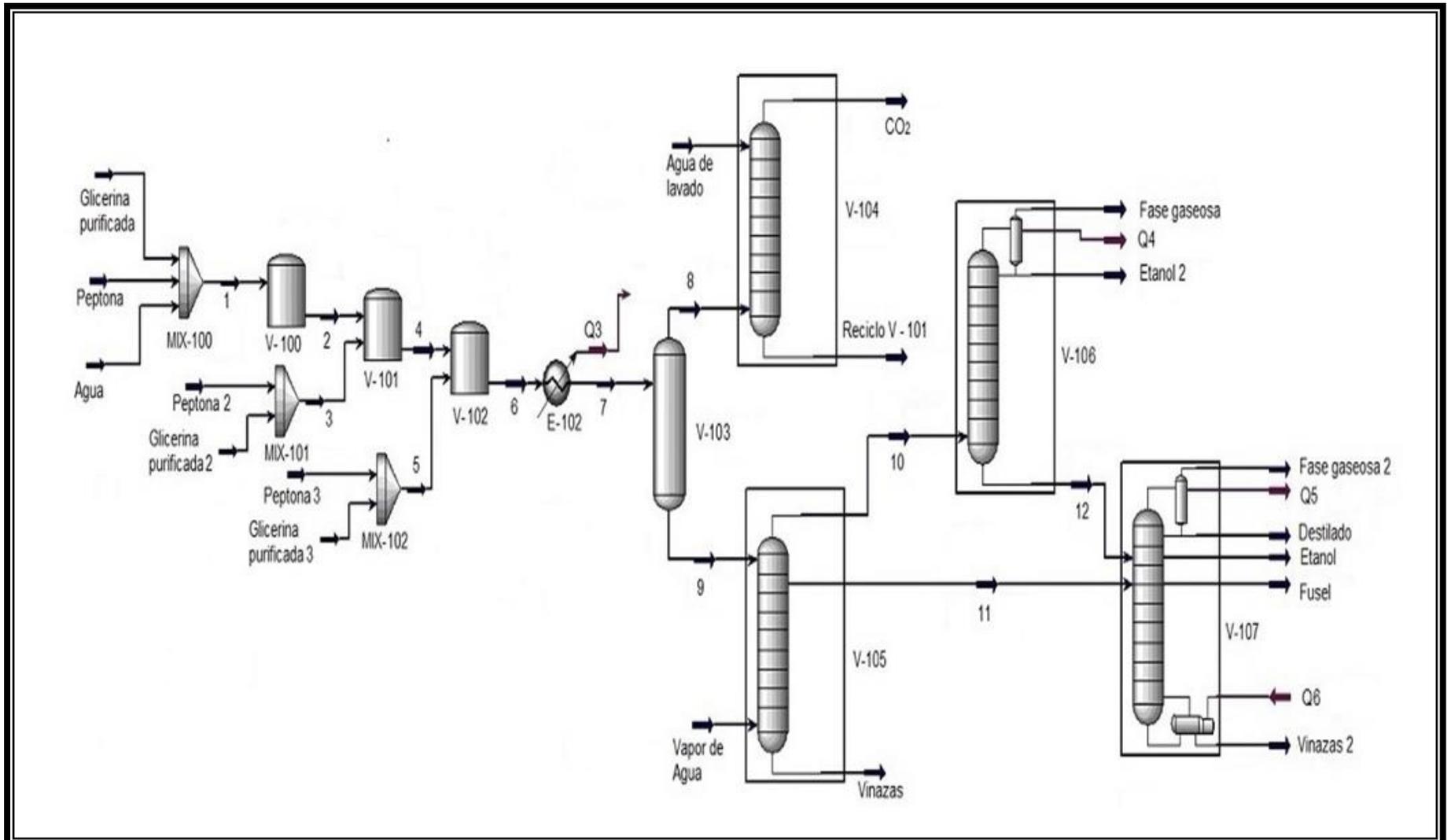
Inicialmente la glicerina se mezcló con peptona como fuente de nitrógeno y agua (MIX-100), luego fue bombeada a un reactor (V-100) tipo batch donde ocurre la fermentación, por medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la glicerina se mezcló en 3 reactores en serie, aumentando el porcentaje de la mezcla glicerina - agua proporcionalmente 2,8%; 10% y 20% con adiciones de glicerina mezclada con peptona (MIX-101; MIX-102) para fomentar el crecimiento de la levadura con periodos de crecimiento de 12 horas, de acuerdo a la siguiente reacción, cuyo rendimiento teórico corresponde a 50% por relación estequiométrica (Ver Ecuación (4.3)).



Una vez, realizado el proceso de fermentación (V-100; V-101; V-102) se enfría el producto resultante (E-102) a 4°C con el fin de garantizar la producción de etanol durante 240 horas, así como evitar la formación de metanol.

Consecutivamente, se separaron el resultado de la fermentación de acuerdo a fase líquida y gaseosa (V-103). La fase gaseosa pasó a un absorbedor de 10 etapas con caída de presión (ΔP) constante (V-104) con agua de lavado que permitirá separar el CO_2 e H_2 en la fase vapor. La fase líquida fue enviada como reciclo al reactor V-102. De igual forma, la fase pesada compuesta por glicerina, agua y etanol fueron enviadas a un absorbedor de 17 etapas a presión constante (V-105) donde mediante una corriente de vapor de agua se separan en 3 corrientes: Una fase ligera es bombeada a un absorbedor con reflujo (V-106) de 5 etapas operado a presión constante que permitió obtener etanol mediante condensación. Otra fase fue a una columna de destilación compuesta por 29 etapas con ΔP constante (V-107) y una fase pesada que corresponde a las vinazas obtenidas del proceso. En la columna de destilación (V-107), se obtuvo 67,8 Kg/h de etanol equivalente a una producción de 700 m³/año considerando 360 días de operación, como producto del condensador y de forma lateral, así como vinazas en el rehervidor para completar el proceso de destilación.

Figura 4-10: Simulación de la producción de etanol a escala industrial.



Fuente: Autor

La simulación se realizó de acuerdo a los siguientes balances de materia para cada operación unitaria utilizada (Ver Ecuación (4.4)).

$$masa_{Entra} - masa_{Sale} + masa_{produce} - masa_{Reacciona} = 0 \quad (4.4)$$

De igual forma, para operaciones unitarias que no incluyan reacción química (Ver Ecuación (4.5)).

$$masa_{Entra} - masa_{sale} = 0 \quad (4.5)$$

Una vez realizada la simulación en el software ASPEN HYSYS®, se obtuvieron los siguientes resultados de las corrientes del proceso, (Tabla 4-3).

Los 67,8 Kg/h de etanol producido equivalen a aproximadamente 81 litros/hora, por lo tanto, el proceso a nivel industrial de una planta de producción que representan 2000 litros/día de etanol producido, con una conversión de glicerina de aproximadamente el 17% de la materia prima utilizada.

Los balances de masa corresponden a los datos obtenidos del laboratorio extrapolados a escala industrial, de acuerdo al %v/v. Estos muestran que se requiere gran cantidad de agua durante la operación del proceso, aproximadamente 4200 Kg/h, sin embargo, ésta se puede recircular al proceso. Igualmente, se requieren 940 Kg/h de glicerina obtenida como resultado de la producción de biodiesel, que estará almacenada hasta escalar al 20 %v/v en los procesos de fermentación.

De forma similar, la producción de etanol, no genera elevados consumos de energía, ya que el desarrollo del proceso no requiere de equipos que operen bajo condiciones altas de temperatura y presión, siendo una oportunidad para las plantas de producción de biodiesel para la obtención de un producto valioso como un biocombustible de segunda generación a partir de glicerina.

De igual forma, se presentan los planos de los equipos utilizados, el reactor utilizado para la fermentación (Figura 4-11), el Intercambiador de Calor utilizado (Figura 4-12) y un modelo general de las diferentes columnas de destilación utilizadas (Figura 4-13).

Los planos de los equipos necesarios para llevar al cabo la producción de etanol, corresponden a un reactor con agitación constante que permitirá la homogenización y evitará la floculación de la *S. cerevisiae* en el medio de cultivo. El intercambiador de calor cuenta con boquillas que permiten la entrada y salida de refrigerante a través de serpentines para bajar la temperatura a 4°C durante la fase anaerobia para fomentar la producción de etanol. Posteriormente se presentan los planos de una columna de destilación de platos, como ejemplo de las diferentes unidades de separación necesarias para llevar a cabo el proceso. Los planos de cada unidad pueden variar, de acuerdo a los criterios y especificaciones del proveedor de los equipos requeridos para el proceso.

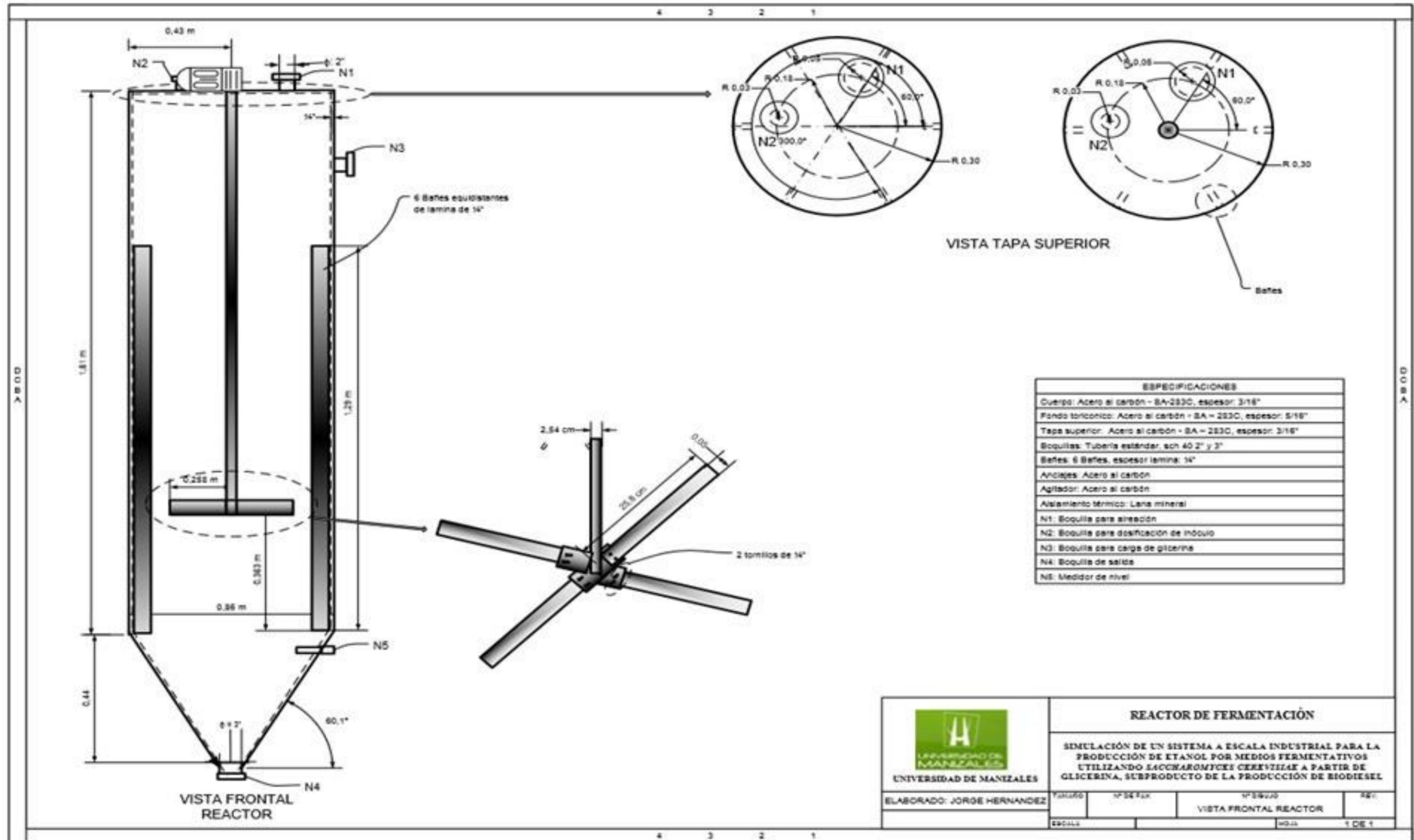
Tabla 4-3: Balances de materia de producción de etanol

Corriente	Glicerina	Peptona	Agua	1	2	Glicerina 2	Peptona 2	3
Flujo (kg/h)	115,6	11,6	4128,6	4255,6	4184,4	363,2	36,3	399,5
Temperatura (°C)	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Presión (KPa)	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3
Fracción de Vapor	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000
Fracción Másica (Glicerina)	0,8013	0,0000	0,0000	0,0218	0,0119	0,8013	0,0000	0,7285
Fracción Másica (H ₂ O)	0,1987	0,0000	1,0000	0,9755	0,9864	0,1987	0,0000	0,1807
Fracción Másica (Etanol)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,987x10 ⁻⁴	0,0000	0,0000	0,0000
Fracción Másica (CO ₂)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,838x10 ⁻⁴	0,0000	0,0000	0,0000
Fracción Másica (H ₂)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	3,584 x10 ⁻⁴	0,0000	0,0000	0,0000
Fracción Másica (Peptona)	0,0000	1,0000	0,0000	0,0027	0,0000	0,0000	1,0000	0,0908

Tabla 4-4: (Continuación) Balances de materia de producción de etanol

Corriente	4	Glicerina 3	Peptona 3	5	6	7	7A	8
Flujo (kg/h)	4407,5	702,6	70,3	772,9	4609,9	4609,9	4609,9	104,6
Temperatura (°C)	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	4,00	25,00	25,00
Presión (KPa)	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3
Fracción de Vapor	0,0031	0,0000	0,0000	0,0000	0,0216	0,0216	0,0216	1,0000
Fracción Másica (Glicerina)	0,0406	0,8013	0,0000	0,7285	0,0309	0,0309	0,0309	0,0000
Fracción Másica (H ₂ O)	0,9530	0,1987	0,0000	0,1807	0,9259	0,9259	0,9259	0,0488
Fracción Másica (Etanol)	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	0,0216	0,0000	0,0000	0,0000
Fracción Másica (CO ₂)	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	0,0207	0,0216	0,0216	0,0166
Fracción Másica (H ₂)	1,361 x10 ⁻⁴	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0207	0,0207	0,8948
Fracción Másica (Peptona)	0,0000	0,0000	1,0000	0,0908	0,0000	0,0009	0,0009	0,0396

Figura 4-11: Plano de reactor de fermentación



 <p>UNIVERSIDAD DE MANIZALES</p>	REACTOR DE FERMENTACIÓN		
	SIMULACIÓN DE UN SISTEMA A ESCALA INDUSTRIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR MEDIOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> A PARTIR DE GLICERINA, SUBPRODUCTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL		
ELABORADO: JORGE HERNANDEZ	FECHA: 14/05/2014	Nº DE DISEÑO: 1001	ESCALA: 1 DE 1

Figura 4-12 Plano de Intercambiador de Calor

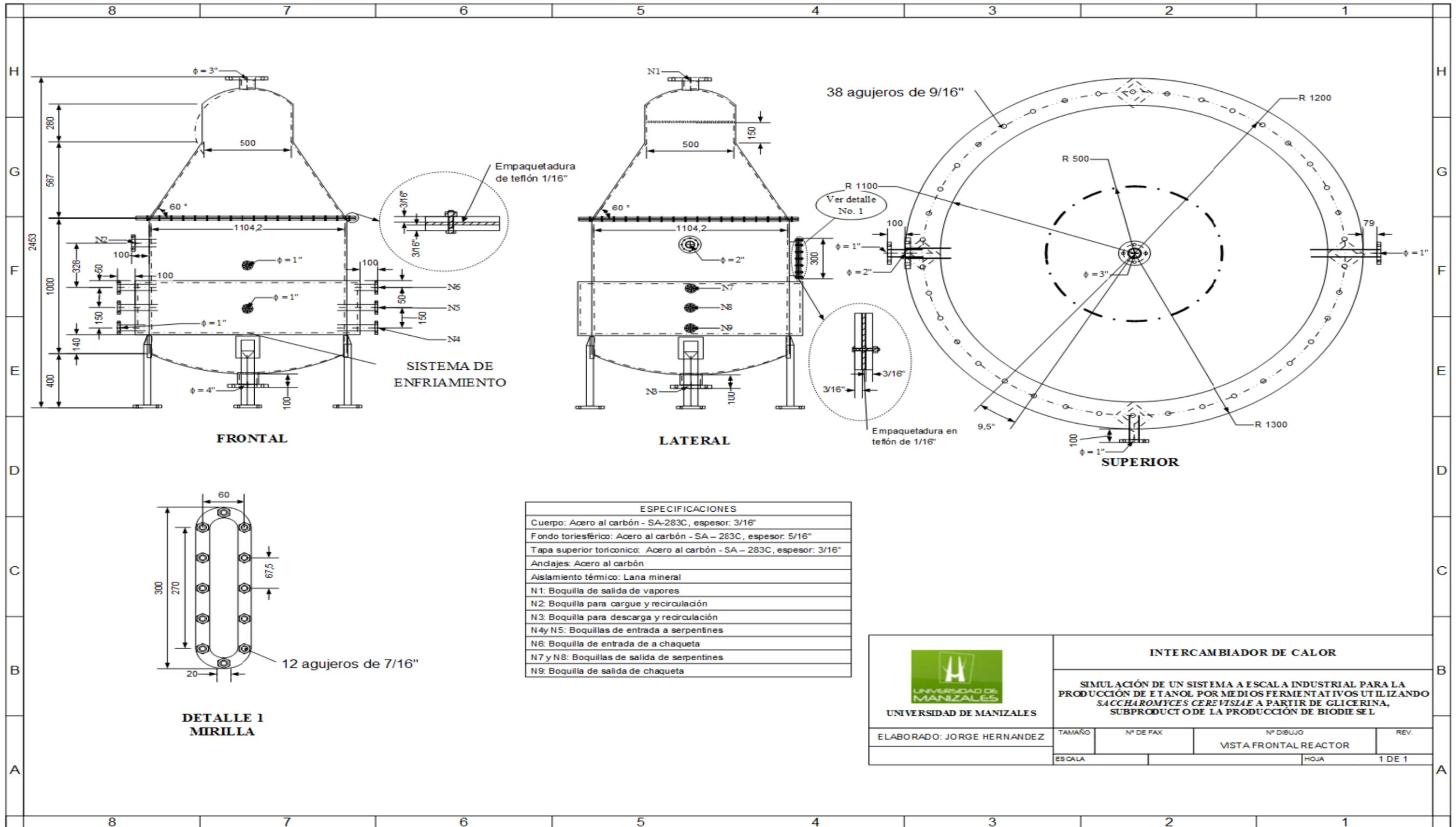
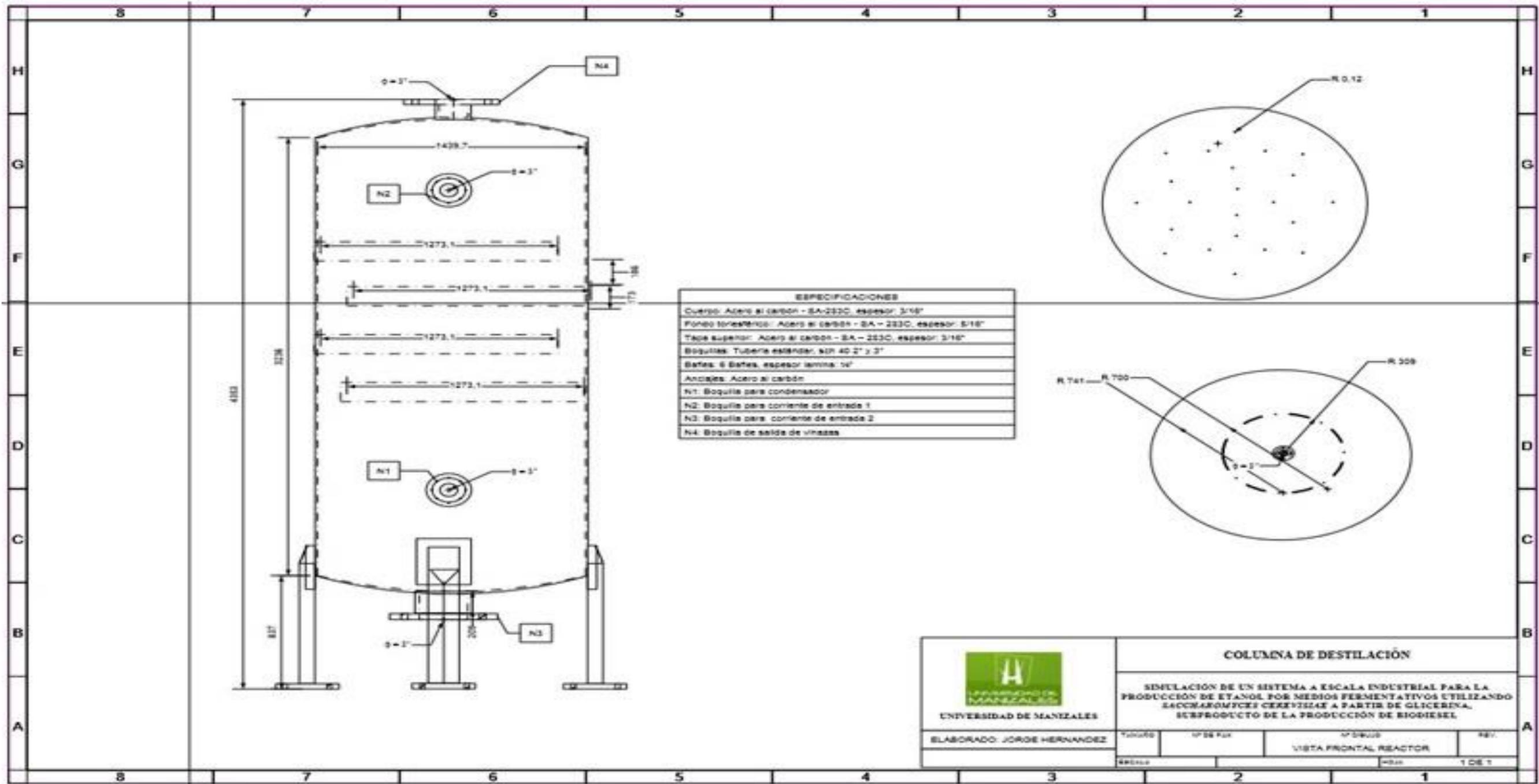


Figura 4-13: Plano Columna de Destilación



5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- En la producción de etanol utilizando la glicerina, subproducto de biodiesel por medios fermentativos a través de la *Saccharomyces cerevisiae*, se obtiene el mayor rendimiento a una concentración de glicerina del 20%, y un mayor crecimiento de biomasa a 2,8 % y sin necesidad de calentamiento del sistema.
- Al llevar a cabo la simulación del proceso, por medio del software ASPEN HYSYS®, permitió escalar el proceso a nivel industrial para la obtención de una planta de producción de etanol de 2000 litros/día, con una conversión de glicerina de aproximadamente el 17% de la materia prima utilizada.
- Lo anterior es en buena medida un reflejo de la necesidad científica que existe de encontrar y desarrollar tecnologías que permitan darle uso a la gran oferta disponible de glicerina, provocada por el auge de biodiesel a nivel mundial, aunado a los precios bajos de este subproducto.
- Al utilizar la glicerina como materia prima para la producción de etanol, se obtiene un valor agregado a la producción de biodiesel de aceite de palma, en función de alternativas amigables con el medioambiente, proporcionándole una alternativa de aprovechamiento a este subproducto y un biocombustible de segunda generación.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda en un estudio posterior, evaluar otro microorganismo o modificar genéticamente la *Saccharomyces cerevisiae*, para obtener un mayor rendimiento en la producción de etanol, así como evitar los largos periodos de tiempo para el crecimiento del microorganismo.
- Se recomienda evaluar la obtención de otros productos por medios fermentativos como el 1,3 Propanodiol, el ácido succínico o la Dihidroxiacetona, entre otros químicos utilizando la glicerina, subproducto de biodiesel, como sustrato debido a su alta fuente de carbono.
- Con el presente estudio, se determinó la viabilidad técnica de la producción de etanol por medio de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de la glicerina obtenida como subproducto de la producción de biodiesel, se recomienda realizar un estudio de factibilidad del proyecto, que permita llevarlo a cabo a escala industrial, que permita aprovechar esta información obtenida como una oportunidad de negocio para empresas dedicadas a la producción de biodiesel.

6. Bibliografía

- Alotaibi K. & Schoenau J. (2011). Enzymatic activity and microbial biomass in soil amended with biofuel production byproducts. *Applied Soil Ecology* 48, 227-235.
- Al-Hasan M. (2003). Effect of ethanol–unleaded gasoline blends on engine performance and exhaust emission. *Energy Conversion and Management* 44, 1547-1561.
- Ayoub M. & Abdullah A. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 2671 - 2686.
- Balat M. & Balat H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* 86, 2273-2282.
- Calero J., Luna D., Sancho E., Luna C., Bautista F., Romero A., Posadillo A., Berbel J. & Verdugo C. (2015). An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42, 1437 - 1452.
- Cárdenas D., Pulido C., Aragón O., Aristizábal F., Suárez Z., & Montoya D. (2006). Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerina USP y glicerina industrial subproducto de la producción de biodiesel. *Revista Colombiana de ciencias químico farmacéutica*, 35(1) 120 - 137.
- Cardona, C. & Orrego, C. (2009). Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Manizales. Colombia. ISBN: 978-958-44-5261-0.

- Clomburg J. & González R. (2013). Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology* 31, 20-28.
- Coronado C., Carvalho J., Quispe C. & Sotomonte C. (2014). Ecological efficiency in glycerol combustion. *Applied Thermal Engineering* 63, 97-104.
- Crueger, W., & Crueger, A (1993). *Biología: Manual de Microbiología Industrial*. Editorial Acribia. 143-146.
- Da Silva G., Mach M. & Contiero J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, 30-39.
- Demirbas, A. (2008). *Biodiesel A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*. Springer -Verlag London Limited. Girona, Spain.
- Demirbas, A. (2009). Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management* 50, 2239-2249.
- Dequin S. & Casaregola S. (2011). The genomes of fermentative *Saccharomyces*. *Comptes Rendus Biologies* 334, 687-693.
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. Documento en Línea: http://www.fedebiocombustibles.com/v3/main-pagina-id-4-titulo-proceso_de_los_biocombustibles.htm.
- Folch-Mallol J., Martínez L., Casas S., Yang R. Martínez C., López L., Hernández A. & Nieto J. (2004). New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 2865-2879.
- Fountoulakis M., Petousi I. & Manios T. (2010) Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. *Waste Manage* 30, 1849-1853.

- González R., Barcenilla J. & Tabera J. (2007). Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. *Revista de Enología*, 86.
- Guo Z., Zhang L., Ding Z., Wang Z. & Shi G. (2009). Interruption of glycerol pathway in industrial alcoholic yeasts to improve the ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(2), 287-292.
- Hasheminejad M., Tabatabaei M., Mansourpanah Y., Khatami M. & Javani A. (2011). Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 461-468.
- Jegannathan K., Chan E. & Ravindra P. (2009). Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 2163–2168
- Jegannathan K., Chan E. & Ravindra P. (2011). Biotechnology in Biofuels - A Cleaner Technology. *Journal of Applied Science* 11 (13) 2421 - 2425.
- Juran J. & Godfrey A. (2001). Manual de Calidad. McGraw-Hill Interamericana de España. España.
- Kasavi C., Finore I., Lama L., Nicolaus B., Oliver G., Toksoy E. & Kirdar B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy* 45, 230 -238.
- Kim J., Seo S., Kim C., Lee B., Lee G., Shin H., Kim M. & Kil D. (2013). Effect of dietary supplementation of crude glycerol or tallow on intestinal transit time and utilization of energy and nutrients in diets fed to broiler chickens. *Livestock Science* 154, 165-168.

- Kovács P., Zsédely E., Kovács A., Virág G. & Schmidt J. (2011). Apparent digestible and metabolizable energy content of glycerol in feed of growing pigs. *Livestock Science* 142, 229-234.
- Kubiak P., Leja K., Myszka K., Celinska E., Sychała M., Szymanowska D., Czaczyk K. & Grajek W. (2012) Physiological Predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Process Biochemistry* 47, 1308-1319.
- Larson E. (2008). Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development. Report No. UNCTAD/DITC/TED/2007/10. United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva.
- Lei F., Rotboll M. & Jorgensen S. (2001) A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 88, 205-221.
- Leoneti A., Leoneti V. & Borges S. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy* 45, 138-145.
- Lin Y., Zhang W., Li C., Sakakibara K., Tanaka S. & Kong K. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy* 47, 395-401.
- Longfei C., Stone R. & Richardson D. (2012). A study of mixture preparation and PM emissions using a direct injection engine fuelled with stoichiometric gasoline/ethanol blends. *Fuel* 96, 120-130.
- Mangoyana R., Smith T. & Simpson R. (2103). A systems approach to evaluating sustainability of biofuel systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 25, 371-380.

- Metsoviti M., Zeng A., Koutinas A. & Papanikolaou S. (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and nonsterile bioprocesses. *Journal of Biotechnology* 163, 408-418.
- Mohr S., Wang J., Ellem G., Ward J. & Giurco D. (2015). Projection of world fossil fuels by country. *Fuel* 141, 120-135.
- Moncada J., Tamayo J. & Cardona C. (2014). Evolution from biofuels to integrated biorefineries: techno-economic and environmental assessment of oil palm in Colombia. *Journal of Cleaner Production* 81, 51-59
- Murarka A., Dharmadi Y., Yazdani S. & González R. (2008). Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. *Applied and environmental microbiology* 74(4), 1124–1135.
- Nwachukwu R., Shahbazi A., Wang L., Ibrahim S., Worku M. & Schimmel K. (2012). Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes*. *AMB Express* 2 (20).
- Ochoa - Estopier A., Lesage N., Gorret N. & Guillouet S. (2011). Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol *Bioresource Technology* 102, 1521 - 1527.
- Pagliario M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M. & Della Pina C. (2007). From glycerol to value added product. *Angew Chem Int. Ed.* 46, 4434 - 4440.
- Peña C. & Arango R. (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna* 76(159), 153-161.

- Pinto B. & De Araujo C. (2014) Developments in glycerol byproduct-based biorefineries. Woodhead Publishing Limited DOI : 10.1533/9780857097385.1.364
- Posada J., Rincón L. & Cardona C. (2012). Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. *Bioresource Technology* 111, 282 - 293.
- Quispe C., Coronado C. & Carvalho J. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 475 - 493.
- Reungsang A., Sittijunda S. & Angelidaki I. (2013). Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 1813-1825.
- Sabourin-Provost G. & Hallenbeck P. (2009). High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource Technology* 100, 3513 - 3517.
- Sarma S., Brar S., Sidney E., Bihan Y., Buelna G. & Soccol C. (2012). Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 6473-6490.
- Siles J., Martín M., Chica A. & Martín A. (2009). Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology* 100, 5609-5615.
- Singh P. & Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* (37), 52 - 68.
- Singhabhandhu A. & Tezuka T. (2010). A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. *Energy* 35, 2493-2504.

- Sistema de Información Ambiental de Colombia. Inventario Nacional de Gases Efecto Invernadero 1990 – 2008. Documento en Línea: <https://www.siac.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=369&conID=1309&pagID=1492>.
- Striugas N., Šlančiauskas S., Makarevičiene V., Gumbyte M. & Janulis P. (2008). Processing of the glycerol fraction from biodiesel production plants to provide new fuels for heat generation. *Energetika* 5, 5-12.
- Trinh C. & Srienc F. (2009). Metabolic Engineering of Escherichia coli for Efficient Conversion of Glycerol to Ethanol. *Applied and environmental microbiology* 75 (21), 6696-6705.
- Unidad de Planeación Minero Energética, UPME. (2014). Proyección de Demanda de Combustibles en el Sector Transporte en Colombia. Revisión noviembre de 2014. República de Colombia. Ministerio de Minas y Energía.
- U.S. Food and Drug Administration. (1979). Glycerin; GRAS status as a direct human food ingredient. *Federal Register* 48(27), 5759–5760.
- Vlysidis A., Binns M., Webb C. & Theodoropoulos C. (2011). Glycerol utilization for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal* 58, 1-11.
- Wang C., Liu Q., Yang W., Huo W., Dong K., Huang Y., Yang X. & He D. (2009). Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 151, 12-20.
- Wang M., Saricks C. & Santini D. (1999). Effects of fuel ethanol use on fuel-cycle energy and greenhouse gas emissions. Argonne (IL): Argonne National Laboratory.

- Wang Z., Zhuge J., Fang H. & Prior B. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances* 19, 201-223.
- Yang L., Zhu Z., Wang W. & Lu X. (2013). Microbial recycling of glycerol to biodiesel. *Bioresource Technology* 150, 1 - 8.
- Yazdani S. & Gonzalez R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology* 18, 213 – 219.
- Yazdani & González (2008). Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversión of glicerol to etanol and co-products. *Metabolic Engineering* 10, 340-351.
- Yu K., Kim S. & Han S. (2010a). Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 101, 4157 - 4161.
- Yu K., Kim S. & Han S. (2010b). Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *Journal of Biotechnology* 150, 209 - 214.
- Zhao Y., Chen G. & Yao S. (2006). Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumonia*. *Biochemical Engineering Journal* 32, 93-99.

A. Anexo: Evidencias fotográficas del proyecto.

FOTO	DESCRIPCIÓN
 A petri dish containing a yeast culture on a solid medium. The culture shows a distinct, elongated, and somewhat irregular growth pattern, likely representing the morphology of Saccharomyces cerevisiae.	Obtención de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en una cepa pura al 100%, crecimiento 24 horas a 37°C.
 A microscopic view of yeast cells, showing several individual cells and small clusters. The cells are roughly spherical and appear to be budding, characteristic of Saccharomyces cerevisiae.	Observación microscópica de la levadura recuperada en glicerina cruda.
 Four glass fermenters (bioreactors) arranged in a row on a laboratory bench. Each fermenter is equipped with a stirrer and aeration system. The liquid inside the fermenters is a dark brown color, indicating the presence of yeast and fermentation products.	Fermentadores a escala de 700 ml con un caudal a 1 vvm a temperatura ambiente a diferentes concentraciones de glicerina



Fermentadores a escala de 700ml con un caudal a 1 vvm a temperatura de 37°C a diferentes concentraciones de glicerina



Titulación para medir la cantidad de etanol producido por el Método de Winnick



Diferentes instrumentos utilizados en la fase experimental de laboratorio como microscopios para medir el crecimiento celular, balanza digital para medir la masa de las diferentes sustancias utilizadas, autoclave para esterilizar todo el material utilizado.

B. Anexo: Método de Winnick para la determinación de contenido de etanol

TÉCNICA UTILIZADA

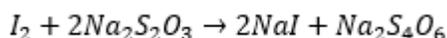
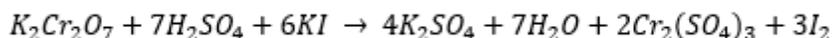
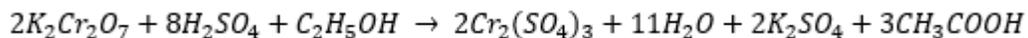
Microdifusión con celdas de Conway.

FUNDAMENTO

Si una sustancia volátil en solución y un solvente puro se encuentran en recipientes que entran en contacto con la misma atmósfera o fase gaseosa, el soluto volátil tiende a pasar de la solución a la atmósfera y, de ésta, a disolverse en el solvente puro. Puede así alcanzarse un equilibrio. En vez de solvente puro se puede utilizar un reactivo que convierta el soluto volátil en una nueva sustancia no volátil, reduciéndose a cero su tensión de vapor en la atmósfera, desplazando el equilibrio y, eventualmente, la totalidad del soluto volátil se transforma dentro del reactivo en una nueva sustancia susceptible a ser valorada numéricamente.

Dentro de la celda de Conway, el alcohol presente en una de las cámaras de la unidad sellada, debido a su alta tensión de vapor, origina su difusión hacia la segunda cámara o compartimiento. Normalmente, la distribución entre las dos cámaras podría alcanzar un equilibrio en un cierto periodo de tiempo. Sin embargo, la presencia del medio oxidante en la segunda cámara continuamente remueve el alcohol y lo convierte en ácido acético, forzando así su completa remoción de la primera cámara.

La oxidación de etanol a ácido acético ocurre por la presencia de dicromato de potasio en ácido sulfúrico; el exceso de dicromato que queda sin reaccionar se mide por la reacción con yoduro de potasio para formar yodo que se valora con tiosulfato de sodio en presencia de almidón como indicador, de acuerdo con las siguientes reacciones:



El carbonato de potasio actúa como agente liberador del etanol.

CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS

Por la volatilidad del analito que se determina en esta prueba y la naturaleza de la muestra que se evalúa, se recomienda que el procesamiento de las muestras (exceptuando la difusión) se lleve a cabo a una temperatura ambiental máxima de 27°C. La humedad relativa debe ser menor al 80% porque de lo contrario se afecta la medida gravimétrica.

EJECUCIÓN DE LA PRUEBA

- A. Marcar las celdas de Conway antes de empezar la prueba.
- B. Colocar 0,5 ml (500 µl) exactamente medidos de solución de dicromato de potasio 0,4 N preparado en solución de ácido sulfúrico 10 N, en la cámara central de celda de Conway.
- C. Colocar 1 ml de solución de carbonato de potasio y 1 ml de muestra en la cámara externa de la celda (adyacente a la cámara central).

- D. Colocar el agente sellante (vaselina) alrededor de la celda para asegurar su hermeticidad.
- E. Cerrar la celda.
- F. Rotar suavemente la celda para mezclar los fluidos en el compartimiento externo.
- G. Dejar en reposo 2 horas a 50°C o 10 – 12 horas a temperatura ambiente.
- H. Transcurrido el tiempo de difusión retirar la cubierta y observar la coloración de la solución de la cámara central de la celda: Si el color es amarillo igual al de un control negativo, la muestra se considera libre de etanol, si el color es azul, se debe repetir el análisis utilizando 0,5 ml de muestra, si el color difiere hacia amarillo ocre, verde o verde azulado se debe adicionar a la cámara central 0,5 ml de la solución de yoduro de potasio 3N, mezclar bien con un agitador de vidrio delgado.
- I. Agregar una gota de solución de reactivo de almidón soluble a la cámara central agitando para homogeneizar.
- J. Titular con solución de tiosulfato de sodio 0,1 N con agitación cuidadosa hasta obtener un cambio nítido de color azul.
- K. Registra el volumen de titulante gastado por cada muestra.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, la diferencia entre el volumen del titulante (tiosulfato de sodio) gastado en una muestra control negativo (blanco) y el volumen gastado en la titulación de una muestra problema, multiplicado por el factor 1,151; da la cantidad de etanol expresado en miligramos por 1 ml de muestra analizada. Para reportar el resultado en miligramos de alcohol / 100 ml de sangre. Se multiplica el resultado por 100. Los anteriores cálculos se pueden emplear si las soluciones de tiosulfato de sodio y dicromato de potasio tienen una normalidad de 0,1 N.

Los resultados se pueden tener en cuenta, cuando se gasten 2,00 ml de tiosulfato en la titulación del control negativo. Esto se debe a que la ecuación estequiométrica se da completa con el gasto de 2,00 ml de volumen de tiosulfato, ya que el factor 1,151; es el resultado de relación de las masas que han reaccionado en la ecuación.

EXPRESIÓN DEL RESULTADO NÚMÉRICO

El resultado debe expresarse como mg de etanol por cada 100 ml de muestra y en valores enteros aproximando siempre cualquier fracción al entero menor.