Universidad Rey Juan Carlos

Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología

INGENIERO QUÍMICO

Curso académico 2008/09

Proyecto Fin de Carrera

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DEL MICROORGANISMO *Mucor circinelloides* *MEDIANTE CATÁLISIS ÁCIDA*

Autor: Diego Martín Tejeda

Directores: L. Fernando Bautista Santa Cruz

Rosalía Rodríguez Escudero

Índice

Índice ii

Capítulo I. Resumen. 1

Capítulo II. Introducción. 3

1. Antecedentes 3
2. Biodiésel, definición y especificaciones. 5
3. Ventajas e Inconvenientes del biodiésel. 7
4. Materias primas para la obtención de biodiésel. 9
   4.1. Aceites vegetales y grasas animales. 10
   4.2. Aceites de microalgas y microorganismos. 11
      4.2.1. *Mucor circinelloides* como materia prima para biodiésel. 13
      4.2.2. Composición lipídica del microorganismo *Mucor circinelloides*. 14
5. Producción de biodiésel a partir de microorganismos. 15
   5.1. Acondicionamiento y preparación de la materia prima. 15
   5.2. Extracción de la fracción lipídica. 15
   5.3. Reacciones de obtención de biodiésel. 16
      5.3.1. Transesterificación. 16
      5.3.2. Esterificación 21
      5.3.3. Proceso combinado 22
6. Situación actual de la producción de biodiésel. 22

Capítulo III. Objetivos. 26

Capítulo IV. Metodología experimental. 27

1. Instalaciones. 27
   1.1. Equipos de extracción. 27
   1.2. Equipos de reacción de obtención de biodiésel. 27
   1.3. Equipos de separación de los productos de reacción. 27
2. Materiales. 27
   2.1. Materias primas. 28
   2.2. Reactivos y catalizadores. 28
   2.3. Disolventes usados en la extracción. 28
   2.4. Reactivos utilizados en los análisis. 28
   2.5. Patrones empleados en los calibrados. 29

3. Métodos de análisis. 29
3.1. Cromatografía de capa fina. 29
3.1.1. Análisis cualitativo. 30
3.1.2. Análisis cuantitativo. 30
3.2. Cromatografía de gases. 32
3.2.1. Perfil de ácidos grasos. 32
3.3. Determinación de glicéridos. 33
3.4. Espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP). 34
4. Desarrollo experimental. 34
4.1. Extracción de la fracción lipídica. 34
4.2. Caracterización de la fracción lipídica. 35
4.3. Reacción de obtención de biodiésel. 36
4.4. Caracterización de los ésteres metílicos. 37
5. Diseño factorial de experimentos. 38

Capítulo V. Resultados y discusión. 39

1. Extracción de los lípidos del microorganismo. 39
2. Caracterización de la fracción lipídica. 40
2.1. Determinación de la composición en lípidos por TLC. 40
2.2. Perfil de ácidos grasos según cromatografía de gases. 41
2.3. Perfil de glicéridos. 42
2.4. Espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP). 43
3. Diseño experimental. 43
3.1. Elección de los factores. 43
3.2. Elección de los niveles de los factores. 44
3.3. Elección de las respuestas. 44
3.4. Obtención del modelo de primer orden. 45
3.5. Obtención del modelo de segundo orden. 48
3.6. Estimación del error. 53
3.7. Optimización. 54

Capítulo VI. Conclusiones. 57

Capítulo VII. Bibliografía. 58

Anexo: Diseño Factorial de Experimentos y Superficies de Respuesta 62

Capítulo I. Resumen.

En los últimos años el uso de fuentes energéticas de origen fósil ha sido cuestionado cada vez con mayor fuerza. Ser un recurso limitado y el grave impacto medioambiental que provocan son los principales motivos por los que hoy día existen numerosas vías de investigación acerca de otras fuentes de energía alternativas.

En el sector de los carburantes se han acordado distintas iniciativas políticas con el fin de fomentar el uso de biocombustibles, lo que ha aumentado el atractivo de un sector que ha experimentado un gran crecimiento en la última década.

Dentro de los biocombustibles destaca la producción de biodiésel, formado por ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), obtenidos habitualmente mediante reacción de transesterificación y/o esterificación de triglicéridos y ácidos grasos respectivamente. La materia prima normalmente empleada para este proceso ha sido aceite vegetal de distinta procedencia. Sin embargo, el uso de cultivos energéticos (soja, colza, coco o palma, por citar algunos ejemplos) ha ocasionado problemas a nivel económico y social al competir en el mercado de la alimentación.

A pesar de este aspecto negativo, las ventajas derivadas del uso del biodiésel frente al gasóleo de origen fósil han hecho que se siga investigando su producción a partir de otras fuentes. En esto se centra el presente trabajo, en el que se estudia el uso del microorganismo *Mucor circinelloides* como materia prima para la producción de biodiésel. Este microorganismo es un hongo filamentoso con la propiedad de acumular un alto porcentaje de lípidos, y la cepa empleada está modificada genéticamente con el objetivo de que dicho porcentaje sea aún mayor.

Lo primero que se llevó a cabo fue la extracción de la fracción lipídica, mediante extracción con cloroformo y metanol en proporción 2:1. Hecho esto, se comprobó que el contenido lipídico de la muestra está en torno al 28,8%. Los lípidos extraídos se caracterizaron mediante distintas técnicas.

El siguiente paso fue estudiar el proceso de extracción y reacción de transesterificación/esterificación en una sola etapa, empleando ácido clorhídrico como catalizador. Se llevó a cabo una serie de experimentos en distintas condiciones de trabajo para cuyo estudio se realizó un diseño factorial centrado en las caras, con el que se evaluó la influencia en el proceso de las siguientes variables: temperatura, concentración de catalizador y relación másica de disolvente.

Las respuestas elegidas en este diseño fueron la pureza y el rendimiento en biodiésel, observándose que la variable que más influyó sobre ellas fue la concentración de catalizador, seguida de la temperatura y de la relación másica del disolvente.

Esto se estudió mediante la obtención de un modelo de segundo orden y la aplicación de la metodología de superficies de respuesta. La optimización del proceso se realizó en base al cumplimiento de la norma EN 14214, que especifica que el biodiésel debe tener una pureza mínima del 96,5%.

Capítulo II. Introducción.

1. Antecedentes

La liberalización del sector energético, y la creciente preocupación por los problemas medioambientales de la sociedad actual, están aumentando de manera significativa la demanda de fuentes de energía limpias. Esta situación está definiendo un nuevo enfoque de la estrategia energética global, que deberá tener como objetivo encontrar un equilibrio entre crecimiento económico, competitividad y protección del medio ambiente.

Esta necesidad de preservar el medio ambiente hizo que en el año 1997 se firmara el Protocolo de Kyoto, acuerdo cuyo fin era disminuir las emisiones globales de los principales gases de efecto invernadero a la atmósfera. Estas emisiones debían ser un 5,2% inferior respecto a las del año 1990 para el periodo 2008-2012. Un buen número de países desarrollados se comprometieron a cumplir dicho protocolo, pero en la actualidad se puede comprobar que en muchos casos ese compromiso no se ha alcanzado todavía.

En España la situación es similar. En el momento en que se firmó el este acuerdo, estaba experimentando un fuerte desarrollo, motivo por el cual se le permitió un aumento en su cuota de emisiones mayor que a otros países de la Unión Europea. Pese a esta ventaja, en los años posteriores a la entrada en vigor de las mediadas acordadas España, sobrepasó con creces los límites permitidos. Sin embargo, parece ser que esta tendencia empieza a cambiar, ya que en 2008 las emisiones se redujeron un 17% y mejoró la eficacia energética, gracias al crecimiento de las energías renovables y un menor uso de fuentes energéticas como el carbón y el petróleo.

En cuanto a las energías renovables, y en concreto a los biocombustibles para el transporte, el Parlamento y el Consejo Europeos emitieron la Directiva Europea 2003/30/CE, con la que se busca alcanzar una sustitución de al menos un 5,75% de los carburantes de origen fósil por biocarburantes alternativos para 2010. Esta directiva se complementó con otra posterior (2003/96/CE) en la que se da permiso a los países miembros para reducir o eliminar los impuestos especiales para biocarburantes, en un claro intento por fomentar su uso.

Estos requerimientos, y otros que engloban distintos objetivos para otras energías renovables, fueron recogidos en un plan elaborado por el Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE) en 2005: el Plan de Energías Renovables de España (PER). En él se resumen todos los objetivos anteriores, además de actualizarse para 2010: las fuentes renovables deben suponer el 12 % de la energía consumida, el 29,4 % de la generación eléctrica y los biocarburantes el 5,75 % del transporte (Comisión Europea, 1997).

Actualmente se encuentra en proceso de elaboración un nuevo plan, el Plan de Energías Renovables 2011-2020, donde se actualizarán algunos de los objetivos del plan anterior y se fijarán otros nuevos para cada sector de energías renovables (http://www.mityc.es).

Dentro de este plan tienen cabida los biocombustibles, tema de estudio de este proyecto, sobre los cuales se hablará a continuación.

Según la Ley 34/1998, de 7 de octubre, del Sector de Hidrocarburos, se consideran ***biocombustibles*** los productos que a continuación se relacionan y que se destinan a su uso como carburantes, directamente o mezclados con carburantes convencionales (http://www.biodieselspain.com/articulos/idae.pdf):

- Alcohol etílico producido a partir de productos agrícolas o de origen vegetal (bioetanol), ya se utilice como tal o previa modificación química.
- Alcohol metílico (metanol), obtenido a partir de productos de origen agrícola o vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación química.
- Aceites vegetales como tales o modificados químicamente.

Se entiende como ***biocarburante*** al conjunto de combustibles **líquidos** provenientes de distintas transformaciones de la biomasa, que al presentar determinadas características físico-químicas similares a los carburantes convencionales derivados del petróleo, pueden ser utilizados en motores de vehículos en sustitución de éstos.

Cabe destacar que no se pueden usar como materias primas aquellas que sirvan como alimento para el hombre y animales domésticos. Este es un detalle fundamental, ya que los detractores del uso de cultivos energéticos justifican el encarecimiento de algunos alimentos como consecuencia de la competencia entre los sectores energético y agrícola, provocando problemas sociales y económicos. Este inconveniente se puede evitar utilizando materias primas que no sean aprovechables como alimento.

Los biocarburantes más conocidos y producidos en la actualidad son estos tres:

- **Etil*terc*butileter (ETBE)**: Compuesto ampliamente utilizado como aditivo antidetonante de la gasolina (11% de este compuesto eleva 1,4 puntos en el Índice de Octano, lo que lleva a menores consumos, mejores prestaciones, menos contaminación…). Se produce hoy día a través de un proceso de eterificación de bioetanol.
- **Bioetanol**: Se obtiene a partir de la fermentación de azúcares o de los productos de hidrólisis del almidón presente en algunas plantas. Sería el futuro sustituto de la gasolina, aunque tiene que cumplir unos estrictos requisitos para evitar problemas derivados de su

uso: aumento de la volatilidad de la gasolina, avidez por el agua, poder disolvente y corrosividad.

- **Biodiésel**: Producido mediante la transformación de aceites vegetales o grasas animales en ésteres metílicos a través de procesos de transesterificación. Se puede mezclar con el gasóleo prácticamente en cualquier proporción, y no es necesaria ninguna modificación en los motores Diésel actuales para su empleo.

El uso de biocombustibles presenta múltiples ventajas, destacando la drástica reducción de l perfil de emisiones, mucho menores en general que las producidas por combustibles fósiles. Además, al contrario que estos últimos, son una fuente de energía renovable.

Como es de suponer, también presentan una serie de inconvenientes muy a tener en cuenta. Entre los más importantes destaca la disponibilidad de materias primas.

2. Biodiésel, definición y especificaciones.

El biodiésel es un biocarburante líquido producido a partir de aceites vegetales y grasas animales. Las materias primas más utilizadas son plantas oleaginosas, como girasol, colza, soja y palma. Las propiedades del biodiésel obtenido a partir de estas fuentes son muy similares a las del gasóleo de automoción, en lo que se refiere a densidad y número de cetano. Por estas razones este biocarburante se puede mezclar con el gasóleo de origen fósil en prácticamente cualquier proporción para usarse en motores diésel actuales.

Una definición rigurosa de biodiésel es la propuesta por la ASTM (American Society for Testing and Materials), que lo describe como “ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables, tales como aceites vegetales o grasas de animales, y que se emplean en motores de ignición de compresión”.

A esta definición habría que añadirle un matiz, y es que los ésteres más utilizados son los metílicos y etílicos (Vicente et al, 2001), que se obtienen mediante reacción de transesterificación a partir de aceites y grasas tanto vegetales como animales, además de por reacción de esterificación a partir de ácidos grasos libres. El uso de estos alcoholes lleva asociadas una serie de ventajas químicas y físicas, además de un bajo coste.

La reacción de transesterificación mencionada anteriormente, y que se explicará más adelante, es el principal método empleado en la actualidad para obtener ésteres metílicos. En este proceso reaccionan las moléculas de triglicéridos con metanol para dar como producto ésteres metílicos y

glicerina. Las propiedades de estos ésteres dependerán del tipo de materia prima empleada. Otra técnica bastante utilizada es la esterificación de los ácidos grasos libres (Mittelbach *et al.*, 2007).

Según la normativa europea EN 14214 los ésteres metílicos de ácidos grasos empleados como biocombustible para automoción deben cumplir unos estándares determinados. Éstos están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Normativa Europea para el biodiésel.

PROPIEDAD	UNIDADES	LÍMITE MÍNIMO	LÍMITE MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Contenido en éster	% (m/m)	96,5		UNE EN 14103
Densidad a 15ºC	kg/m^3	860	900	EN ISO 3675
Viscosidad a 40ºC	mm^2/s	3,5	5	UNE EN ISO 3104
Punto de inflamación	ºC	120	-	ISO 3679
Contenido en azufre	mg/kg	-	10	ISO 20846
Residuo carbonoso	% (m/m)	-	0,3	ISO 10370
Número de cetano		51		EN ISO 5165
Contenido en cenizas de sulfato	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Contenido en agua	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminación total	mg/kg	-	24	EN 12662
Corrosión Cu (3h/50ºC)	Clasificación	Clase 1		EN ISO 2160
Estabilidad a la Oxidación, 110ºC	horas	6		UNE EN 14112
Acidez	mg KOH/g muestra		0,5	UNE EN 14104
Índice de yodo	g I_2/100g muestra		120*	UNE EN 14111
Éster metílico del ácido linolénico	% (m/m)		12	UNE EN 14103
Ésteres metílicos poliinsaturados	% (m/m)		1	
Contenido en metanol	% (m/m)		0,2	UNE EN 14110
Contenido en monoglicéridos	% (m/m)		0,8	UNE EN 14105
Contenido en diglicéridos	% (m/m)		0,2	UNE EN 14105
Contenido en triglicéridos	% (m/m)		0,2	UNE EN 14105
Glicerina libre	% (m/m)		0,02	UNE EN 14105
Glicerina total	% (m/m)		0,25	UNE EN 14105
Metales Grupo I (Na + K)	mg/kg		5	UNE EN 14108/14109
Metales Grupo II (Ca + Mg)	mg/kg		5	prEN 14538
Contenido en fósforo	mg/kg		10	UNE EN 14107
POFF	ºC		Según época y país	EN 116

* La legislación española permite un valor máximo de 140 g I2/100g

3. Ventajas e Inconvenientes del biodiésel.

El creciente interés en investigar y mejorar la producción de biodiésel viene justificado por una serie de beneficios que lo hacen muy atractivo, ya sea para su uso mezclado con carburantes fósiles o de forma independiente. Las ventajas más significativas que presenta el biodiésel se comentan a continuación (Ferro Brage et al, 2006):

Medioambientales

- No es tóxico, carcinógeno ni alergénico. Es biodegradable (en 21 días se degrada aproximadamente el 98% del biodiésel).

- Comparado con el gasóleo de origen fósil, produce una reducción drástica de las emisiones contaminantes. La emisión de azufre se reduce hasta casi el 100%, los inquemados disminuyen 90%, los compuestos aromáticos del 75 al 90%, y las partículas sólidas 55%.

- En cuanto a la emisión de CO_2, el balance neto es cero, ya que el gas emitido en la producción y consumo de biodiésel es utilizado posteriormente por las plantas o microorganismos fotosintéticos durante el proceso de fotosíntesis.

Económicas

- La producción y uso de biodiésel permite una mayor autonomía energética, lo que implica una menor dependencia del petróleo. Esto es una gran ventaja para países como España, donde la totalidad del crudo empleado procede del exterior y la mitad del gasóleo de automoción consumido (www.elmundo.es) es de importación.

- El uso de este biocarburante no precisa de cambios significativos de infraestructura para su distribución y logística, al ser perfectamente compatible con las infraestructuras actuales para combustibles de origen fósil, por lo que los costes de implantación son reducidos.

Técnicas

- Mezclado con el diésel de origen fósil se obtiene un combustible con mejores propiedades (mayor índice de cetano y mejores cualidades lubricantes).

- Es compatible con los motores Diésel actuales, por lo que no es necesaria ninguna modificación en éstos en mezclas que no superen un contenido del 20% de biodiésel.

No obstante y pese a estas importantes ventajas es precioso hacer notar algunos de los inconvenientes del biodiésel. Entre ellos cabe destacar el aumento de NO_x térmico que se produce en las emisiones. Por otro lado su mayor inestabilidad en el almacenamiento debido a que el biodiésel es

menos estable a la oxidación que el gasóleo, al tener oxígeno y dobles enlaces en sus moléculas. El primero de estos problemas parece que se podría mitigar añadiendo metanol a la mezcla combustible, ya que este compuesto actuaría como refrigerante (Cheng *et al.,* 2008).

Sin embargo estos dos inconvenientes no son los más importantes. El verdadero problema del biodiésel es su producción, ya que las materias primas más empleadas hasta la fecha han sido de origen vegetal, que tienen un coste relativamente elevado y requieren de grandes extensiones de terreno para su cultivo. La conversión de triglicéridos a ésteres metílicos es de casi el 100%, pero el porcentaje de esos triglicéridos en los vegetales es bajo, y depende del tipo de vegetal. Para obtener una tonelada de aceite se necesitaría aproximadamente una hectárea de cultivo, lo que usando como ejemplo una planta productora como la de la empresa Infinita Renovables en Castellón (Tabla 4), con una capacidad de 300.000 tm/año, supondría una superficie cultivada de 300.000 ha, algo totalmente insostenible.

Volviendo al precio de la materia prima, el encarecimiento que ha sufrido en los últimos años ha sido en parte por la competencia con el sector alimenticio, lo que ha favorecido la especulación. En el año 2007 la ONU mostró su inquietud por estos problemas en la producción de biocombustibles, y lo hizo a través de un informe publicado el 8 de mayo de ese año (UN-Energy, 2007). En este informe se animaba a continuar con el desarrollo de este tipo de bioenergías, reconociendo su papel protagonista en el futuro pero dejando claro que se debía garantizar el buen uso de las tierras de cultivo, para no provocar daños sociales y medioambientales que superasen con creces los beneficios derivados del uso de estas nuevas energías.

A pesar de lo anterior, en 2008 la subida del precio de vegetales como la soja y el trigo fue espectacular, lo que creó problemas en el sector alimenticio. Esto hizo que la ejecutiva del Programa Mundial de Alimentos advirtiese en una conferencia de prensa (24 abril de 2008) que las reservas de alimentos estaban en su punto más bajo de las últimas décadas, y que los cultivos energéticos acentuaban esta mala situación.

Para evitar este grave inconveniente, están surgiendo nuevas alternativas a los cultivos energéticos convencionales, entre las que se pueden destacar las siguientes:

- **Biocombustibles de segunda generación**. Son aquellos derivados de materias primas vegetales y orgánicas que no tienen incidencia en el sector alimenticio. Estas materias serían por ejemplo biomasa forestal o plantas herbáceas.

- **Biocombustibles de tercera generación**. Estos combustibles proceden de microorganismos como determinadas algas y hongos con gran capacidad de almacenamiento de lípidos. Con estos microorganismos se eliminan los problemas tanto de la superficie de cultivo como de la competencia con el precio de los alimentos, siempre que la fuente de carbono que utilicen no

proceda a su vez de cultivos alimentarios. Por ello, esta es una vía de estudio prometedora y de alto potencial futuro.

Los motivos de la importancia de los combustibles de tercera generación se ven claramente en la Tabla 2, en la que se muestra el rendimiento en lípidos de distintas materias primas:

Tabla 2. Rendimiento lipídico anual de distintas materias primas (Chisti, 2007),

Fuente	Rendimiento lipídico (l/ha)
Maíz	172
Aceite de soja	446
Aceite de colza	1.190
Jatropha curcas	1.892
Aceite de palma	5.950
Algas y cianobacterias[a]	59.000
Algas y cianobacterias[b]	137.000

[a]: 30% Contenido lipídico.
[b]: 70% Contenido lipídico.

Como se puede apreciar, el rendimiento de las algas y cianobacterias es en algunos casos más de 100 veces superior al de las materias primas vegetales convencionales. La producción de estas algas se lleva a cabo en dos tipos de reactores (Chisti, 2007), lo que permite una producción más rápida y continuada que la de las plantas y sin necesidad de fertilizantes y áreas de cultivo extensas.

Determinados microorganismos también han demostrado ser una materia prima excelente, llegando a competir con los resultados obtenidos por algas y cianobacterias de alto contenido lipídico. Dentro de estos microorganismos existen además algunas especies capaces de crecer en ausencia de luz manteniendo altos contenidos en lípidos, lo que implica un alto rendimiento en la producción de biodiésel.

El presente proyecto se centra en la línea de investigación de biocombustibles de tercera generación, desarrollada en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos, utilizando como fuente de obtención de lípidos un microorganismo, el hongo *Mucor circinelloides* cuyas características se describirán más adelante.

4. Materias primas para la obtención de biodiésel.

Las fuentes de ácidos grasos y triglicéridos para la obtención de los ésteres metílicos que componen el biodiésel son muy variadas, pero las más utilizadas en España son los aceites de fritura usados y el aceite de girasol.

A continuación se clasificará a las materias primas en distintos grupos según su origen. De esta clasificación se destaca el grupo “Aceites de otras fuentes”, por ser el implicado en este trabajo. Tras esto se hará una descripción detallada del microorganismo utilizado, el *Mucor circinelloides*.

4.1. Aceites vegetales y grasas animales.

En función de su procedencia, las materias primas se pueden agrupar del siguiente modo (Vicente et al, 2001):

- **Aceites vegetales convencionales.**

Destacan en este grupo los aceites de girasol, colza, soja, coco y palma. En España no resulta muy atractivo este tipo de cultivo, ya que la producción media por hectárea del aceite de girasol hace que no sea muy rentable como cultivo energético (Vicente *et al.*, 2001).

- **Aceites vegetales alternativos.**

En este grupo se engloban las distintas fuentes de energía para combustibles de segunda generación. En este sentido destacan los aceites de *Camelina sativa, Crambe abyssinica* y *Jatropha curcas*. Existen otros cultivos que se adaptan mejor a las condiciones de cultivo de España y que presentan rendimientos de producción mayores. En concreto, se trata de los cultivos de *Brassica carinata* y *Cynara cardunculus* (Vicente *et al*, 2001).

De las plantas anteriores destaca la *Jatropha curcas,* ya que sus semillas son tóxicas y por tanto no comestibles (de ahí que se use para biocombustibles de segunda generación). Además de lo anterior, el cultivo de este vegetal permite combatir la desertización y generar Asimismo, de su tallo se extrae látex (www.globalenergy.es).

- **Aceites vegetales modificados genéticamente.**

Gracias a la ingeniería genética se puede solventar un inconveniente que presentan ciertos aceites, que es un alto nivel de insaturaciones. Esto provoca baja estabilidad frente a la oxidación del biodiésel, pero a través de ciertas modificaciones genéticas se puede reducir el número de insaturaciones y hacer viable el uso de estos aceites (Vicente *et al.*, 2001).

- **Aceites de fritura usados.**

Los aceites de fritura usados son la alternativa más económica para la producción de biodiésel y además evitan su tratamiento como residuo. Actualmente, en España sólo hay planes para recoger una parte de estos aceites del sector hostelero y de las cocinas industriales que se emplean para producir jabones. España es un gran consumidor de aceites, especialmente de girasol y de oliva, pero

a nivel doméstico no existes una infraestructura suficiente para su recogida y reutilización (García y García, 2006).

- **Grasas animales.**

El uso de grasas animales es factible, pero implica unas condiciones de operación más severas que en los casos anteriores, debido al elevado contenido de ácidos grasos libres presente en estas materias primas (Tashtoush *et al.*, 2004).

4.2. Aceites de microalgas y microorganismos.

Los aceites procedentes de microalgas y otros microorganismos conducen a los biocombustibles denominados de tercera generación. Su composición es, en parte, similar a los aceites descritos anteriormente, pero como ya se mencionó, se obtienen a partir de microorganismos como algas, bacterias, levaduras y hongos. Estos organismos se pueden cultivar expresamente para la obtención de biodiésel en biorreactores (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2007).

Las ventajas que supone el uso de microorganismos frente a otras materias primas son (Rittmann, 2008; Miyamoto, 1997; Nagle y Lemke., 1990; Xue *et al.*, 2006; Chisti, 2007):

- Los costes de cultivo y transporte son menores comparándolos con los de las plantas oleaginosas.
- Pueden tratarse químicamente y son homogéneos, llegando a acumular hasta un 80 % de lípidos en el caso de algunas microalgas.
- Las algas pueden fijar CO_2 empleándolo como fuente de carbono mediante la fotosíntesis y reducir el nivel de este gas en la atmósfera.
- Son capaces de crecer en condiciones que no serían favorables para plantas oleaginosas. No ocupan suelo fértil y se cultivan sin dependencia estacional ni climatológica, además el consumo de agua, si está bien regulado, es menor que en el caso de las plantas.
- Son capaces de doblar su masa en aproximadamente un día, frente a las semanas que necesitan las plantas.
- El rendimiento lipídico es mayor a 100000 l/ha·año mientras que en el caso de las plantas de alto contenido lipídico es menor a 1000 l/ha·año (Huber *et al.*, 2006).

Todas estas ventajas no son aplicables a todos los microorganismos y microalgas. Sólo son interesantes de cara a la producción de biocombustibles, aquellos microorganismos capaces de albergar una gran cantidad de lípidos, los llamados oleaginosos. Por citar un ejemplo, de las 60.000

especies de mohos existentes, solamente 50 pueden almacenar más de un 25% de lípidos (Acuña, 2004).

Aunque el interés por el uso de estos microorganismos ha aumentado en la actualidad, hace más de dos décadas se desarrolló el primer estudio de obtención de sustitutos de la gasolina y gasóleo a partir de esta materia prima (Neenan et al, 1986). En él se utilizaron microalgas y se propusieron dos métodos de conversión: la transesterificación para conseguir biodiésel, y la pirólisis catalizada por zeolitas para obtener gasolinas.

Esta investigación supuso el punto de partida de otras posteriores, que fueron fijando sus objetivos en estudiar aspectos del proceso más concretos. Así, Nagle y Lemke (1990) publicaron un procedimiento para extraer los lípidos y hacerlos reaccionar después. Para ello estudiaron el efecto de los disolventes utilizados en el proceso de extracción.

Asimismo, se ensayó un proceso de licuefacción termoquímica usando el alga *Botryococcus braunii* como materia prima, con rendimientos energéticos favorables (Dote et al, 1992).

Posteriormente, se empleó la pirólisis de la microalga *Dunaliella* para conseguir un combustible líquido aprovechando no sólo la fracción lipídica de este microorganismo, sino también la proteica (Ginzburg, 1993). Con esta microalga se extrajo con diclorometano el aceite producido por licuefacción termoquímica (Minowa et al, 1995). Se obtuvieron rendimientos del 31-44% (en peso respecto de la biomasa celular) con un balance energético también favorable.

Más recientemente se ha propuesto el aprovechamiento de los fangos de tratamiento de aguas como medio de cultivo de los microorganismos (Gray, 2004). De este modo se abarataría el coste de producción atrapando además el CO_2 que produce el fango. En la actualidad hay líneas de investigación centradas en el desarrollo de fotobiorreactores de este tipo que optimicen la producción lipídica del alga *Synechocystis* modificada genéticamente (Rittmann, 2008).

Siguiendo la idea anterior, se ha estudiado el aprovechamiento de las aguas residuales orgánicas del proceso de producción de glutamato monosódico, producto muy popular en el este asiático, como sustrato para la levadura *Rhodotorula glutinis* (Xue *et al.*, 2006). De este modo la levadura acumulaba lípidos (10%) y al mismo tiempo reducía la DQO de las aguas (85%).

La ingeniería genética también ha puesto su atención en la obtención de biodiésel de tercera generación. Gracias a aquella, una cepa de *Escherichia coli* produjo ésteres de ácidos grasos *in vivo* (Kalscheuer *et al.*, 2006). En este caso se consiguió que propia célula sintetizara el etanol y los ácidos grasos, que se esterificaron después con ayuda de una enzima, alcanzándose rendimientos del 26% de ésteres por peso de biomasa seca. No obstante esta técnica presenta un inconveniente, y es la

necesidad de transesterificar los lípidos del interior de la célula, ya que de no hacerlo el biodiésel obtenido resultaría impurificado por ellos y no cumpliría las especificaciones de la Norma EN 14214.

Dentro del objetivo de conseguir una mayor acumulación de lípidos, los primeros trabajos datan de 1996, cuando se introdujeron vectores con genes para aumentar el contenido lipídico de la diatomea *Cyclotella cryptica* (Dunahay *et al*., 1996). En la actualidad se sigue investigando en este campo (Song et al., 2001). Otra forma de modificar dicho contenido lipídico consiste en variar las condiciones lumínicas, de aireación y composición del medio de cultivo. De este modo se obliga al microorganismo a alterar su metabolismo, siempre con la idea de favorecer la síntesis y almacenamiento de lípidos (Ratledge, 2002; Michinaka, 2003).

Visto lo anterior, cabe destacar que de entre todas las fuentes posibles de microorganismos, las microalgas son las más frecuentes. Esta elección se debe a varios factores (Nagle *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 2006; Chisti, 2007):

- Son fotosintéticas (pueden utilizar el CO_2 como fuente de carbono).
- Pueden acumular lípidos en grandes cantidades (más del 80% en peso).
- No se ven afectadas por los cambios de estaciones ni climatológicos.
- Poseen un corto periodo de crecimiento (pueden doblar su biomasa en 24 horas).

En la actualidad se ha intensificado la investigación sobre otros microorganismos como fuente de materia prima para la producción de biodiésel. Entre ellos destacan los hongos del orden de los Mucorales por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Wynn *et al*., 2001; Szczęsna-Antczak *et al*., 2006). El Departamento de Tecnología Química y Medio Ambiente de la Universidad de Rey Juan Carlos en colaboración con el Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, investigan desde 2006 las posibilidades que puede llegar a tener el microorganismo *Mucor circinelloides.* El presente trabajo de investigación está englobado en esa línea y es la continuación de trabajos anteriores.

4.2.1. *Mucor circinelloides* como materia prima para biodiésel.

A continuación se describirán las características básicas del microorganismo empleado en el presente trabajo, que como se ha comentado anteriormente es el *Mucor circinelloides.* En la Tabla 3 se expone su clasificación taxonómica:

Tabla 3. Descripción taxonómica del microorganismos *Mucor circinelloides*.

Reino	Phylum	Orden	Familia	Género
Fungi	*Zygomycota*	*Mucorales*	*Mucoraceae*	*Mucor*

En la Figura 1 se pueden observar dos imágenes de la especie *Mucor circinelloides*:

Figura 1. Imágenes de microscopio de *Mucor circinelloides y aspecto de una colonia*. (Disponibles en: http://www.gefor.4t.com/concurso/hongos/mucorcircinelloides05.jpg http://www.plataformasinc.es

El hongo *Mucor circinelloides* se ha estudiado extensamente debido a sus usos industriales (Jackson *et al.*, 1998). Las cepas de este hongo son conocidas como eficientes productoras de lipasas intracelulares, formando también numerosos cuerpos lipídicos ricos en ácidos grasos insaturados, en condiciones de crecimiento óptimas para la síntesis de dichas lipasas (Szczesna-Antczak et al, 2006).

4.2.2. Composición lipídica del microorganismo *Mucor circinelloides*.

La composición lipídica de este hongo es determinante de cara a su empleo como materia prima en la obtención de biodiésel. Dentro del género Mucor existen varias especies, entre las que destacan *Mucor amphibiorum*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor indicus*, *Mucor racemosus*, y *Mucor ramosissimus.* Esta variedad de especies hace que la cantidad de lípidos celulares y su composición no sean un elemento constante en el género, si no que dependen de la cepa en cuestión y de las condiciones de cultivo. Además, diferentes estudios han indicado que para los hongos del género *Mucor*, las fuentes de carbono presentes en el medio influyen en su composición lipídica (Certik *et al.*, 1993). Pero este no es el único factor a tener en cuenta, ya que la presencia de vitaminas, temperatura de crecimiento, presencia de determinadas sustancias (antihongos) o las diferentes fuentes de otros nutrientes también afectan significativamente a la acumulación de lípidos (Botha *et al.*, 1997).

Para que el cultivo del *Mucor circinelloides* produzca elevado rendimiento lipídico, es preciso que se den dos condiciones fundamentales. La primera es que el medio presente déficit de nitrógeno (nutriente fundamental para el hongo), y la segunda es que haya exceso de fuente de carbono

(Ratledge, 2002). Como consecuencia de la falta de nutrientes la célula deja de crecer y se inhibe su división, pero el ritmo de síntesis de lípidos continúa inalterado. Esto hace que la célula almacene estos lípidos, ya que no puede dividirse.

Según un estudio sobre la acumulación de lípidos en hongos filamentosos (Wynn *et al.*, 1999), *Mucor circinelloides* sólo es capaz de acumular un 20 % de lípidos (sobre materia seca) incluso en las condiciones más propicias. Pero este límite puede ser rebasado mediante la manipulación genética. Por el momento se han podido crear cepas recombinantes del hongos que, a través de una mayor actividad de la enzima málica, son capaces de almacenar más del doble de la cantidad de lípidos máxima (Zhang *et al.*, 2007).

El presente trabajo presenta una clara relación con este campo de estudio, al utilizar como materia prima un microorganismo modificado genéticamente.

5. Producción de biodiésel a partir de microorganismos.

El proceso más habitual para la obtención de biodiésel consiste en una extracción y posterior reacción de la fracción lipídica con metanol en las condiciones adecuadas (Nagle y Lemke, 1990; Miao y Wu, 2006; Xue *et al.*, 2006). Éste comprende las siguientes etapas:

- Acondicionamiento y preparación de la materia prima.
- Extracción de la fracción lipídica.
- Reacción de obtención de biodiésel.

A continuación se detallan cada una de las etapas de la producción de microorganismos enumeradas anteriormente.

5.1. Acondicionamiento y preparación de la materia prima.

Como ya se ha comentado, las condiciones de cultivo de la materia prima son esenciales en el proceso. El microorganismo crece en las condiciones óptimas de luz, temperatura, aireación y nutrientes, y después se recolecta según una de las siguientes técnicas: centrifugación, filtración, liofilización, floculación, etc.

5.2. Extracción de la fracción lipídica.

La parte de la célula que se pretende extraer es la fracción lipídica, precursora de los ésteres metílicos. Sin embargo, dentro de esta fracción se deben distinguir dos tipos de lípidos según su distribución en la célula (Nelson y Cox, 2000):

- Lípidos libres: fracción lipídica poco ligada a otros constituyentes de la célula como los glicéridos (que pueden ser mono-, di- o triglicéridos), ceras, ácidos grasos, terpenos y esteroles.
- Lípidos complejos: están unidos física o químicamente a otros compuestos celulares como los fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos.

Los lípidos son un conjunto heterogéneo de moléculas orgánicas, compuestas por cadenas de carbono y algún grupo funcional con oxígeno, aunque también pueden contener azufre, nitrógeno y fósforo. Pese a la heterogeneidad que presentan estos compuestos comparten una propiedad: la hidrofobicidad, característica que les hace solubles en disolventes orgánicos.

De los dos tipos de lípidos vistos anteriormente, los lípidos libres serán fácilmente extraíbles por disolventes como el n-hexano o el dietiléter, que rompen las interacciones hidrófobas de estos lípidos con otros compuestos. Sin embargo, las interacciones presentes en los lípidos complejos son más fuertes (puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas), lo que hace necesario el uso de disolventes más polares como el metanol o el cloroformo para lograr su extracción.

5.3. Reacciones de obtención de biodiésel.

En este apartado se explicarán las reacciones implicadas en el proceso de obtención de ésteres metílicos.

5.3.1. Transesterificación.

El proceso de transesterificación se basa en la reacción de triglicéridos con alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol, propanol…), obteniéndose como producto ésteres y glicerina. Se desarrolla en una proporción molar de 3:1 alcohol:triglicérido, aunque se suele añadir alcohol en exceso para desplazar la reacción hacia la formación de productos. Este desplazamiento se ve ayudado por la formación de glicerina, ya que ésta es inmiscible con los ésteres metílicos, y gracias a estos factores se consiguen conversiones cercanas al 100% (Ma y Hana, 1999).

El esquema global de la reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol se refleja en la Figura 2.

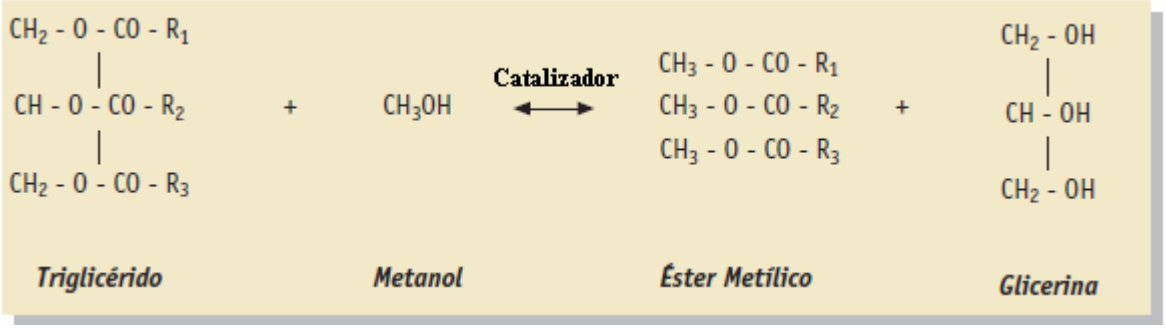


Figura 2. Esquema global de la reacción de transesterificación.

La transesterificación completa del triglicérido se da en 3 pasos que corresponden a reacciones reversibles en las que el triglicérido es convertido, consecutivamente, en diglicérido, monoglicérido y glicerina con la producción de una molécula de éster en cada paso. La Figura 3 describe este proceso.

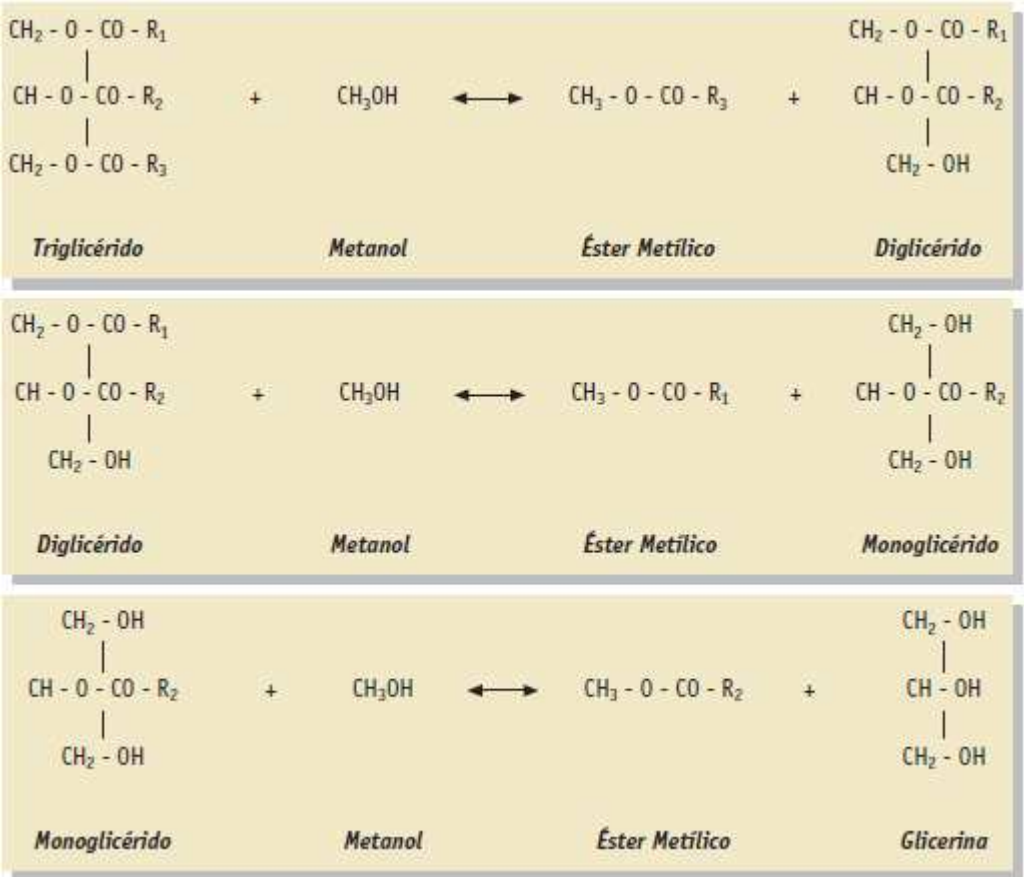


Figura 3. Esquema detallado de la transesterificación.

Esta reacción es reversible, y además del exceso de alcohol y la formación de glicerina para fomentar la formación de productos, se necesita un catalizador. El catalizador se usa para aumentar la velocidad de reacción. Los catalizadores utilizados pueden ser:

- Ácidos homogéneos: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácidos sulfónicos orgánicos (Meher *et al.*, 2006) y también ácidos de Lewis (Di Serio *et al.*, 2005).
- Ácidos heterogéneos: zeolitas (Lotero *et al.*, 2005), resinas sulfónicas, sulfatos u óxidos de wolframio soportados en óxido de circonio.
- Básicos heterogéneos: óxidos metálicos (Yang y Xie, 2007), Na/NaOH/Al_2O_3.).
- Básicos homogéneos: hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonatos y diferentes alcóxidos como el metóxido sódico o potásico.
- Enzimáticos: lipasas inmovilizadas como Candida, Penicilluim o Pseudomonas (Fukuda *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2006; Al-Zuhair *et al.*, 2006).

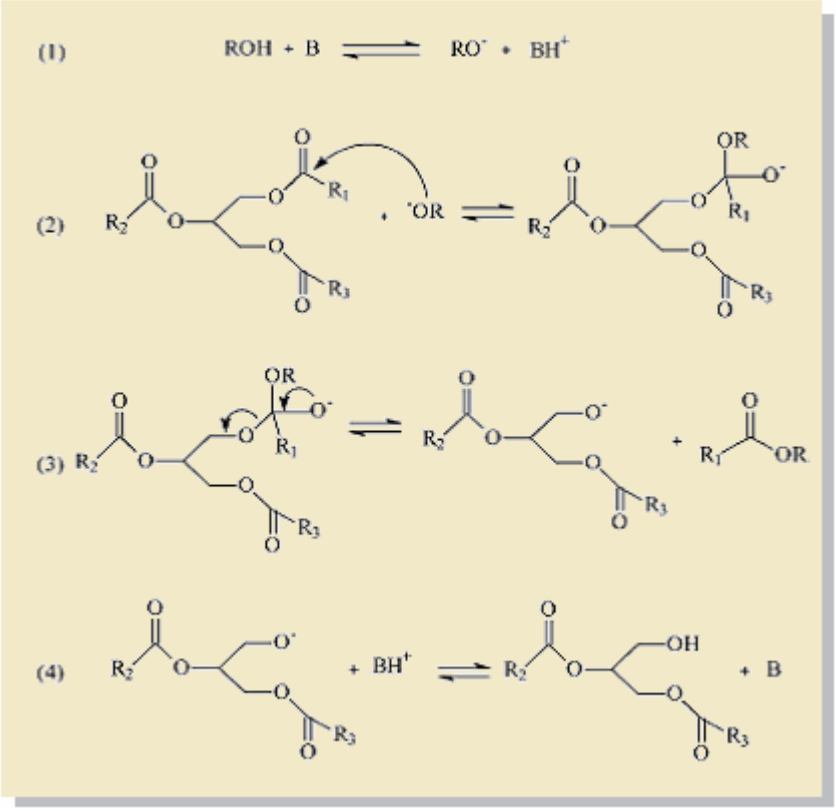
De todos ellos, los más utilizados a escala comercial son los homogéneos básicos ya que actúan de forma más rápida y permiten trabajar en unas condiciones de operación moderadas. La transesterificación básica se produce aproximadamente 4000 veces más rápida que la catalizada por la misma cantidad de ácido (Formo, 1954).

Sin embargo esta catálisis básica presenta una serie de inconvenientes muy a tener en cuenta, y que implican una pérdida de rendimiento (Lotero *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2007):

- Formación de jabones con el catalizador por la neutralización de los ácidos grasos.
- Saponificación de triglicéridos en las mismas condiciones que el caso anterior.
- Presencia de agua, que puede reaccionar con los ésteres metílicos para formar de nuevo el ácido graso o hidrolizar los triglicéridos produciendo mono y diglicérido y ácidos grasos.

La saponificación es un proceso del todo indeseable, porque además de eliminar materia prima (triglicéridos y ácidos grasos) favorece la disolución de los ésteres metílicos en la glicerina formada, mediante un proceso de emulsión (Vicente *et al.*, 2007). Estas reacciones implican una pérdida tanto de materia prima como de catalizador, además de una complicación en el proceso de separación y purificación de los ésteres formados (Vicente *et al.*, 2004; Lotero *et al.*, 2005).

El mecanismo de la alcóholisis básica se describe en la Figura 4 (Lotero *et al.*, 2005).



B: catalizador básico

R_i: cadenas de los ácidos grasos

(1) Formación de las especies activas gracias al catalizador.
(2) Ataque nucleofilo del RO- al grupo carbonilo del triglicérido, dando un intermediario tetraédrico.
(3) Ruptura del compuesto anterior.
(4) Regeneración del RO- como especie activa
Nota: Esta secuencia se repite de la misma forma con el diglicérido y el monoglicérido.

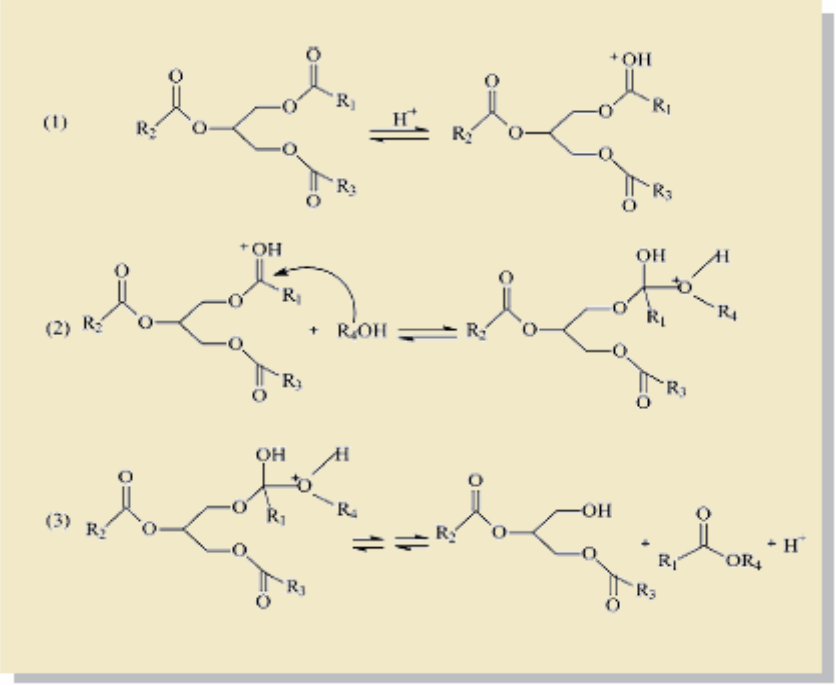
Figura 4. Mecanismo de transesterificación básica de un triglicérido.

Pese a los inconvenientes de este método, hay que destacar que existen líneas de investigación que proponen soluciones. La conversión de ácidos grasos en jabón puede evitarse utilizando materias primas con un bajo índice de acidez (<0,5 %), y el empleo de catalizadores básicos que no contengan el grupo hidroxilo (Fröhlich y Rice, 1995; Vicente *et al.*, 2004).

La alternativa al método anterior implica emplear un catalizador ácido. Como es de suponer, esto presenta una serie de ventajas pero también de inconvenientes. Dentro de las primeras destaca la desaparición de las reacciones laterales que se acaban de explicar en el caso de la catálisis básica. Al mismo tiempo, el rendimiento en la obtención de biodiésel se incrementa al esterificarse también los ácidos grasos (Meher *et al.*, 2006). Finalmente, su utilización simplifica y economiza el tratamiento posterior de los productos (separación y purificación) al no tener lugar la saponificación (Vicente *et al.*, 2004).

En cuanto a los inconvenientes, la principal razón por la que este método no se usa a escala industrial es el aumento en la severidad de las condiciones de reacción. Se hace necesaria una mayor temperatura y presión, además de una rápida agitación y mayor tiempo de reacción (Lotero *et al.*, 2005).

El catalizador ácido más utilizado tradicionalmente ha sido el ácido sulfúrico (García y García, 2006) y el mecanismo que sigue la reacción en este caso es el descrito en la Figura 5 (Lotero *et al.*, 2005).



(1) Protonación del grupo carbonilo por el catalizador ácido.
(2) Ataque nucleofilo del alcohol, con formación de un intermediario tetraédrico.
(3) Migración del protón y ruptura del compuesto anterior.

Figura 5. Mecanismo de transesterificación ácida de un triglicérido.

Esta secuencia se repite dos veces más, con el diglicérido y el monoglicérido formados secuencialmente hasta completar el proceso de transesterificación.

5.3.2. Esterificación

Combinado con la transesterificación se usa la esterificación, a fin de convertir los ácidos grasos presentes en la materia prima en ésteres metílicos. El esquema general de esta reacción aparece en la Figura 6:

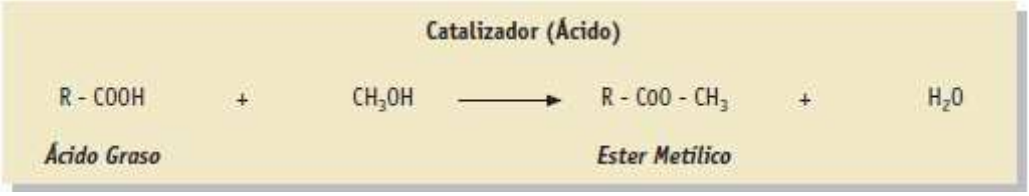
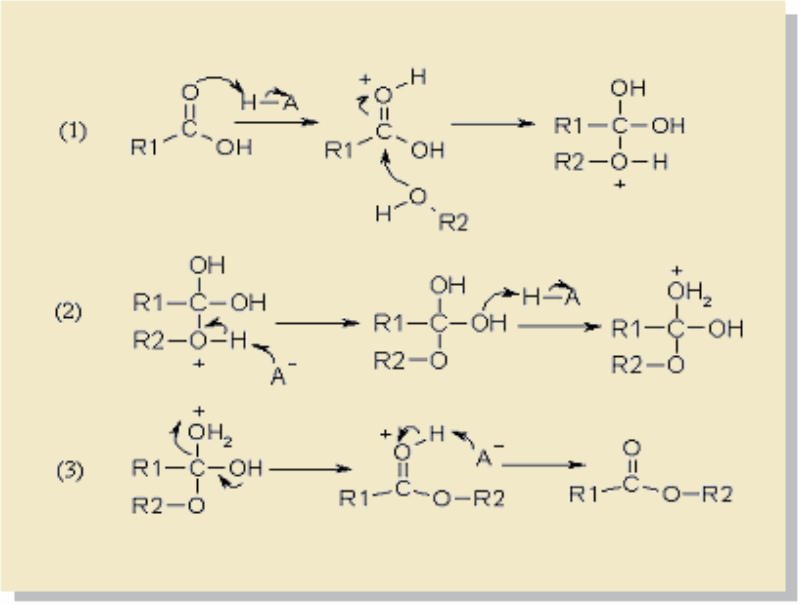


Figura 6. Esquema de la reacción de esterificación.

Existen numerosos procesos para llevar a cabo esta reacción, pero el más común consiste en el calentamiento de una mezcla de alcohol y del ácido graso correspondiente con ácido sulfúrico. Éste último, a la vez que como catalizador actúa como sustancia higroscópica absorbiendo el agua generada en la reacción. Se puede sustituir este ácido por fosfórico concentrado.

Este proceso se conoce como esterificación de Fisher, y su mecanismo aparece en la Figura 7 (Vollhardt y Schore, 1998).



(1) Protonación del oxígeno del carbonilo y ataque nucleofilo del alcohol.
(2) Pérdida y ganancia de un protón.
(3) Pérdida de agua y del protón para dar el éster.

Figura 7. Mecanismo de esterificación ácida de ácidos grasos.

Al igual que en el caso de la transesterificación existen numerosos catalizadores, tanto homogéneos como heterogéneos, de los que ya se ha hablado anteriormente.

5.3.3. Proceso combinado

Vistos los procesos de transesterificación y esterificación, se puede pensar en la posibilidad de realizar un proceso que combine ambos en un solo paso. Debido a las reacciones laterales que se explicaron en la catálisis básica, se descarta el uso de un catalizador de esta naturaleza para aquellas materias primas con un porcentaje de ácidos grasos mayor del 2%.

Sin embargo, un ácido puede catalizar ambas reacciones sin producir esas reacciones indeseables. El tiempo de reacción vendría controlado por la etapa de transesterificación, que es la más lenta, pero el ahorro de tiempo y recursos si se hace el proceso combinado es notable. Por estos motivos en el presente proyecto se seguirá este proceso en un solo paso, utilizando como catalizador ácido clorhídrico.

6. Situación actual de la producción de biodiésel.

Según datos expuestos por la European Biodiesel Board, la producción de biodiésel en la UE en el año 2007 superó los 5,7 millones de toneladas, lo que supuso un incremento del 16,8% frente al año anterior. (www.ebb-eu.org). La **Figura 8** recoge dicho crecimiento así como los principales países productores:

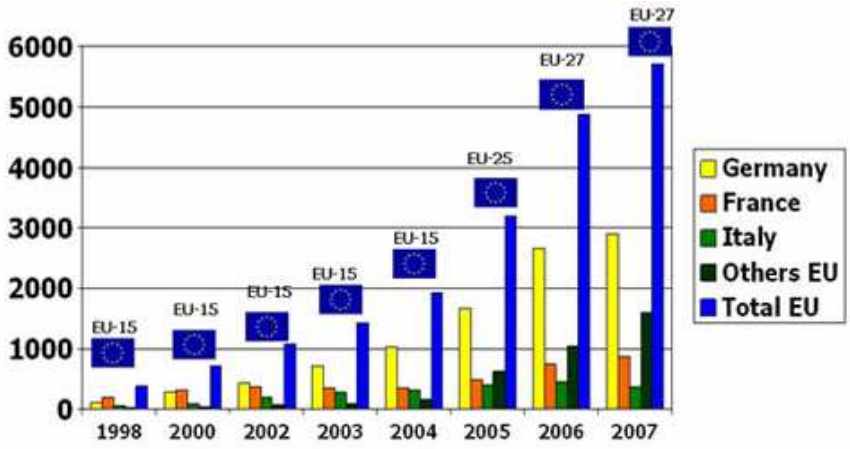


Figura 8. Evolución de la producción de biodiésel en la UE

Tal y como puede observarse, Alemania es el mayor productor en la UE acaparando casi la mitad de la producción total. España, junto con el Reino Unido y Eslovaquia, es el país en el que el sector del biodiésel ha experimentado el mayor crecimiento en los últimos años, aunque como se verá a continuación esto no significa que la situación sea buena.

El sector del biodiésel en España se encuentra actualmente en un momento crítico. La mitad de las treinta y seis plantas abiertas en los últimos años están completamente paradas, tras haberse invertido más de 600 millones de euros y creado unos 1.000 empleos, mientras que la mayoría de las que siguen operando lo hacen muy por debajo de su capacidad. El ratio medio de producción/capacidad se situó en 2008 en el 9%, lo que resulta incompatible con la supervivencia del sector. La importación de biodiésel subvencionado y con dumping (práctica de comercio por la cual una empresa fija un precio inferior para los bienes exportados que para los mismos bienes vendidos en el país) de Estados Unidos y otros países, que se hizo en 2008 con el 71% del mercado español (51% en 2007), ha sido uno de los principales factores que ha provocado esta crisis.

"Cuando el biodiésel que se consume mayoritariamente en España viene del extranjero, aprovechándose de subvenciones y dumping, mientras las plantas productoras del país agonizan, es evidente que la política española de biocarburantes está fallando gravemente", asegura Roderic Miralles, Presidente de APPA Biocarburantes. (www.appa.es)

Los principales elementos que configuran el panorama del biodiésel en España al finalizar el año 2008 son los siguientes:

- Existen 36 plantas de producción de biodiésel en España con una capacidad total instalada que supera los dos millones de toneladas/año (Tabla 4). En 2008 entraron en funcionamiento 12 nuevas plantas que incrementaron la capacidad instalada en 1,2 millones de toneladas, lo que supone multiplicarla por 2,5.

- A pesar del significativo incremento en la capacidad instalada, la producción de biodiésel en España creció sólo un 28% respecto al año anterior, situándose en algo más de 190.000 toneladas. Ello supone un nuevo record negativo del ratio producción/capacidad, que se situó en el 9% en 2008 (anexo VI). Dos terceras partes de las plantas estuvieron paradas o produciendo por debajo del 10% de su capacidad (anexo IX).

- Todo ello mientras el consumo de biodiésel en automoción en España se dobló el año pasado hasta situarse, según datos de CORES, en más de 586.000 toneladas. El 71% de este consumo se satisfizo con biodiésel importado, cuando en 2007 dicha cuota de mercado fue del 51%.

Actualmente existen en España 36 plantas de biodiésel construidas, que serán 54 en 2009 (18 más), con una capacidad de producción de más de 2 millones de toneladas al año (www.appa.es). En la Tabla 4 se muestran los datos más representativos de las plantas presentes en España:

Tabla 4. Plantas de producción de biodiésel en producción en España en el año 2008.

EMPRESA	LOCALIDAD	PROVINCIA	CAPACIDAD (t)
Infinita Renovables	Castellón	Castellón	300.000
Bioenergética Extremeña 2020	Valdetorres	Badajoz	250.000
Bio-Oils Huelva I	Palos de la Frontera	Huelva	250.000
Combustibles Ecológicos Biotel	Barajas de Melo	Cuenca	150.000
Biocarburantes CLM	Ocaña	Toledo	105.000
Biodiésel Aragón	Altorricón	Huesca	100.000
Linares Biodiésel Technology	Linares	Jaén	100.000
Biocom Energía	Algemesí	Valencia	75.000
Biodiésel Caparroso	Caparroso	Navarra	70.000
Biocombustibles de Cuenca	Cuenca	Cuenca	50.000
Ecoproductos Cast. La Mancha	Montalbo	Cuenca	50.000
Bionet Europa	Reus	Tarragona	50.000
Entabán Biocomb. Guadalquiv.	Sevilla	Sevilla	50.000
Biodiésel Castilla la Mancha	Santa Olalla	Toledo	45.000
Biodiesel de Andalucía 2004	Fuentes de Andalucía	Sevilla	40.700
Combunet	Monzón	Huesca	40.000
Energía Gallega Alternativa	Cerceda	A Coruña	40.000
Bionor Berantevilla	Berantevilla	Álava	35.320
Biocarburantes de Galicia	Begonte	Lugo	35.000
Grupo Ecológico Natural	Llucmajor	Baleares	33.000
Stocks del Vallès	Montmeló	Barcelona	31.000
Hispanergy	Puertollano	Ciudad Real	25.000
Entabán Biocomb. del Pirineo	Alcalá de Gurrea	Huesca	25.000
Biocarburantes Almadén	Almadén	Ciudad Real	21.000
Biocarburantes de Castilla	Valdescorriel	Zamora	20.000
Diesol	Alcalá de Henares	Madrid	15.000
Bioteruel	Albalate del Arzobispo	Teruel	10.000
Comb. Ecol. Mediterráneo	Elda	Alicante	10.000
Albabío Andalucía	Níjar	Almería	6.000
Biocarburos de Almanzora	Cuevas de Almanzora	Almería	6.000
Biodiésel Carburantes	Carranque	Toledo	6.000
Bercam	Los Yébenes	Toledo	6.000
Bionorte	San Martín del Rei	Asturias	5.000
Biocomb. De Castilla y León	San Cristóbal de Entrevías	Zamora	6.000
Transportes Ceferino Martínez	Vilafant	Girona	5.000
Asthor Biodiésel	Gijón	Asturias	4.000
		TOTAL	**2.070.020**

Ya se ha comentado que la pésima situación del sector se debe a la fuerte presencia de importación de biodiésel, principalmente de Estados Unidos. El biodiésel estadounidense se beneficia de una importante subvención fiscal en origen (300 $/tonelada), lo que ha permitido que se venda en la Unión Europea por debajo de su precio de origen (dumping).

Por este motivo, y tras nueve meses de investigación, la Comisión Europea ha adoptado medidas arancelarias para contrarrestar el efecto de estas importaciones y combatir así la subvención en origen y el dumping. Estas medidas tienen carácter provisional, ya que sólo estarán vigentes por un período de cuatro meses (a partir del 13 de marzo del presente año). En cualquier caso son de aplicación automática, a partir de su entrada en vigor, en todos los puestos fronterizos aduaneros de la Unión Europea (www.appa.es).

Aunque el sector entiende que estas medidas arancelarias son suficientes como para tener un efecto disuasorio sobre las importaciones, Roderic Miralles cree que *"si no se adoptan medidas legales de ámbito interno en España nos podemos encontrar con que el biodiésel subvencionado por Indonesia, Malasia o Argentina sustituya totalmente al que llega de Estados Unidos y, por ende, estos aranceles no sirvan en última instancia para casi nada".*

Llegados a este punto, los productores de biodiésel de España miran al futuro con un poco más de optimismo, aunque con ciertas reservas a la espera de ayudas y medidas definitivas, que les permitan por fin ser competitivos en un mercado muy prometedor sí finalmente se logra una competencia adecuada.

En cuanto a aplicación, el biodiésel siempre se asocia con automóviles, pero se empieza a hablar con fuerza de su uso como combustibles para aviación, tras el éxito del primer vuelo con biocarburantes que tuvo lugar el 14 de febrero de 2008 por parte de la compañía Virgin. El avión que lo realizó fue de Londres a Ámsterdam utilizando, en parte, un biocarburante derivado de una mezcla de aceite de cacahuete y de palma de *babassu* brasileña.

En lo que a este proyecto respecta, hay que destacar que las grandes empresas fabricantes de aviones ven en los biocombustibles de tercera generación la fuente de origen del biodiésel a utilizar. El Director gerente de Boeing, Billy Glover, ha manifestado su deseo de que los biocarburantes estén certificados en 2013, y estima que las microalgas serán la materia principal de producción de éstos en un plazo de 10 a 15 años. En la misma línea se sitúan las declaraciones de Sir Richard Branson, presidente de Virgin, quién ha expresado que "las algas serán con toda seguridad, la materia prima fundamental en la fabricación de carburantes para aviación", y que se había planteado crear una rama de su empresa dedicada a la producción de biodiésel (www.appa.es).

Capítulo III. Objetivos.

El presente trabajo se enmarca dentro de una línea de investigación sobre producción de biodiésel de tercera generación obtenido a partir de microorganismos oleaginosos (hongos, bacterias, levaduras, microalgas).

El **objetivo general** de la presente investigación consiste en la búsqueda de nuevas materias primas adecuadas para la producción de biodiésel y la evaluación de su uso potencial en los procesos de producción de este biocombustible.

Los **objetivos específicos** que se persiguen en este trabajo son los siguientes:

- Caracterización de la fracción lipídica contenida en la biomasa de una estirpe modificada genéticamente del hongo *Mucor circinelloides*. El hongo liofilizado procede del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia.

- Estudio de la influencia de la temperatura, concentración de catalizador y relación másica del disolvente en el proceso de producción de biodiésel en una única etapa mediante catálisis ácida con HCl. Como variables dependientes del proceso se seleccionarán la pureza en ésteres metílicos del biodiésel producido y el rendimiento del proceso.

- Optimización de las condiciones de operación anteriormente señaladas mediante la aplicación de un diseño factorial de experimentos y de la aplicación de la metodología de superficies de respuesta.

Capítulo IV. Metodología experimental.

En este capítulo se recogen las instalaciones y los procedimientos llevados a cabo en el desarrollo así como todos los materiales, materias primas y reactivos utilizados en el transcurso de la experimentación.

1. Instalaciones.

En este apartado figuran los diferentes tipos de instalaciones que fueron necesarias para realizar el proceso de obtención de biodiésel a partir de microorganismos.

1.1. Equipos de extracción.

Durante el desarrollo del proceso de extracción de los lípidos contenidos en la biomasa se han empleado los siguientes aparatos:

- Baño de ultrasonidos: Branson 5510.
- Matraz kitasato de 250 ml y filtro de placa
- Estufa: Heraeus, Function line.

1.2. Equipos de reacción de obtención de biodiésel.

El reactor en el que se llevaron a cabo las reacciones es de la casa Büchlglaususter, modelo Miniclave Drive “cyclone 075”, condiciones de operación máximas de 10 bar/145 psi/200ºC, recipiente de cristal de 100 ml, y conexiones de 1/4’’ para indicador de presión, disco de ruptura, válvula de control, medidor de temperatura, etc. Agitador integrado con rango de operación de 100-3000 rpm.

Para el control de temperatura se utilizó una placa calefactora con baño termostatizado equipada con un termómetro digital y agitación magnética. La placa es de IKA, modelo RET Basic.

1.3. Equipos de separación de los productos de reacción.

Para el proceso de separación se utilizaron embudos de decantación de 250 ml de capacidad.

2. Materiales.

Los materiales empleados se dividen en materias primas, catalizadores, disolventes utilizados en la extracción, reactivos utilizados en los análisis y patrones empleados en los calibrados.

2.1. Materias primas.

Para este trabajo se empleó como materia prima biomasa de la siguiente estirpe del microorganismo *Mucor circinelloides*: Estirpe MU200-4, que es una cepa mutante con la propiedad de no acumular carotenos, crecida en medio líquido y en presencia luz con una concentración de glucosa de 20 g/l. Esta estirpe fue proporcionada por el grupo de Genómica y Biotecnología Molecular de Hongos de la Universidad de Murcia, y ha sido modificada genéticamente con el fin de:

- reducir el contenido en carotenos
- aumentar la acumulación total de lípidos,
- aumentar la fracción lipídica saponificable,

El metanol empleado en la reacción es el principal reactivo. Es de la casa Scharlab, su pureza es de 99,98 %, su peso molecular es 32,04 g/mol y su densidad 0,79 g/ml.

2.2. Reactivos y catalizadores.

Para catalizar esta reacción directa de obtención de ésteres metílicos se empleó HCl disuelto en metanol, de la casa Fluka y con una concentración de 1,25 M.

2.3. Disolventes usados en la extracción.

Durante la extracción se utilizaron los siguientes disolventes recogidos en la Tabla 5:

Tabla 5. Disolventes empleados en la extracción.

Nombre	Casa comercial	Pureza
Cloroformo	Scharlab	99,47%
Metanol	Scharlab	99,98%

2.4. Reactivos utilizados en los análisis.

Los reactivos empleados en las distintas técnicas de análisis se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6. Reactivos para los análisis.

Nombre	Casa comercial	Pureza
Acetato cúprico	Aldrich	98%
Ácido acético glacial	Scharlab	99,80%
Benceno	Scharlab	99,90%
Etanol	Scharlab	96%
Dietileter	Scharlab	99%
Hidróxido potásico	Scharlab	85%
n-Heptano	Sigma	>99%
n-Hexano	Scharlab	96%
Piridina	Aldrich	>99%
Yodo sólido	Scharlab	99,8%

2.5. Patrones empleados en los calibrados.

Los patrones de calibrado empleados en el presente proyecto de investigación se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7. Patrones para los calibrados.

Nombre	Casa comercial	Pureza
Ácido oleico	Sigma	99%
β-caroteno	Fluka	97%
Colesterol	Fluka	>99%
Oleato de metilo	Sigma	99%
Retinol	Fluka	>99%
Trioleína	Sigma	>99%

3. Métodos de análisis.

3.1. Cromatografía de capa fina.

La cromatografía de capa fina, o “Thin Layer Chromatography” (TLC), es una técnica analítica sencilla, rápida y económica que proporciona una rápida respuesta sobre la composición de una mezcla. La placa donde tiene lugar es una lámina de cristal, metal o plástico recubierta con una fina capa de un sólido adsorbente (normalmente sílice o alúmina). Una pequeña cantidad de muestra se inyecta cerca de la parte inferior de la placa. Ésta se coloca en un recipiente especial con una determinada mezcla de disolventes en el fondo de manera que la mezcla moja únicamente la parte inferior de la placa, y por capilaridad va ascendiendo lentamente por ella.

Según asciende el eluyente, se establece un equilibrio para cada componente de la muestra entre sus moléculas adsorbidas en el sólido y las que permanecen en disolución. En principio, los componentes diferirán en solubilidad y en la fuerza con la que se adsorban, avanzando a diferente velocidad cada uno de los componentes en su ascenso por la placa. Cuando el eluente alcanza la parte superior de la placa, se saca ésta del recipiente, se seca, y se procede a su revelado. La técnica utilizada para el revelado en este proyecto consiste en exponer la placa a vapores de yodo.

Seleccionando adecuadamente los disolventes, sus proporciones y los tiempos de elución se logran separar tanto los componentes lipídicos de una estirpe, como los de la mezcla de los productos de reacción del proceso de biodiésel. En el caso estudiado las condiciones se describen en la Tabla 8:

Tabla 8. Condiciones para cromatografía de capa fina.

Fase Móvil	➢ 87 % hexano (v/v)
	➢ 12 % éter etílico (v/v)
	➢ 1 % ácido acético glacial
Inyección	1 µl
Revelador	Yodo

En este trabajo se utilizan placas cromatográficas de aluminio cubiertas de gel de sílice cuyas dimensiones son 20 x 20 cm (MACHEREY-NAGEL, Alugram® SIL G/UV). La muestra se aplica con una micro-jeringa, manteniendo una distancia de separación entre muestras de 2 cm y 1,5 cm al borde inferior de la placa. El tiempo de elución es de aproximadamente una hora y el de revelado, realizado en posición horizontal, de 15 minutos.

Para preparar la muestra para la cromatografía de capa fina se pesó la cantidad de producto obtenida tras la extracción, y se calculó su volumen considerando que todo el lípido es trioleína, de densidad 0,91 g/l. A continuación se adicionó un volumen de n-hexano 11 veces superior al de lípido para diluirlo. Además, para el análisis del producto extraído, se adicionan a la muestra 0,025 g de patrón de ésteres metílicos, que actuarán como patrón interno para el posterior análisis cuantitativo. De la disolución resultante se tomó 1 µl con la microjeringa para inyectarlo en la placa.

El tratamiento del producto de reacción fue el mismo, excepto en la adición del patrón de ésteres, que no es necesario en este caso.

3.1.1. Análisis cualitativo.

Tras el proceso de TLC y su revelado, las manchas correspondientes a cada compuesto aparecen a distintas alturas en la placa. Para identificar los compuestos se comparan estas manchas con las producidas por patrones conocidos, o se recurre a la bibliografía.

En este proyecto, al ser continuación de otro anterior (Martínez, 2007), se siguieron los pasos en él descritos para realizar la inyección de estos patrones y su comparación con las muestras a analizar.

Los patrones empleados en dicho proyecto fueron los siguientes: carotenoides (β-caroteno), éster metílico (oleato de metilo), triglicéridos (trioleína), éster de esterol (éster de colesterol), esterol (colesterol), ácido graso (ácido oleico) y retinoides (retinol).

3.1.2. Análisis cuantitativo.

Además del análisis cualitativo, la técnica de TLC puede ser usada para conocer la composición de la muestra analizada. Esto es así gracias al software UN-SCAN IT gel 6.1. El tamaño e intensidad de las manchas obtenidas tras la TLC es proporcional a la cantidad del compuesto en cuestión en la

muestra inicial, y estos dos parámetros son medidos con ayuda del software anterior que cuantifica el número de píxeles de cada mancha. Para hacer esto se debe digitalizar la placa de TLC tras el revelado.

Una vez digitalizadas las manchas, se usan los calibrados para obtener el porcentaje en peso de la fracción de lípidos extraída y del producto de cada reacción. Para su elaboración se emplearon los patrones descritos en el apartado anterior, con el de ésteres metílicos como patrón interno. Se realizaron en dos rangos de concentraciones: bajas para el biodiésel y altas para los lípidos, llegando a los siguientes resultados:

- Composición lipídica del microorganismo:

$$\frac{A_{AG}}{A_{EM}} = 1{,}516 \cdot \frac{C_{AG}}{C_{EM}} + 0{,}029 \ ; R^2 = 0{,}991$$

$$\frac{A_{TG}}{A_{EM}} = 1{,}512 \cdot \frac{C_{TG}}{C_{EM}} + 0{,}027 \ ; R^2 = 0{,}995$$

$$\frac{A_{C}}{A_{EM}} = 14{,}44 \cdot \frac{C_{C}}{C_{EM}} - 0{,}007 \ ; R^2 = 0{,}990$$

$$\frac{A_{R}}{A_{EM}} = 3{,}737 \cdot \frac{C_{R}}{C_{EM}} + 0{,}057 \ ; R^2 = 0{,}939$$

$$\frac{A_{E}}{A_{EM}} = 3{,}593 \cdot \frac{C_{E}}{C_{EM}} - 0{,}014 \ ; R^2 = 0{,}951$$

$$\frac{A_{EE}}{A_{EM}} = 2{,}469 \cdot \frac{C_{EE}}{C_{EM}} - 0{,}003 \ ; R^2 = 0{,}950$$

- Resultados de reacciones:

$$\frac{A_{AG}}{A_{EM}} = 0{,}842 \cdot \frac{C_{AG}}{C_{EM}} + 0{,}001 \ ; R^2 = 0{,}963$$

$$\frac{A_{TG}}{A_{EM}} = 1{,}016 \cdot \frac{C_{TG}}{C_{EM}} + 0{,}003 \ ; R^2 = 0{,}978$$

Siendo A_i el número total de píxeles calculado con el programa para cada especie, y C_i la concentración en g/ml. El significado de los subíndices es el siguiente: AG: ácidos grasos, EM: ésteres metílicos, TG: triglicéridos, C: carotenoides, R: retinoides, E: esteroles, EE: ésteres de esterol.

El calibrado de los triglicéridos se aplicó igualmente para determinar la concentración de los monoglicéridos y diglicéridos.

Con las áreas calculadas con el UN-SCAN IT gel 6.1 y conocida la concentración de ésteres metílicos (ya que es el patrón interno), se despeja el valor de la concentración para cada compuesto y a partir de ahí se calcula la composición en peso de la muestra.

Los lípidos polares no tuvieron un calibrado específico, calculándose su porcentaje en peso por diferencia hasta cien respecto de la suma de los porcentajes del resto de compuestos. Como se verá más adelante, el porcentaje exacto de fosfolípidos, uno de los componentes de los lípidos polares, sí puede ser calculado con mediante espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP).

Para calcular la composición del biodiésel, se despeja la relación de concentraciones en lugar de la concentración del compuesto. La cantidad de lípidos polares se calcula multiplicando el área de su mancha por el peso del biodiésel obtenido, y dividiendo el resultado entre la suma de las áreas de las manchas del resto de compuestos. Conociendo las relaciones de concentración de los compuestos presentes en cada muestra, y la cantidad de lípidos polares, el último paso es despejar la cantidad de ésteres metílicos de la siguiente expresión:

$$Masa\,biodiésel = \sum_i \frac{m_i}{m_{EM}} \cdot m_{EM} + Masa\ \ lípidos\,polares$$

La relación de concentraciones coincide con la relación de masas.

3.2. Cromatografía de gases.

Para analizar los componentes de la fracción lipídica se recurrió a la técnica de cromatografía de gases, con la que se obtuvo el perfil de los ácidos grasos presentes en dicha fracción.

3.2.1. Perfil de ácidos grasos.

Los ácidos grasos forman un grupo muy heterogéneo, pudiendo encontrarse de forma libre o bien como parte de otros lípidos más complejos, como los mono-, di- y triglicéridos o los fosfolípidos, esfingolípidos y glucolípidos.

El perfil de ácidos grasos se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en la norma UNE EN 14103.

Para realizar el perfil se utilizó como muestra el producto de una de las reacciones de transesterificación (Tabla 22, reacción 14), el cual contenía los ésteres metílicos formados a partir de los ácidos grasos presentes en la materia prima. Se escogió el producto de la reacción indicada por su elevada pureza.

Para preparar la muestra se pesaron 0,05 g de la misma y se diluyeron en 1 ml de n-heptano. A continuación, se procedió a la inyección de 1 µl la disolución resultante en un cromatógrafo de gases de Varian, modelo CHROMPACK CP-3800, con detector de ionización de llama (FID) y columna capilar de Teknokroma, modelo ZEBRON ZB-WAX, cuyas dimensiones son las siguientes: 30 mm x 0,32 mm y un espesor de película (DF) 0,25 µm. Las condiciones de trabajo de este equipo son las detalladas en la Tabla 9:

Tabla 9. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.

Condiciones del cromatógrafo	
Relación de split	1:50
Cantidad inyectada	1 µl
Temperatura horno	210ºC
Temperatura inyector	250º C
Temperatura detector	250º C
Caudal de gas por columna	1 ml/min
Caudal de aire	300 ml/min
Caudal de H_2	30 ml/min
Caudal de make-up	25 ml/min

Para la cuantificación de los diferentes ácidos grasos se empleó como patrón interno el éster metílico del ácido heptadecanoico.

3.3. Determinación de glicéridos.

Para determinar con mayor precisión la cantidad de mono-, di- y triglicéridos en los lípidos extraídos se realizó un análisis cromatográfico de acuerdo con el procedimiento descrito en la norma UNE EN 14105.

El equipo empleado es un cromatógrafo de gases de Varian, modelo CHROMPACK CP-3800, con detector de ionización de llama (FID) y columna capilar de Teknokroma, modelo ZEBRON ZB-WAX, con las siguientes dimensiones: 30 mm x 0,32 mm y un espesor de película (DF) 0,25 µm. Las condiciones de trabajo son las descritas en la Tabla 9.

En la norma UNE EN 14105 se detalla el proceso de preparación de la muestra, que requiere una derivatización previa y la adición de un patrón interno. Tras la inyección de la muestra preparada y pasados los 35 minutos que dura el análisis se obtuvo un cromatograma, con el que por comparación con patrones de mono-, di- y triglicéridos se identificaron los compuestos y su concentración.

3.4. Espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP).

La técnica de espectrometría de emisión atómica por ICP se utilizó para determinar la cantidad de fósforo de los lípidos extraídos, dato con el que se cuantificarán los fosfolípidos. Estos compuestos contienen una molécula de ácido fosfórico unida a otra de glicerol mediante un enlace éster. A su vez el ácido puede enlazar con una base, aminoácido o alcohol. El resultado es una molécula con una parte polar (el ácido fosfórico), y otra apolar (la cadena carbonada).

Debido a este carácter polar, la TLC no es adecuada para cuantificar estas moléculas, ya que los disolventes utilizados como eluyentes son apolares. Por esta razón se empleó la espectrometría de emisión atómica, que además presenta un límite de concentración bajo.

Se utilizó un equipo Varian, modelo Vista AX CCD Simultaneous ICP-AES. Para la preparación de la muestra se siguieron los siguientes pasos:

1. Preparación de la disolución madre, mediante la dilución de 50 mg de fracción lipídica extraída en 10 g de queroseno.
2. Preparación de una segunda dilución, tomando 0,10 g de la disolución madre a los que se adicionaron 8,90 g de queroseno y 0,10 g de Itrio, que actúa como patrón interno.

Finalmente se realizó un calibrado en el rango de concentración estudiado y se midió la cantidad de fósforo en la muestra de lípidos. Con este dato se calculó el porcentaje de fosfolípidos, suponiendo un peso molecular promedio igual al de la fosfatidilcolina (760,09 g/mol).

4. Desarrollo experimental.

El desarrollo experimental del proceso de producción de biodiésel a partir de *Mucor circinelloides* constó de varias etapas.

- Extracción de los lípidos contenidos en las cepas de microorganismos.
- Una vez extraídos, se analizaron y caracterizaron mediante las técnicas de análisis descritas anteriormente.
- Se llevó a cabo un diseño factorial de experimentos para estudiar distintas variables implicadas en la reacción de obtención de ésteres metílicos.

4.1. Extracción de la fracción lipídica.

El método de extracción utilizado en este proyecto es fruto de una investigación anterior en la que se estudiaron distintos sistemas para extraer lípidos, siendo el más interesante el que se muestra a continuación:

- Cloroformo-metanol 2:1 (Szczęsna-Antczak *et al*., 2006; Zhu *et al.*, 2002; Somashekar *et al*., 2001)

Este procedimiento fue el que condujo a resultados más satisfactorios, al conseguir un mayor porcentaje de extracción y menores pérdidas que los demás, motivo por el cual será el utilizado en este trabajo.

El cloroformo y el metanol son disolventes polares que disuelven con facilidad a los lípidos contenidos en el microorganismo liofilizado. Para su extracción se siguieron los siguientes pasos:

1. Se pesa aproximadamente 500 mg de microorganismo liofilizado en un tubo de centrifuga tarado completamente limpio.
2. Se adicionan 20 ml de la mezcla cloroformo:metanol (2:1) y agitación manual durante 30 segundos. Después, se sumerge el tubo de centrífuga en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos.
3. Se filtra a vacío en un matraz kitasato. Se hace un lavado del microorganismo del filtro con 20 ml de la mezcla de disolventes en la misma proporción que en el punto 2.
4. Tras el último lavado se trasvasa el contenido del kitasato a un matraz esférico de 100 ml previamente tarado, y se eliminan los disolventes de la fase líquida en un rotavapor. La temperatura del baño se fija en 70ºC y se hace vacío (400 mbar aproximadamente).
5. El sólido se seca en una estufa a 90ºC hasta peso constante (aproximadamente a los 900 minutos).

Hecho lo anterior, se procede a pesar el sólido y los lípidos para el cálculo posterior del rendimiento de la extracción.

4.2. Caracterización de la fracción lipídica.

Tras la extracción de los lípidos se procedió a su análisis con los métodos descritos en el apartado 3, cuyos objetivos se recuerdan a continuación:

- **Cromatografía de capa fina**: identificación de compuestos y su porcentaje másico en la muestra

- **Cromatografía de gases**: obtención del perfil de ácidos grasos

- **Espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP)**: determinación de la cantidad de fósforo, para conocer el porcentaje en fosfolípidos

4.3. Reacción de obtención de biodiésel.

Según estudios previos se han descrito dos métodos para obtener biodiésel a partir de microorganismos (Lewis *et al.*, 2000)

- Extracción de los lípidos y posterior reacción. Esta es la forma más empleada en la bibliografía (Nagle y Lemke, 1990; Miao y Wu, 2006; Xu et *al.*, 2006)
- Proceso directo de extracción-reacción en un mismo paso. Este proceso solo ha sido descrito en la literatura (Lewis et al, 2000) y realizado en investigaciones anteriores del grupo (Sádaba, 2007).

El primero ha sido el método más empleado y descrito en bibliografía, pero en el presente trabajo se ha optado por el segundo. Las razones de esta elección se encuentran en estudios anteriores que demuestran que con este método se consiguen mayores rendimientos, con una duración menor y menor número de etapas a seguir en el proceso.

El procedimiento llevado a cabo es el siguiente:

1. Se añaden al reactor 1,75 g de microorganismo. Se decidió emplear esta cantidad de materia prima tras valorar aspectos como la buena agitación del medio de reacción y la cantidad de materia prima disponible para la realización de los experimentos.
2. Se adicionan las cantidades pertinentes de reactivo y catalizador para cada reacción. Las reacciones llevadas a cabo difieren en sus condiciones a fin de evaluar el efecto de distintas variables, como se detallará en capítulos posteriores.
3. Se cierra correctamente el reactor y se presuriza con nitrógeno hasta 1,5 bar.
4. Para medir la temperatura tanto del baño de silicona (que se calienta con una placa calefactora y servirá de calefacción al reactor) como del interior del reactor, se colocan sendos termómetros, fijándose el setpoint del del baño en la temperatura deseada.
5. La agitación del interior del reactor se fija en aproximadamente 900 r.p.m.
6. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se mantienen las condiciones constantes durante una hora
7. Pasado este tiempo, se para la agitación, se retira el baño de silicona, y se libera la presión lentamente. Una vez ha disminuido la temperatura, se abre el reactor y se trasvasa su contenido a un recipiente de vidrio con tapón de plástico.

En caso de no poder tratar inmediatamente el producto, se conservará refrigerado en este recipiente.

Tras la reacción, obtenemos el producto mezclado con la biomasa de microorganismo empleada. Como se ha comentado en este trabajo, además de ésteres metílicos en la transesterificación se obtiene glicerina, y es posible que parte del catalizador ácido no haya reaccionado.

Por tanto hay que someter al producto de reacción a un tratamiento posterior, que se describe a continuación:

1. Filtración a vacío para separar la biomasa de microorganismo. Se lava el recipiente de vidrio con 40 ml de n-hexano:dietileter, en proporción 80:20%, y se filtra también para lavar la biomasa presente en la placa filtrante.
2. Se trasvasa lo filtrado a un embudo de decantación de 250 ml y se adicionan 50 ml de agua desionizada. Se agita la mezcla y se espera unos minutos hasta que se diferencien con claridad dos fases, una orgánica en la parte superior y otra acuosa en la inferior.
3. A continuación se pasa la fase acuosa a otro embudo igual que el anterior (la fase orgánica se conserva en el primer embudo), y se le añaden 50 ml de n-hexano y dietileter, en la misma proporción que en el punto 1. Se agita y espera hasta la buena separación de las fases.
4. Se repite el paso 3. Cuando se tengan las dos fases se elimina la acuosa, y se juntan las tres fases orgánicas presentes en cada embudo en uno solo.
5. Se añaden a ese embudo 50 ml de agua Mili Q, se agita y se espera.
6. Se desecha la fase acuosa y se repite el paso 5.
7. Tras retirar nuevamente la fase acuosa, se trasvasa la fase orgánica resultante a un matraz esférico de 250 ml.

Esta fase orgánica está formada por el producto de reacción y los disolventes empleados en la extracción que se acaba de detallar. Para eliminar estos disolventes utilizamos un rotavapor con vacío, con el que calentamos el contenido de matraz hasta 70ºC. A esta temperatura y trabajando a vacío se evaporan los disolventes, quedando al cabo de unos minutos el producto de reacción únicamente.

Este producto se pasa después (con ayuda de una pipeta) a un tubo de plástico previamente pesado, que se volverá a pesar para calcular por diferencia la cantidad de producto obtenida.

4.4. Caracterización de los ésteres metílicos.

Mediante la técnica de cromatografía de capa fina se analizó la composición de la fase éster formada. Se determinaron las concentraciones de ésteres metílicos, ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos y el resto de componentes no saponificados como fue descrito en el apartado de Métodos de Análisis.

Los resultados obtenidos con los distintos análisis se contrastaron con los parámetros recogidos en la Normativa Europea EN 14214 para ésteres metílicos (Tabla 1).

5. Diseño factorial de experimentos.

Para estudiar la influencia de determinadas variables en la reacción de obtención de biodiésel con HCl como catalizador, se ha seguido la siguiente metodología:

En primer lugar se realiza un diseño a dos niveles, lo que significa que los datos se ajustarán a un modelo lineal. A fin de comprobar si el ajuste es correcto, se calcula la significación de la curvatura mediante la repetición de experimentos en el punto central, calculando después el error asociado, conocido como intervalo de confianza de la curvatura.

Si la curvatura resultante es significativa, los datos experimentales no se ajustan a un modelo lineal, lo que hace necesaria la ampliación de los niveles para conseguir un modelo de segundo orden. En este trabajo se ha empleado un diseño central compuesto centrado en las caras.

Una vez hallado el modelo matemático que describa el comportamiento de los datos experimentales, se procede a la optimización de las respuestas. Esta metodología se detalla con precisión en el *Anexo I*.

Capítulo V. Resultados y discusión.

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en las etapas de extracción de los lípidos contenidos en los microorganismos, su caracterización posterior, y los resultados del diseño experimental llevado a cabo.

1. Extracción de los lípidos del microorganismo.

Tras las extracciones realizadas con el método explicado en el capítulo anterior, apartado 4.1, se han obtenido los resultados del contenido en lípidos del microorganismo *Mucor circinelloides*.

En la Tabla 10 se muestran todos los resultados del balance de materia para cada una de las cuatro extracciones realizadas, incluyendo la cantidad microorganismo de partida, la de lípidos extraídos, la de biomasa libre de lípidos y las pérdidas durante las extracciones:

Tabla 10. Resultados de las extracciones de la fracción lipídica.

Extracción	Masa inicial (g)	Lípido (g)	% Lípido	Biomasa (g)	% Biomasa	% Pérdidas
1	0,5004	0,1567	31,31	0,3328	66,51	2,18
2	0,4999	0,137	27,41	0,3441	68,83	3,76
3	0,5010	0,1424	28,42	0,3557	71,00	0,58
4	0,5005	0,1408	28,13	0,3502	69,97	1,90

A modo de resumen se exponen en la Tabla 11 los principales datos de la tabla anterior, promediados y con su error asociado:

Tabla 11. Datos promediados de los resultados de las extracciones.

Lípido (%)	Biomasa (%)	Pérdidas (%)
28,8 ± 1,5	69,1 ± 1,7	2,1 ± 1,1

Como se comentó previamente (capítulo IV, apartado 2.1) la cepa de *Mucor circinelloides* empleada en este trabajo está modificada genéticamente, a fin de evitar la acumulación de carotenos y favorecer así la acumulación de lípidos. Además se ha desarrollado en medio líquido y en presencia de luz, con una concentración de glucosa de 20 g/l.

Para ver el efecto de la mutación provocada se procederá a comparar esta cepa con la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones, excepto el medio de cultivo, que era un sólido (Martínez, 2007):

Tabla 12. Datos de la cepa silvestre de *Mucor circinelloides*.

Lípido (%)	Biomasa (%)	Pérdidas (%)
19,7 ± 1,1	76,7 ± 2,8	1,5 ± 0,6

Existe una diferencia significativa entre el cultivo en medio sólido y líquido, siendo éste último el más favorable para la acumulación de lípidos (Martínez, 2007). Sin embargo se han empleado los resultados de esta cepa silvestre por ser la desarrollada en condiciones más parecidas a la cepa mutante, sobre todo en lo que a presencia de luz se refiere, ya que es un requisito necesario para que se exprese el gen que permite la síntesis de carotenos. Así se podrán comparar ambas cepas en este aspecto.

Se aprecia por tanto un aumento significativo de la fracción lipídica en la cepa modificada, lo que se confirmará posteriormente con los resultados de TLC, se puede afirmar que la mutación ha sido positiva para conseguir una mayor acumulación de lípidos.

2. Caracterización de la fracción lipídica.

Antes de comenzar con las reacciones, se realiza un análisis de la composición de los lípidos extraídos, que permitirá conocer el tipo de materia prima con la que se trabaja.

2.1. Determinación de la composición en lípidos por TLC.

Previamente a valorar los resultados de la cromatografía, se describirán los compuestos que encontraremos en el cromatograma:

- Lípidos insaponificables

Se detectan carotenoides, esteroles, tocoferoles y retinoides. Con este tipo de lípidos no se puede producir ésteres metílicos, pero dan lugar a reacciones secundarias que impurifican el producto de reacción.

- Lípidos saponificables

Este tipo de compuestos es el que da lugar a la formación de ésteres metílicos. Se aprecian en el cromatograma ésteres de esterol, triglicéridos, ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y lípidos polares. Estos últimos no son afines al eluente, por lo que permanecerán en el lugar de inyección de la muestra. Son un grupo de lípidos heterogéneo (fosfolípidos, esfingolípidos y glucolípidos) que en su estructura tienen uno o varios ácidos grasos que pueden convertirse en ésteres metílicos.

En la Tabla 13 se exponen los resultados obtenidos, entre los que destaca el alto porcentaje de triglicéridos y de lípidos polares. Los valores mostrados son el promedio de tres análisis:

Tabla 13. Composición porcentual de los lípidos extraídos de las estirpes determinada a partir de TLC.

	Tipo de lípido	Contenido (%)
Saponificable	Ácidos Grasos	11,8 ± 0,2
	Triglicéridos	43,6 ± 1,2
	Diglicéridos	2,7 ± 0,3
	Monoglicéridos	2,1 ± 0,2
	Lípidos polares	39,7 ± 1,2
	Ésteres de esterol	0,7 ± 0,2
	Total saponificable	**98,92 ± 1,2**
Insaponificable	Carotenoides	n.d.
	Esteroles y tocoferoles	n.d.
	Retinoides	0,99 ± 0,16
	Total insaponificable	**1,96 ± 0,16**

n.d.: no detectable

Al observar la Tabla 13 es interesante destacar la ausencia de carotenoides así como de esteroles y tocoferoles en esta cepa mutante de *Mucor circinelloides*.

2.2. Perfil de ácidos grasos según cromatografía de gases.

Según se describió en la Metodología experimental, se realizó el análisis de los lípidos por cromatografía de gases y se obtuvo el perfil de ácidos grasos. A partir de estos datos se obtiene la distribución que se muestra en la Tabla 14, donde se indican el nombre, la nomenclatura y la composición de cada ácido detectado:

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos

Ácido graso	Nomenclatura	Contenido (% p/p)
Mirístico	$C_{14:0}$	1,4
Palmítico	$C_{16:0}$	18,8
Esteárico	$C_{18:0}$	3,8
Oleico	$C_{18:1}$	35,9
Linoleico	$C_{18:2}$	11,7
Linolénico	$C_{18:3}$	18,7
Araquídico	$C_{20:0}$	0,2
Behénico	$C_{22:0}$	0,1
Otros		9,4

Los ácidos presentes en mayor proporción son el $C_{16:0}$ y los C_{18}, destacando entre estos últimos el oleico, con un 35,9%. Los C_{18} constituyen la mayor parte de los ácidos existentes en los lípidos extraídos, con un 70,1% respecto del total.

El porcentaje de ácidos monoinsaturados es un factor importante en la producción del biodiésel, ya que cuanto mayor sea este parámetro se obtendrá un biocombustible de mayor punto de fusión. Estos ácidos son el $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{20:0}$ y $C_{22:0}$, y entre todos suman un 24,3%. Los ácidos insaturados representan un 66,3%, y también se detecta un 9,31% de otros compuestos no identificados.

2.3. Perfil de glicéridos.

El otro análisis cromatográfico realizado en este trabajo tuvo por objetivo la cuantificación de los glicéridos de los lípidos extraídos. Se siguieron los pasos de la norma EN 14105 para preparar la muestra y cuantificar la glicerina libre, los mono-, di- y triglicéridos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15

Tabla 15. Porcentaje de glicéridos en el lípido extraído

Compuesto	Contenido (% p/p)
Glicerina libre	0,08
Monoglicéridos	5,1
Diglicéridos	8,8
Triglicéridos	30,2

Los triglicéridos son los glicéridos con mayor porcentaje en la muestra, con un 30,2%, seguidos de los diglicéridos con un 8,8% y por último los monoglicéridos con un 5,1%. La glicerina libre tiene escasa presencia, con menos de un 0,1%.

Al comparar estos datos con los calculados con la técnica de TLC (Tabla 13) se observa que el porcentaje de triglicéridos obtenido es menor, y que los porcentajes de mono- y diglicéridos son mayores.

Sumando el porcentaje de estos tres compuestos obtenido en cada técnica y comparándolos entre sí, se aprecia una diferencia de aproximadamente un 5%. Una posible explicación a lo anterior es que la norma EN 14105 está indicada para el análisis de glicéridos en muestras de ésteres metílicos y en el presente trabajo se ha aplicado a los lípidos extraídos, lo que podría ser la causa de esta diferencia.

No obstante, los resultados sirven para confirmar que la cantidad de triglicéridos es muy superior a la de los mono- y diglicéridos y que estos tres glicéridos tienen una presencia importante en la composición de los lípidos extraídos.

2.4. Espectrometría de emisión atómica por plasma (ICP).

Con este método se determinó la cantidad de fósforo en los lípidos extraídos. En la Tabla 16 se muestra este resultado y el porcentaje de fosfolípidos tanto en la muestra inicial como en la fracción lipídica:

Tabla 16. Contenido en fosfolípidos y en otros lípidos polares.

Fósforo (ppm)	Fosfolípidos (% p/p)	Otros lípidos polares (% p/p)
7234 ± 111	17,77 ± 0,27	21,9 ± 1,2

Observando el porcentaje total de lípidos polares calculado mediante TLC (Tabla 13) se aprecia que éste es mayor que el obtenido para los fosfolípidos. Por tanto y como se comentó anteriormente, no todos los lípidos polares están formados por fosfolípidos, ya que dentro de este grupo se encuentran también esfingolípidos y glucolípidos, cuya suma supone un 21,9% de la masa de la muestra de lípidos extraídos.

3. Diseño experimental.

A continuación se presentarán los resultados más relevantes del diseño experimental. En estos diseños es determinante la correcta elección de los factores y respuestas, así como de sus niveles, y por ello se comentarán en primer lugar.

3.1. Elección de los factores.

Las variables experimentales cuya influencia se desea conocer reciben el nombre de factores. En este trabajo se desea estudiar las siguientes variables:

- **Temperatura de reacción.** Esta variable es muy importante en el aspecto cinético, y además a nivel industrial tiene un gran impacto en la economía del proceso, ya que de ser necesarias calefacción o refrigeración los costes se verán incrementados de forma notoria.

- **Cantidad de catalizador.** La concentración de catalizador es fundamental de cara a alcanzar altas conversiones, e interesa encontrar el valor óptimo para que esto ocurra. Un defecto de catalizador disminuye la conversión pero un elevado exceso complicaría la etapa posterior de purificación del producto obtenido.

- **Cantidad de disolvente.** En este caso el disolvente empleado, el metanol, es también un reactivo, por lo que es positivo que se encuentre ligeramente en exceso para favorecer la formación de productos. No obstante, el volumen de reacción también se controlará con este compuesto, así que se buscará un compromiso entre ambos parámetros.

3.2. Elección de los niveles de los factores.

Los niveles de operación de los factores son los límites inferior y superior de su rango de estudio. A continuación se exponen dichos niveles para cada uno de los factores descritos en el apartado anterior:

- **Temperatura.** Usando como referencia el punto de ebullición del metanol, que a presión atmosférica es de 60ºC, se eligieron niveles extremos tanto por defecto como por exceso: 30 y 95ºC. De este modo se comprobará hasta qué punto se puede disminuir o aumentar la temperatura de reacción y seguir consiguiendo altos rendimientos.

- **Cantidad de catalizador.** Esta variable se estudió a partir del porcentaje de catalizador respecto de la biomasa. Resultados de pruebas previas a las reacciones indicaron que una relación del 25% llevaba a altos rendimientos, por lo que se establece un intervalo entre 5 y 45%.

- **Cantidad de disolvente.** Sobre la base de experimentos preliminares se estableció una relación másica metanol:microorganismo en el intervalo 15-45.

Cabe destacar que el resto de condiciones de operación se mantuvo constante. La velocidad de agitación fue de 900 r.p.m. con el fin de homogeneizar la mezcla. El tiempo de reacción se fijó en una hora, y la presión fue ligeramente superior a la atmosférica (P =1,5 bar).

3.3. Elección de las respuestas.

Se llama respuestas a las variables que se quieren medir, es decir, a aquellas variables dependientes de los factores. Se eligieron las siguientes:

- **Pureza del biodiésel**. En este caso se entiende por pureza la concentración de ésteres metílicos en el biodiésel. Se calcula mediante TLC. Para el cumplimiento de la Normativa Europea EN 14214, esta pureza deberá ser igual o superior al 96,5%.

- **Rendimiento en peso del biodiésel**. Se relacionará la cantidad de ésteres metílicos del producto obtenido con la masa de microorganismo empleada en cada reacción. De este modo se podrá observar en qué condiciones se extrae y reacciona la mayor cantidad de lípidos en el proceso de extracción-reacción en un solo paso.

3.4. Obtención del modelo de primer orden.

Para el estudio del comportamiento de las distintas variables, ser procede en primer lugar a la aplicación de un modelo de primer orden. Con objeto de comprobar si las respuestas se ajustan o no a un modelo lineal, se calculará la curvatura de cada una de ellas.

I. Planificación de los experimentos.

Para la planificación de esta parte del trabajo se ha seguido la estructura de un diseño factorial a dos niveles. De este modo los experimentos se pueden agrupar en las dos etapas propias del diseño, que son:

- Diseño factorial: 2^k experimentos
- Repetición de experimentos en los puntos centrales: cuatro experimentos.

La primera de estas etapas se desarrolla considerando los factores descritos anteriormente: temperatura de reacción, relación másica de catalizador y relación másica de disolvente. Por tanto el valor de k será igual a 3 en este caso, lo que supone un total de 8 experimentos.

Los datos del diseño se muestran en la Tabla 17, en la que aparecen los valores en escala natural y de forma codificada (+1 para nivel superior, -1 para nivel inferior y 0 para nivel central):

Tabla 17. Matriz experimental con niveles en escala natural y codificados.

Reacción	T (ºC)	C (%)	S (p/p)	X_T	X_C	X_S
1	95	45	45	+1	+1	+1
2	95	45	15	+1	+1	-1
3	35	5	45	-1	-1	+1
4	35	45	15	-1	+1	-1
5	95	5	45	+1	-1	+1
6	35	45	45	-1	+1	+1
7	95	5	15	+1	-1	-1
8	35	5	15	-1	-1	-1
9	65	25	30	0	0	0
10	65	25	30	0	0	0
11	65	25	30	0	0	0
12	65	25	30	0	0	0

Nota: T: temperatura de reacción; C: porcentaje de catalizador respecto biomasa; S: relación másica metanol/biomasa. Los subíndices T, C y S hacen referencia a estos tres factores respectivamente.

II. Resultados del modelo de primer orden.

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las reacciones anteriores, que fueron realizadas en un orden aleatorio con el objetivo de minimizar errores debidos a posibles tendencias sistemáticas en las variables.

Tabla 18. Resultados experimentales

Reacción	X_T	X_C	X_S	Pureza (%)	Rto en peso (%)
1	1	1	1	98,1	21,9
2	1	1	-1	97,1	20,9
3	-1	-1	1	4,1	0,8
4	-1	1	-1	80,5	16,8
5	1	-1	1	15,6	3,0
6	-1	1	1	67,0	17,2
7	1	-1	-1	18,2	4,4
8	-1	-1	-1	3,9	0,5
9	0	0	0	93,4	24,8
10	0	0	0	93,9	23,2
11	0	0	0	95,0	24,0
12	0	0	0	93,9	25,7

III. Pruebas de significación.

Una vez obtenidos los resultados tras los experimentos, se procede a la realización de un análisis estadístico, con el cual se calcularán los efectos e interacciones principales de cada variable (Ver *Anexo 1*). En la siguiente tabla aparece este análisis para la pureza y el rendimiento en peso del biodiésel:

Tabla 19. Efectos principales e interacciones de la pureza y del rendimiento en peso de biodiésel.

Efectos	Pureza (% peso)	Rendimiento (% peso)
Principales	I_T = 18.34, I_C =75.22, I_S =-3.72	I_T = 3.72, I_C =17.02, I_S =0.08
Interacciones	I_{T-C} =5.48, I_{T-S} =2.92, I_{C-S} = -2.52, I_{T-C-S} = 4,32	I_{T-C} =0.68, I_{T-S} =-0.28, I_{C-S} = 0.62 I_{T-C-S} = 0.58
Significación (Nivel de confianza: 95%)		
Respuesta media	63,4	15,3
Desviación estándar	0,68	1,07
Intervalo de confianza	±1,08	±1,71
Variables significativas	T, C, S, T-C, T-S, C-S, T-C-S	T, C

Comentario: En esta tabla los subíndices T, C y S hacen referencia a la temperatura, porcentaje de catalizador respecto biomasa, y relación másica disolvente/biomasa. Para el cálculo del intervalo de confianza se utilizó un valor del estadístico de Student t = 3,182 (3 grados de libertad y 95% de nivel de confianza.

En la tabla se han destacado únicamente las influencias significativas, que son aquellas que presentan un valor absoluto mayor que el intervalo de confianza obtenido. Por tanto se han descartado como significativas para el rendimiento las influencias del disolvente y de las interacciones entre las variables (T-C, T-S, C-S y T-C-S). Para el caso de la pureza todas las interacciones son significativas, si bien los efectos de la temperatura y el catalizador son mucho más importantes que el resto.

IV. Modelos matemáticos.

A continuación se presentan los resultados experimentales adaptados a un modelo lineal. Se distinguen dos modelos, el estadístico y el industrial, siendo el primero el obtenido a partir de los factores codificados, y el segundo a partir de los valores reales de cada factor con sus correspondientes unidades:

- **Estadístico**

$$\text{Pureza (\% peso)} = 63{,}4 + 9{,}18\cdot X_T + 37{,}61\cdot X_C - 1{,}86\cdot X_S + 2{,}74\cdot X_{T\text{-}C} + 1{,}46\cdot X_{T\text{-}S} - 1{,}26\cdot X_{C\text{-}S} + 2{,}16\cdot X_{T\text{-}C\text{-}S} \quad (1)$$

$$\text{Rendimiento (\% peso)} = 15{,}26 + 1{,}86\cdot X_T + 8{,}51\cdot X_C \quad (2)$$

- **Industrial**

$$\text{Pureza} = -0{,}92 + 0{,}27\cdot T + 2{,}18\cdot C + 0{,}16\cdot S - 0{,}003\cdot T\cdot C - 0{,}003\cdot T\cdot S - 0{,}02\cdot C\cdot S + 0{,}0002\cdot T\cdot C\cdot S \quad (3)$$

$$\text{Rendimiento} = 0{,}05 + 0{,}08\cdot T + 0{,}42\cdot C \quad (4)$$

V. Análisis de la curvatura.

Una vez hecho el diseño factorial, se estudiará su curvatura para determinar si con este diseño se describe con precisión el proceso de reacción llevado a cabo.

La significación de la curvatura se define como la diferencia entre la media de las respuestas en los puntos centrales y la media de las respuestas en los experimentos factoriales. Será significativa la curvatura siempre que se encuentre fuera del intervalo de confianza de dicha curvatura (IC_C), el cual será calculado tal como se describe en el Anexo 1. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 20. Análisis de la curvatura para distintas respuestas.

	Pureza (% peso)	Rendimiento (% peso)
Curvatura	45,99	13,74
ICc	± 1,32	± 2,09
Significación	Si	Si

Resulta evidente al observar la Tabla 20 que los efectos de la curvatura son estadísticamente significativos, al ser el valor de la curvatura muy superior al de su intervalo de confianza.

Debido a lo anterior, las expresiones polinomiales de primer grado obtenidas con el análisis estadístico no resultan válidas, al no describir de forma correcta las respuestas estudiadas en este

trabajo. Por ello, es necesario considerar un diseño más complejo ampliando el número de experimentos, por lo que se pasará a estudiar un modelo de segundo orden con las tres variables consideradas.

3.5. Obtención del modelo de segundo orden.

Al no ser adecuado el modelo de primer orden (existen efectos no lineales), se aplicará uno de segundo orden, del tipo compuesto centrado en las caras, el cual mantiene el intervalo experimental del diseño a dos niveles a la vez que permite tener en cuenta la curvatura.

I. Planificación de los experimentos.

La realización de un modelo de segundo orden implica el uso de los experimentos ya utilizados en el de primer orden, pero añadiendo una nueva serie de seis experimentos (los puntos estrella) con el objetivo de producir un diseño compuesto central.

Estos experimentos se muestran en la Tabla 21:

Tabla 21. Matriz experimental con niveles en escala natural y codificados de puntos estrella.

Reacción	T (ºC)	C (%)	S (p/p)	X_T	X_C	X_S
13	95	25	30	+1	0	0
14	65	45	30	0	+1	0
15	65	25	45	0	0	+1
16	35	25	30	-1	0	0
17	65	5	30	0	-1	0
18	65	25	15	0	0	-1

II. Resultados.

En la Tabla 22 aparecen los resultados de las respuestas de los experimentos en los puntos estrella:

Tabla 22. Resultados experimentales en los puntos estrella.

Reacción	X_T	X_C	X_S	Pureza (%)	Rto en peso (%)
13	+1	0	0	97,6	23,6
14	0	+1	0	97,5	22,9
15	0	0	+1	4,1	1,0
16	-1	0	0	70,5	17,4
17	0	-1	0	6,7	1,5
18	0	0	-1	94,8	22,1

III. Modelos matemáticos.

Vistos los resultados, se escriben a continuación los modelos estadístico e industrial al igual que se hizo con el modelo de primer orden. Los coeficientes de estos modelos han sido calculados por regresión múltiple, pero en este caso se incluyen todas las variables independientes y sus interacciones, sin tener en cuenta el nivel de significación.

- **Estadístico**

$$\text{Pureza} = 92{,}7 + 10{,}06\cdot X_T + 39{,}22\cdot X_C - 1{,}82\cdot X_S - 7{,}29\cdot X^2_T + 2{,}74\cdot X_T\cdot X_C + 1{,}46\cdot X_T\cdot X_S - 39{,}49\cdot X^2_C - 1{,}26\cdot X_C\cdot X_S + 1{,}81\cdot X^2_S \quad (r^2 = 99{,}2287) \tag{5}$$

$$\text{Rendimiento} = 23{,}54 + 2{,}11\cdot X_T + 8{,}98\cdot X_C + 0{,}09\cdot X_S - 2{,}17\cdot X^2_T + 0{,}33\cdot X_T\cdot X_C - 0{,}14\cdot X_T\cdot X_S - 10{,}62\cdot X^2_C + 0{,}31\cdot X_C\cdot X_S - 0{,}27\cdot X^2_S \quad (r^2 = 98{,}4760) \tag{6}$$

- **Industrial**

$$\text{Pureza} = -52{,}58 + 1{,}17\cdot T + 6{,}73\cdot C - 0{,}71\cdot S - 0{,}008\cdot T^2 - 0{,}005\cdot T\cdot C + 0{,}003\cdot T\cdot S - 0{,}1\cdot C^2 - 0{,}004\cdot C\cdot S + 0{,}008\cdot S^2 \quad (r^2 = 99{,}2287) \tag{7}$$

$$\text{Rendimiento} = -19{,}24 + 0{,}38\cdot T + 1{,}71\cdot C + 0{,}07\cdot S + 0{,}002\cdot T^2 - 0{,}001\cdot T\cdot C - 0{,}0003\cdot T\cdot S - 0{,}03\cdot C^2 + 0{,}001\cdot C\cdot S - 0{,}001\cdot S^2 \quad (r^2 = 98{,}4760) \tag{8}$$

Estas ecuaciones (5-8) describen la influencia de los factores (temperatura y relaciones másicas de catalizador y disolvente) en las respuestas escogidas, pureza y rendimiento en peso, únicamente dentro del intervalo experimental estudiado.

Para comprender con mayor facilidad estas ecuaciones, se muestran a continuación sendas representaciones gráficas para cada respuesta. Las figuras 9, 10 y 11 muestran las superficies de respuesta en función de dos de los tres factores, permaneciendo constante el tercero en su valor del punto central.

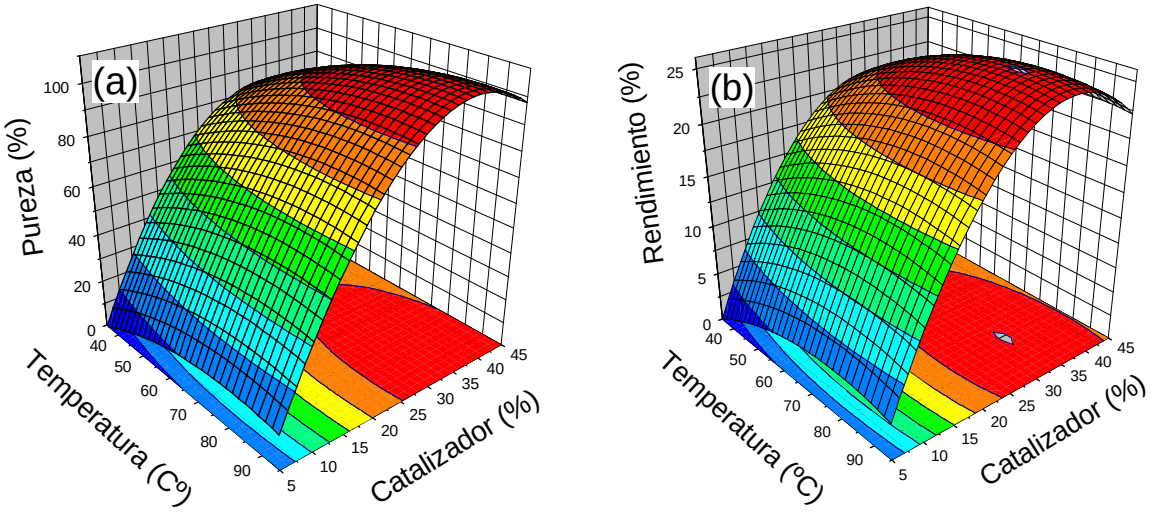


Figura 9. Superficies de respuesta y diagramas de contorno de la pureza (a) y el rendimiento (b) en función de la temperatura y la concentración de catalizador para un valor S = 30

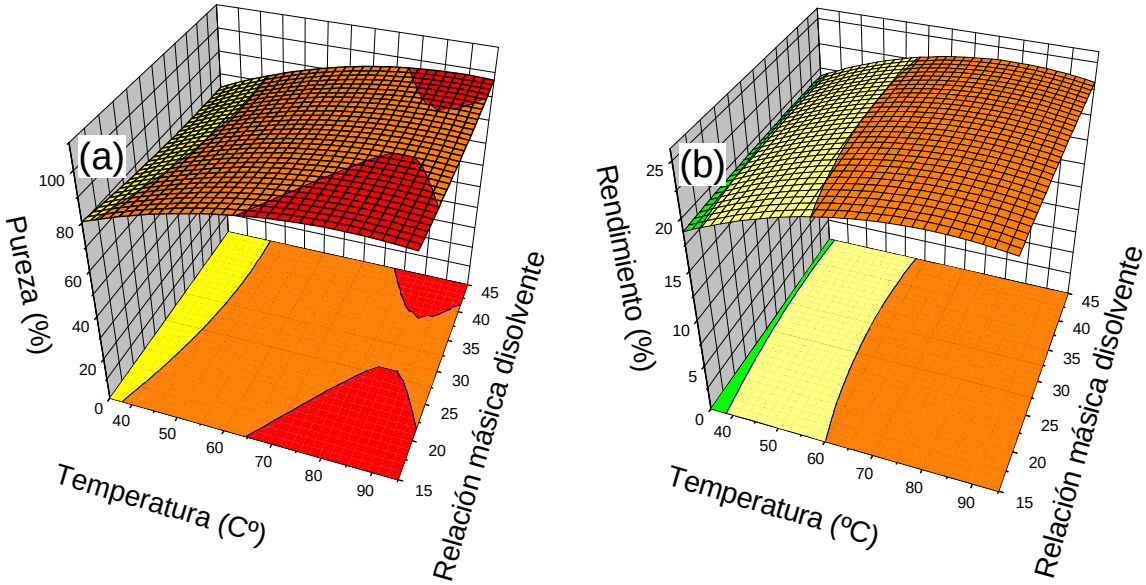


Figura 10. Superficies de respuesta y diagramas de contorno de la pureza (a) y el rendimiento (b) en función de la temperatura y la relación másica del disolvente para un valor C= 25%

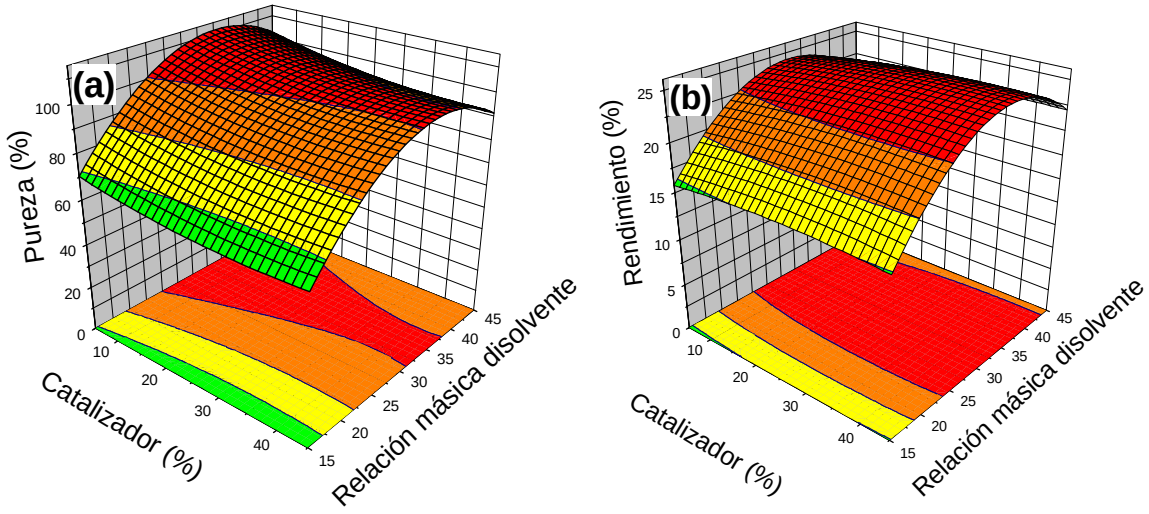


Figura 11. Superficies de respuesta y diagramas de contorno de la pureza (a) y el rendimiento (B) en función de concentración de catalizador y la relación másica del disolvente para un valor T= 65ºC

IV. Influencia de las variables.

Llegado este punto, y gracias a los modelos estadísticos obtenidos (ecuaciones 7-8), se realizará una valoración de la influencia de cada variable en cada respuesta.

- INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN LA PUREZA DEL BIODIÉSEL.

Para observar los efectos e interacciones de las variables puestas en juego se recurre de nuevo a representaciones gráficas.

La figura 12a muestra el efecto principal de los 3 factores estudiados sobre la pureza del biodiésel obtenido.

Por su parte, la figura 12b representa las interacciones binarias del sistema. Por ejemplo, para el caso T-C, se muestra el cambio en la respuesta cuando la temperatura pasa de su nivel bajo a su nivel alto, manteniéndose la relación másica de catalizador en su nivel inferior y, lo mismo, pero cuando esta relación está en su nivel superior.

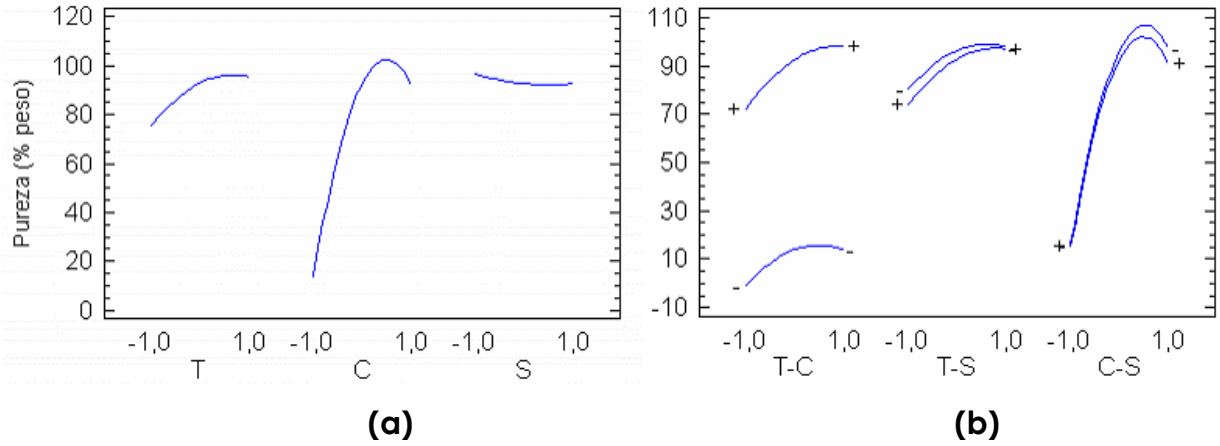


Figura 12. Efectos principales (a) e interacciones binarias (b) de los factores estudiados sobre la pureza del biodiésel.

Atendiendo al análisis estadístico, en la figura 12a destaca con gran diferencia el efecto de la relación másica de catalizador, seguido de la temperatura y por último, sin efecto apreciable, la relación másica de disolvente. La relación másica de catalizador presenta un efecto claramente positivo, ya que conforme va aumentando este factor desde su nivel inferior, aumenta notablemente la pureza del producto. No obstante se alcanza un máximo, a partir del cual al aumentar esta relación disminuye la pureza. Esto puede ser debido a que un exceso significativo de catalizador dé lugar a reacciones secundarias que impurifiquen el biodiésel.

La temperatura también muestra un efecto positivo, pero de menor peso que el anterior, y el efecto de la cantidad de disolvente no es significativo.

En cuanto a las relaciones binarias entre los factores (figura 12b), se puede concluir que no son relevantes. El que sean paralelas las líneas que representan la interacción, implica que el efecto del primer factor sobre la respuesta es el mismo para ambos niveles del segundo, por lo que dicha interacción no es significativa.

Cabe destacar, que al estar en un modelo de segundo orden los efectos cuadráticos tienen bastante importancia, y debido a la significación de la curvatura un aumento en el valor de los factores estudiados no da como resultado un aumento lineal en las respuestas. Para el caso de la pureza, estos efectos cuadráticos tienen todos influencias negativas, y según su importancia se les puede ordenar igual que por sus efectos, siendo el más destacado el del catalizador. Tras él y con menor peso cabe destacar el efecto de la temperatura, y sin apenas incidencia el de la relación másica de disolvente.

- INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EN EL RENDIMIENTO EN PESO DE BIODIÉSEL.

Las gráficas de los efectos e interacciones de los factores son las siguientes en este caso:

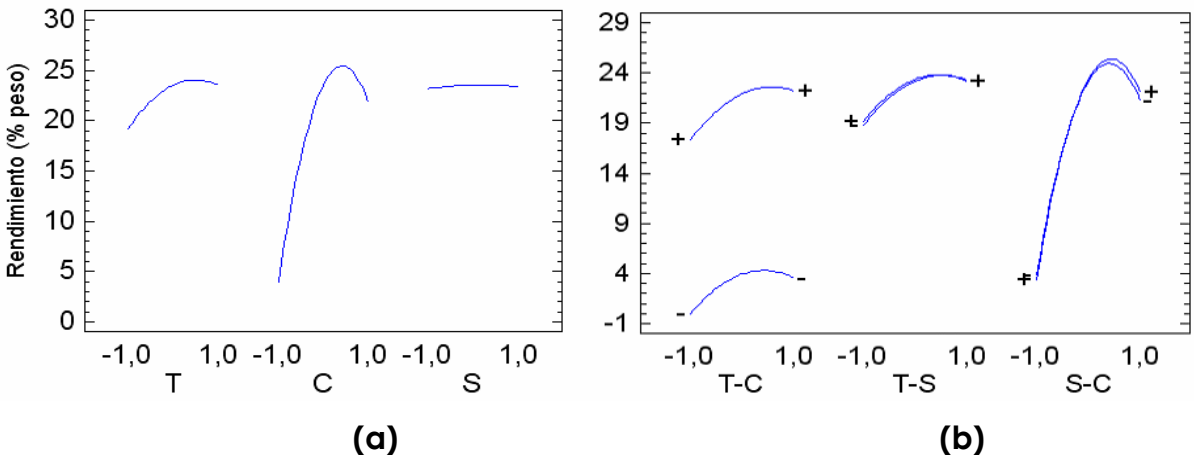


Figura 13. Efectos principales (a) e interacciones binarias (b) de los factores estudiados sobre el rendimiento del biodiésel.

Como se puede comprobar en la Figura 13, tanto los efectos principales de los factores como sus interacciones son análogos al caso de la pureza. Aparece la misma tendencia en el efecto del catalizador, que de nuevo se revela como la variable más determinante.

En cuanto a las interacciones, cabe destacar que en este caso no sólo son paralelas, sino que para los casos temperatura-catalizador y catalizador-disolvente, prácticamente se solapan las curvas, quedando claro que no son nada significativas.

Respecto a los efectos cuadráticos, de nuevo el más importante es el del catalizador, seguido por el de la temperatura y el del disolvente. Su efecto es también negativo, por lo que se puede concluir que también hay una clara analogía en la influencia de estos efectos con el caso anterior de la pureza.

3.6. Estimación del error.

En las siguientes figuras se muestra el diagrama de distribución residual para cada respuesta, siendo el residuo la diferencia entre los valores calculados según el modelo matemático y los valores obtenidos en la experimentación.

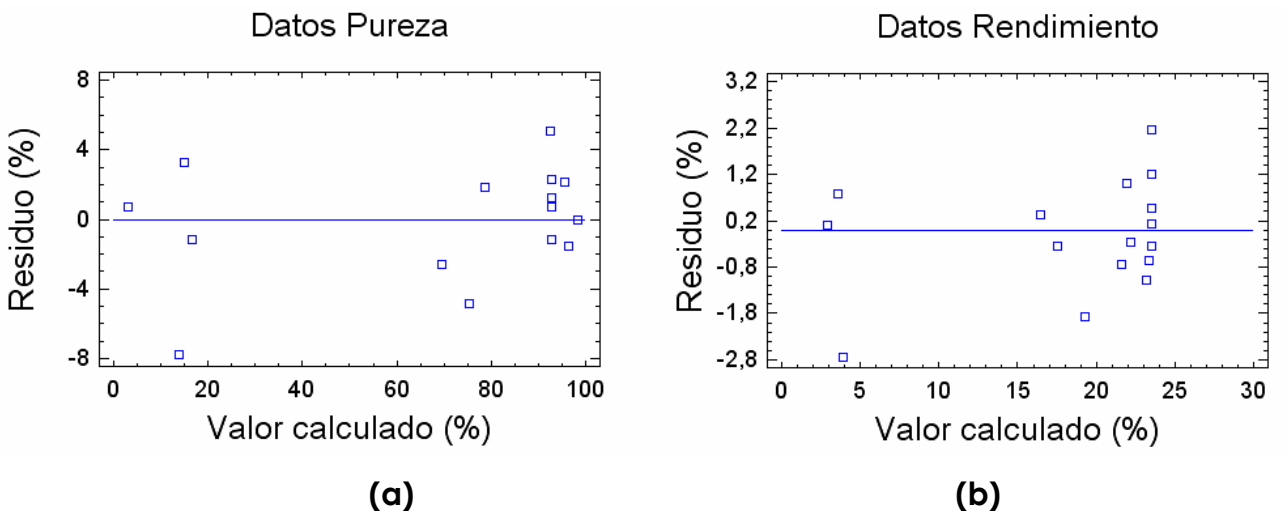


Figura 14. Distribución de residuos en las respuestas de pureza (izquierda) y rendimiento (derecha).

En las gráficas de los residuos interesa que el rango en el que se incluyan éstos sea lo menor posible. En la Figura 14a, se observa que los residuos se encuentran en el intervalo ±8% aproximadamente. En el caso del rendimiento (figura 14b), los valores de los residuos se sitúan en el rango ±3%, aproximadamente.

Sin embargo, se han considerado aceptables los resultados al comprobar los factores de correlación para el ajuste de cada respuesta, que al ser muy próximos a la unidad indicaban un buen ajuste de los datos. Además la distribución de los residuos no sigue ninguna tendencia respecto a los valores calculados, otro signo de que el ajuste es fiable.

Asimismo la Figura 14 muestra que la mayoría de valores del residuo se concentran en un rango menor que el máximo indicado anteriormente, que resulta más amplio por un mayor valor residual en reacciones muy concretas. Esto puede achacarse a error experimental en alguna de estas reacciones.

3.7. Optimización.

Con los modelos matemáticos obtenidos y las distintas representaciones de las superficies de respuesta, se pueden estimar las condiciones óptimas de operación para el proceso estudiado.

Estas condiciones serán aquellas en las que se produzca un compromiso entre dos aspectos: el cumplimiento de las especificaciones de la Normativa Europea EN 14214 (contenido en ésteres metílicos mayor o igual a 96,5%), y que esto se produzca en unas condiciones económicamente aceptables.

Atendiendo a esto último se buscará trabajar a temperaturas moderadas, y utilizando la cantidad de catalizador más baja posible para que la reacción transcurra hacia una alta conversión. La relación másica de disolvente tampoco interesa que sea muy alta, ya que esto encarecería el proceso.

Dicho lo anterior, a continuación se usarán las Figuras 15, 16 y 17 para discutir cuáles serán los valores óptimos de los factores estudiados. En estas figuras aparecen superpuestos los diagramas de contorno de las dos respuestas analizadas, la pureza y el rendimiento en biodiésel. Como ya se comentó previamente, estos diagramas muestran el valor de la respuesta en función de dos de los tres factores estudiados, permaneciendo uno de ellos constante en su valor central. De este modo no se pueden encontrar las condiciones óptimas, ya que para ello habría que tener en cuenta los tres factores. No obstante, se va a discutir la elección de los valores óptimos a partir de estas figuras.

En la figura 15 el factor constante es la relación másica de disolvente. Para este caso se comprueba que la relación másica mínima de catalizador necesaria estaría en torno al 35%, con una temperatura de reacción de 53ºC. De ser más bajo el valor de estos factores, no se cumpliría la especificación del 96,5% de pureza.

Observando ahora la figura 16, en la que se mantiene al 25% la relación másica de catalizador, las condiciones de operación óptimas se alcanzarían para una temperatura de 77ºC y una relación másica de disolvente de 25. De este modo se obtendría un producto de acuerdo a las especificaciones y con un rendimiento algo superior al 24%.

Si se fija la temperatura en 65ºC (figura 17), las relaciones másicas mínimas necesarias de catalizador y disolvente serían respectivamente 27% y 23. Así se cumpliría con la Normativa Europea con un rendimiento de nuevo cercano al 24%.

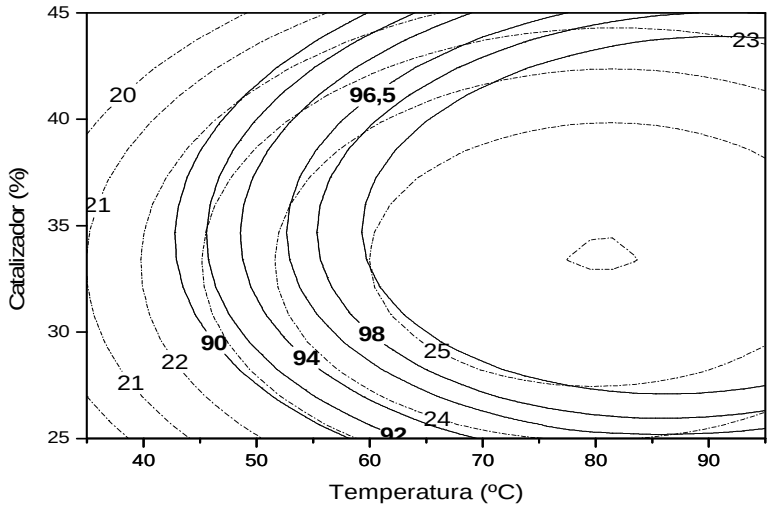


Figura 15. Diagramas de contorno superpuestos para la pureza (líneas continuas) y el rendimiento (líneas discontinuas) del biodiésel obtenido para S = 30

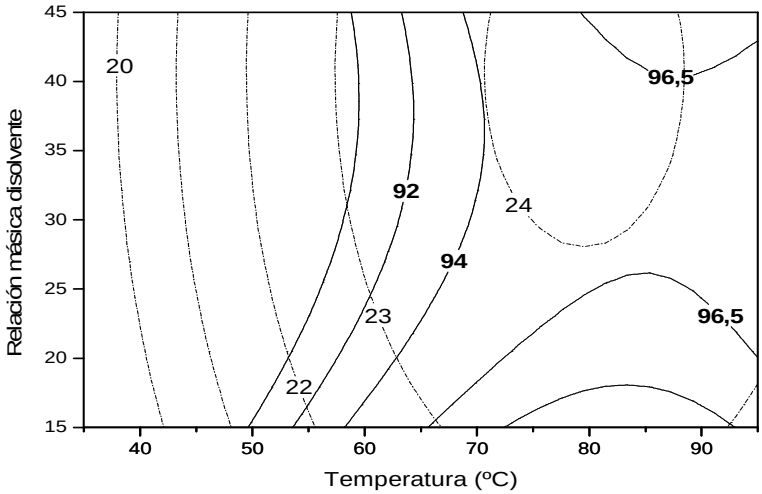


Figura 16. Diagramas de contorno superpuestos para la pureza (líneas continuas) y el rendimiento (líneas discontinuas) del biodiésel obtenido para C = 25%

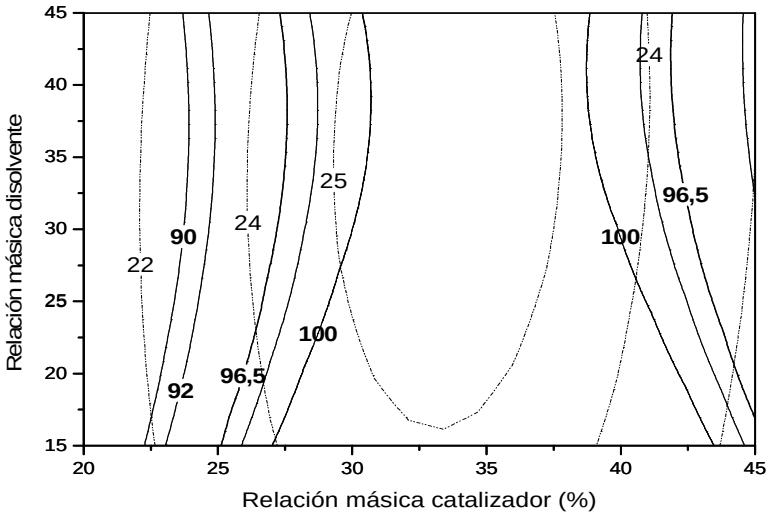


Figura 17. Diagramas de contorno superpuestos para la pureza (líneas continuas) y el rendimiento (líneas discontinuas) del biodiésel obtenido para T = 65ºC.

Según los diagramas de contorno las condiciones óptimas desde el punto de vista económico son 65ºC en cuanto a temperatura, 27% de relación másica de catalizador, y 15 de relación másica de disolvente (ver figura 17).

Para los valores anteriores, los modelos matemáticos de segundo orden predicen una pureza y un rendimiento del 100% del 24% respectivamente.

Capítulo VI. Conclusiones.

A continuación se exponen las principales conclusiones que se han obtenido tras la realización del presente Trabajo de Investigación:

- Se ha verificado que la estirpe modificada del hongo *Mucor circinelloides* presenta una acumulación de lípidos mayor que la cepa silvestre. Asimismo, su composición lipídica es adecuada para la utilización de esta biomasa como materia prima en la producción de biodiésel.

- Se ha empleado el microorganismo *Mucor circinelloides* como materia prima en la producción de biodiésel por esterificación/transesterificación de los lípidos contenidos en su biomasa, empleando HCl como catalizador, produciénse la extracción y la reacción en una sola etapa.

- Se ha estudiado el efecto de la temperatura, la concentración de catalizador y la relación másica de disolvente sobre la pureza en ésteres metílicos del biodiésel producido y sobre el rendimiento del proceso. Para ello se ha realizado un diseño factorial de experimentos y se ha aplicado la metodología de superficies de respuesta.

- Se han obtenido modelos matemáticos de segundo orden que representan adecuadamente el comportamiento de ambas respuestas seleccionadas en el intervalo experimental para cada uno de los tres factores estudiados.

- Se ha determinado que el factor con mayor influencia sobre el proceso es la concentración de catalizador, mostrando ambas respuestas un valor máximo para un valor de dicha concentración de 30-35%. El siguiente factor con mayor influencia es la temperatura, que afecta positivamente en todo el intervalo experimental y por último, la relación másica de disolvente muestra una influencia poco destacada en el proceso.

- Se ha obtenido un biodiésel que cumple con lo establecido en la Normativa Europea EN 14214 en cuanto contenidos en éster (<96.5%), monoglicéridos (<0.8%), diglicéridos (<0.2%) y triglicéridos (<0.2%), con tiempos de reacción cortos y elevado rendimiento del proceso.

Capítulo VII. Bibliografía.

Acuña, S.; 2004. Producción de Aceite y Grasa por Fermentación. Disponible en http://www.ilustrados.com/publicaciones/ (18/02/2004).

Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K.V.; Krishnan, S.; Chan, W.H.; 2006. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal* 30, 212-217.

Botha, A.; Kock, J.L.F.; Coetzee, D.J.; Botes, P.J.; 1997. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides. Antonie van Leeuwenhoek,* 71, 201-206.

Certik, M.; Sajbidor, J.; Stredanska, S.; 1993. Effect of carbon and nitrogen sources on growth, lipid production and fatty acid composition of *Mucor mucedo*. *Acta Biotechnologica* 13 (2), 193-196

Cheng, C.H.; Cheung, C.S.; Chan T.L.; Lee S.C.; Yao C.D.; Tsang K.S.; 2008. Comparison of emissions of a direct injection diesel engine operating on biodiesel with emulsified and fumigated methanol. *Fuel* 87, 1870-1879.

Chisti, Y.; 2007. Biodiesel form microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.

Comisión Europea; 1997. Energía para el futuro: fuentes de Energía Renovables. Libro Blanco para una estrategia y un plan de acción comunitarios. Disponible en: http://europa.eu/documents/comm/white_papers/pdf/com97_599_es.pdf

Di Serio, M.; Tesser, R.; Dimiccoli, M.; Cammarota, F.; Nastasi, M.; Santacesaria, E.; 2005. Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 239, (1-2) 111-115.

Dote, Y.; Sawayama, S.; Yokoyama, S.; 1992. Liquefaction of hydrocarbon-rich microalga. *American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry* 37(4), 1836-1839.

Dunahay, T. G.; Jarvis, E.; Dais, S.; Roessler, P. G.; 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. Applied Biochemistry and Biotechnology 57/58 (Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1995), 223-231.

elmundo.es , “Más del 99% del petróleo consumido en España es importado”, 15 de mayo de 2009.

Ferro Brage, A; Ferro Brage, J.M.; 2006. Biodiésel, perspectivas de futuro en España, Anales de mecánica y electricidad, Vol. 83, Fasc. 3, 2006 , 2-7

Formo, M.W.; 1954. Ester reactions of fatty materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 31, 548-559.

Fröhlich, A.; Rice, B.; 1995. The preparation and properties of biodiesel grade methyl ester from waste cooking oil. In: *Minutes of the activity meeting of the IEA, Vienna*, 11-18.

Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H.; 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, (5) 405-416.

García, J.M.; García, J.A.; 2006. Biocarburantes líquidos: biodiésel y bioetanol. Informe de vigilancia tecnológica. *CEIM, Dirección General de Universidades e Investigación, CAM.*

Ginzburg, B.; 1993. Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy. *Renewable Energy* 3, (2/3) 249-252.

Gray, N.F.; 2004. Biology of wastewater treatment. *Series on Environmental Science and Management*, Segunda Edición, volume 4.

Huber, G.W.; Iborra, S.; Corma, A.; 2006. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. American Chemical Society: 54.3.

IDAE; 2005. Plan de energías renovables en España 2005-2010. Disponible en http://www.mityc.es

Jackson, F.M.; Michaelson, L.; Fraser, T.C.M.; Stobart, A.K.; Griffiths, G.; 1998. Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides. Microbiology* 144, 2639-2645.

Kalscheuer, R.; Stöling, T.; Steinbüchel, A.; 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology* 152, 2529-2536.

Lewis, T.; Nichols, P.; McMeekin, T.; 2000. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods* 43, 107-116.

Lotero, E.; Liu, Y.; Lopez, D.E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D.A.; Goodwin, J.G.; 2005. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44, 5353-5363.

Ma, F.; Hanna, M.A.; 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* 70, 1-15.

Martínez, V.; 2008. “Obtención de biodiésel a partir microorganismos”. Proyecto Fin de Carrera URJC.

Meher, L.C.; Vidya-Sagar, D.; Naik, S.N.; 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10, 248-268.

Miao, X.; Wu, Q.; 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97, 841-846.

Michinaka, Y.; Aki, T.; Shimauchi, T.; Nakajima, T.; Kawamoto, S.; Shigeta, S.; Suzuki, O.; Ono, K.; 2002. Differential response to low temperature of two D6 fatty acid desaturases from Mucor circinelloides. *Application of Microbiological Biotechnology* 62: 362–368.

Mittelbach, M; Angerbauer, C; Siebenhofer, M; Guebitz, G.M.; 2007. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkey* for biodiésel production. Science direct- *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056.

Nagle, N.; Lemke, P.; 1990. Production of methyl ester fuel from microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24, (5) 355-361.

Nelson, D.L.; Cox, M.M.; 2000. Lehninger Principios de Bioquímica. Tercera Edición. *Ediciones Omega S.A.* 384-385.

Nie, K.; Xie, F.; Wang, F.; Tan, T.; 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43, 142-147.

Ratledge, C.; 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* 30, 1047-1050

Rittmann, B.E.; 2008. Opportunities for Renewable Bioenergy using Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 203-212.

Sádaba, I.; 2007. "Obtención de biodiésel a partir del microorganismo *Mucor circinelloides*". Proyecto Fin de Carrera URJC.

Szczęsna-Antczak, M.; Antczak, T.; Piotrowicz-Wasiak, M.; Rzyska, M.; Binkowska, N.; Bielecki, S.; 2006. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1214–1222.

Song Y.; Wynn J.P.; Li Y., Grantham D.; Ratledge C.; 2001. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides. Microbiology* 147, 1507–1511.

Somashekar D.; Venkateshwaran G.; Srividya C.; Krishnanand; Sambaiah K.; Lokesh B.R.; 2001. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World Journal of Microbiologu & Biotechnology* 17: 317-320.

Tashtoush, G.M.; Al-Widyan, M.I.; Al-Jarrah; M.M.; 2004. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. *Energy Conversion and Management* 45, 2697-2711.

"The silent tsunami", The economist print edition, 14th April 2008. Disponible online en: http://www.economist.com/opinion/displaystory.cfm?story_id=11050146

UN- Energy; 2007. Sustainable bioenergy: A framework for decision makers.. Disponible en http://esa.un.org/un-energy/pdf/susdev.Biofuels.FAO.pdf. (8/05/2007).

UNFCC secretariat; 2007. Kyoto Protocol Reference Manual on Accounting of Emissions and Assigned Amounts. Disponible en http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php

Urbanchuk, John M.; 2006. Contribution of the Biodiesel Industry to the Economy of the United States. LECG LLC. Disponible en: http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/20060930_gen373.pdf

Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J.; 2001. Biodiesel: Una alternativa real al gasóleo mineral. *Ingeniería Química* 377, 135-145.

Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J.; 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology* 92, 297-305.

Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J.; 2006. A Comparative Study of Vegetable Oils for Biodiesel Production in Spain. *Energy & Fuels* 20, 394-398.

Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J.; 2007. Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. *Bioresource Technology* 98, 1724-1733.

Vollhardt, K.P.; Schore, N.E.; 1998. Organic Chemistry. Structure and Function. Third Edition. *W.H. Freeman and Company*. 844-845.

Wynn, J. P.; Hamid, A.A.; Li, Y.; Ratledge, C.; 2001. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology* 147: 2857–64.

Wynn, J. P.; Hamid, A.A.; Ratledge, C.; 1999. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology* 145, 1911-1917.

Xue, F.; Miao, J.; Zhang, X.; Luo, H.; Tan T.; 2008 .Studies on lipid production by Rhodotorula glutinis fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology* 99: 5923–5927.

Yang, Z.; Xie, W.; 2007. Soybean oil transesterification over zinc oxide modified with alkali earth metals. *Fuel Processing Technology* 88, 631–638.

Zhang, Y.; Dube, MA.; McLean, DD.; Kates, M.; 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology* 89, 1-16.

Zhu, M; Zhou, L.J.; Yu, L.J.; 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology* 84, 93-95.

Anexo: Diseño Factorial de Experimentos y Superficies de Respuesta

Diseño factorial de experimentos

Un diseño factorial como el que se desarrolla en este Anexo, requiere de una planificación previa a la realización de experimentos. Esta etapa es fundamental, y es aquí donde se eligen las variables influyentes en el proceso y su intervalo de estudio, así como las respuestas que se desean medir.

Este diseño experimental es una técnica estadística, que permite minimizar el número de experimentos necesario para conocer y cuantificar la influencia de las variables sobre la respuesta analizada.

A las variables independientes del proceso se las llama factores, los cuales tienen varios niveles, que son los distintos valores que pueden tener en cada experimento. Según este número de niveles se obtendrán distintos modelos. Para conseguir por ejemplo un modelo lineal (de primer orden) son necesarios dos niveles, +1 y -1, que son el nivel superior e inferior respectivamente, y para un modelo no lineal (de segundo orden), se necesita un nivel adicional, el 0, que será el valor medio entre los dos niveles anteriores.

El número mínimo de experimentos necesario viene de esta ecuación:

$$N = m^k$$

Donde:

N: número de experimentos

n: número de niveles

k: número de factores

El número de grados de libertad se puede hallar restando la unidad al número de experimentos obtenido.

Modelos matemáticos.

A partir del diseño factorial se obtienen unos modelos matemáticos, los cuales expresan de forma numérica la relación entre los factores y las respuestas del proceso.

Los modelos más empleados son polinomios ortogonales, en los que se tiene en cuenta n factores y m niveles, y cuya expresión general se muestra a continuación:

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^{n} a_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^{m} \sum_{j=1}^{m} a_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \ldots + \sum_{i=1}^{j=1} \ldots \sum_{m=1}^{n} a_{ij\ldots m} \cdot X_i \cdot X_j \ldots X_m$$

Donde:

Y: respuesta media

a_0: término residual

a_i: efecto del factor i

a_{ij}: efecto de las interacciones de orden dos.

$a_{ij\ldots m}$: efecto de las interacciones de orden m.

Cabe destacar que el modelo obtenido es válido únicamente en los límites marcados por los niveles de cada factor. Una vez hallado se deriva o analiza gráficamente mediante la superficie respuesta, para maximizar o minimizar la respuesta según el caso.

Estimación de la influencia de los factores.

Para ver hasta qué punto es relevante cada factor escogido se calcula su influencia (I), que se define como la variación media obtenida en la respuesta al variar el factor correspondiente entre sus niveles inferior y superior. Matemáticamente se expresa así:

$$I = \frac{\sum Y_{X=(+)} - \sum Y_{X=(-)}}{N/2}$$

Donde:

YX=(+): Suma de las respuestas cuando el factor X está en el nivel superior.

YX=(-): Suma de las respuestas cuando el factor X está en el nivel inferior.

N: número de experimentos del diseño factorial.

Error en la respuesta.

Los errores de las respuestas siguen una distribución Gaussiana, pero debido al reducido número de experimentos del que se dispone y a que se pretende hacer un estudio estadístico, se recurre a la distribución de Student.

Para determinar si una influencia es significativa o no, se emplea el intervalo de confianza, el cual se calcula de este modo:

$$I.C. = \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{r}}$$

Donde t es el estadístico de Student, correspondiente al nivel de confianza elegido (95%) y a los N-1 grados de libertad, s es la desviación estándar de la respuesta con r-1 grados de libertad, y r es el número de experimentos realizados para calcular el error en la repuesta (número de réplicas en el punto central).

La desviación estándar se calcula así:

$$s = \left[\frac{\sum_{i=1}^{r} (Y_i - Y_m)^2}{r-1} \right]^{1/2}$$

Donde Y_i es la respuesta obtenida para cada réplica, e Y_m es el valor medio de la respuesta (en los puntos centrales).

Sistemas no lineales.

Para ver si un sistema es lineal, debemos estudiar el efecto de la curvatura. Si ésta resulta significativa, el sistema será no lineal y se hará necesario incluir un tercer nivel en el modelo

El efecto de la curvatura se define según la siguiente ecuación:

$$c = Y_m - Y$$

Siendo Y_m el valor medio de la respuesta en los puntos centrales e Y el valor medio de la respuesta en los experimentos factoriales.

El intervalo de confianza de la curvatura se calcula con esta otra expresión:

$$I.C. = \pm t \cdot s \cdot \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{r} \right]^{1/2}$$

Diseños Compuestos: Planificación.

Cuando el sistema estudiado resulta ser no lineal, se pasa a obtener los efectos cuadráticos mediante la planificación de un diseño compuesto central de experimentos. Para ello se le suma a la matriz del diseño factorial 2^k, 2·k combinaciones más.

Para determinar los puntos estrella puede elegirse un valor de α tal que los coeficientes de regresión sean ortogonales entre sí, a fin de minimizar el error y conseguir un diseño rotacional.

Si se realizan r repeticiones de los puntos centrales, el número de experimentos para un diseño compuesto central a dos niveles viene dado por esta ecuación:

$$N = 2^k + 2 \cdot k + r$$

De este modo se evita tener que añadir nuevos niveles, lo que implicaría una mayor complicación en los cálculos matemáticos del diseño.

Superficies de respuesta.

Uno de los objetivos finales de emplear este tipo de diseños es el poder ajustar los resultados obtenidos a una superficie de respuesta de segundo orden, la cual permitirá un mejor análisis de éstos. En estas superficies las variables independientes son los factores y la variable dependiente la respuesta medida. El modelo al que se llega es:

$$y = b_0 + \sum b_i \cdot x_i + \sum b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum b_{ii} \cdot x_i^{\,2}$$

Los resultados experimentales se deben ajustar a una superficie cuadrática obtenida mediante un análisis de regresión múltiple. Los paso para obtener esta superficie son:

1. Se varía según interese el valor de los factores y se llevan a cabo los distintos experimentos planeados.

2. Se miden las respuestas entre los valores límites de operación fijados anteriormente.

3. Se analizan estos resultados a fin de determinar la forma de ajustar las variables con el fin de mejorar la respuesta medida.

La metodología seguida se divide en dos grandes etapas:

I. Etapa de primer orden: se parte de un modelo matemático de primer orden, se realiza un diseño factorial adecuado y se ajustan los datos para representar después las superficies de respuesta, determinando la dirección de la máxima pendiente.

II. Etapa de segundo orden: el modelo de partida en esta ocasión es de segundo orden, y el diseño es compuesto central. Se vuelven a ajustar los datos ya representar las superficies de respuesta, y tras analizarlas se llega a la respuesta óptima.