

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Producción de biodiesel a partir de aceite de borra de café**

Tesis

Para obtener el grado de Especialidad en Biotecnología

Presenta

I.B.I. Cheyko Martínez Peña

Director

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Co-Directora

Dra. Margarita Mercedes González Brambila

Mayo de 2013

La Especialidad en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT

Iztapalapa, D.F. a 31 de Mayo de 2013

El jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud aprobó la tesis

***Producción de biodiesel a partir de aceite de borra de café***

Que presentó

**I.B.I. Cheyko Martínez Peña**

Comité de tutores:

Director de Tesis:

**Dr. Sergio Huerta Ochoa**

---

Co-Directora de Tesis:

**Dra. Margarita Mercedes González Brambila**

---

Lector:

**Dr. Daniel Torres Martínez**

---

**¿Pues de donde viene la sabiduría? Y ¿Cuál es la morada de la inteligencia? Escondida ésta a la vista de todos los vivientes de la tierra. El camino para hallarla, DIOS le sabe, y él es quien tiene conocida su morada.**

**Job 28; 20-23**

## **Agradecimientos**

Agradezco a DIOS por la oportunidad que me brinda de admirar lo maravilloso que es la vida y de emprender nuevos caminos en compañía de grandes personas, que me han mostrado lo importante que es vivir.

A mis padres por su amor incondicional, su apoyo, su confianza, por todas sus enseñanzas y ejemplos de vida que me heredaron como guía en mi vida para mi toma de decisiones.

A Roció hoy mi esposa, por su comprensión, tolerancia, paciencia, apoyo y por el amor que me brinda día con día.

A mi hija Lily por su sonrisa que ha sido el combustible para poner en marcha esta maquinaria y a su amor que ha hecho que me levante en los momentos difíciles.

A mis hermanas Nancy y Marlene, por sus consejos y apoyo, que me demuestran en todo momento.

A mí cuñado Víctor por sus consejos y apoyo en los momentos de tribulación.

A mis sobrinos Diego, Juan José y a Santiago por la motivación de hacer las cosas y ser curiosos para realizarlas y su disponibilidad de aprender.

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa por darme la oportunidad de caminar a su lado este tiempo, para adquirir los conocimientos que hoy me transmite a través de su ejemplo, enseñarme un nuevo mundo de oportunidades y saber tomarlas en el momento adecuado.

A la Dra. Margarita Mercedes González Brambila por su apoyo, paciencia, y por transmitirme parte de su conocimiento que hoy aplicó en mi vida laboral.

Al Dr. J. Ascención Montoya de la Fuente del IMP por su apoyo, paciencia y por mostrarme lo importante que los experimentos sean reproducibles, para su análisis.

Al Dr. Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía por su apoyo, paciencia, y por transmitirme parte de su inestimable conocimiento.

Finalmente a mis amigos y compañeros de la PP4 por brindarme de su gran conocimiento.

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	10
<b>1.- Introducción</b> .....	11
1.1.- Borra del café .....	11
1.2.- Aceites extraídos del café .....	11
1.3.- Biodiesel .....	12
1.4.- Reacción de transesterificación .....	13
1.5.- Biodiesel producido por transesterificación .....	13
1.6.- Diseño del proceso .....	15
<b>2.- Antecedentes directos</b> .....	16
2.1.- Diseño y desarrollo de procesos de bioconversión .....	16
2.2.- Prototipos de biorreactores de tanque agitado .....	16
<b>3.- Justificación</b> .....	18
<b>4.- Hipótesis</b> .....	19
<b>5.- Objetivos</b> .....	20
5.1.- General .....	20
5.2.- Específicos .....	20
<b>6.- Metodología y estrategia experimental</b> .....	21
6.1.- Métodos de producción de biodiesel .....	21
6.2.- Extracción de aceite de café .....	22
6.3.- Transesterificación .....	23
6.3.1.- Método químico .....	23
6.3.2.- Método enzimático .....	25
6.4.- Mini reactores .....	26
6.5.- Diseño experimental .....	27
<b>7.- Resultados</b> .....	28
7.1.- Extracción de aceite de café .....	28
7.1.1.- Formas de extracción .....	28
7.1.2.- Rendimientos de aceite obtenido. ....	29
7.1.3.- Extracción por solventes .....	30
7.2.- Transesterificación .....	33
7.2.1.- Producción de biodiesel por el método químico .....	33
7.2.1.1.- Producción en reactores .....	33
7.2.1.2.- Análisis cromatográfico .....	34
7.2.1.3.- Pruebas reológicas .....	35
7.2.2 Producción de biodiesel por el método enzimático .....	36
7.2.2.1.- Enzimas utilizadas .....	36
7.2.2.2.- Variables en la producción de biodiesel .....	36
7.2.2.3.- Producción de FAMES por lipasas .....	37

7.2.3.- Diseño estadístico para la producción enzimática. ....	38
7.2.3.1.- FAMES analizados .....	38
7.2.3.2.- Análisis de varianza .....	39
7.2.3.3.- Diagrama de Pareto .....	40
7.2.3.4.- Grafica de cubo .....	41
7.2.4.- Comparación de los métodos utilizados .....	44
<b>8.- Conclusiones</b> .....	45
<b>9.- Referencias</b> .....	46

## Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1	Compuestos presentes en la borra del café ..... 11
Tabla 2	Procesos de extracción de aceite en el café tostado y borra de café ..... 22
Tabla 3	Diseño experimental ..... 27
Tabla 4	Extracción de aceite de café según el tipo de tostado ..... 28
Tabla 5	Resultados de la extracción del aceite de café de 4 regiones del país ..... 29
Tabla 6	Extracción total de aceite por 2 métodos propuestos ..... 30
Tabla 7	Principales compuestos presentes en el aceite de café ..... 32
Tabla 8	Cantidad de biodiesel obtenido por el método químico ..... 33
Tabla 9	Condiciones de operación para el método químico en reactores ..... 34
Tabla 10	Comparación de % en la producción de biodiesel ..... 34
Tabla 11	Datos de biodiesel analizados por el método estadístico ..... 39
Tabla 12	Análisis de varianza de 2 FAMES representativos ..... 39
Tabla 13	Grados de libertad y suma de cuadrados ..... 40
Tabla 14	Optimización de parámetros para heptadecanóico ..... 43
Tabla 15	Optimización de parámetros para esteárico ..... 43
Tabla 16	Ventajas y desventajas de los métodos en la producción de biodiesel ..... 44

## Índice de Figuras

		Pág.
Fig. 1	Ecuación de transesterificación	12
Fig. 2	Mecanismo de reacción en la transesterificación enzimática	14
Fig. 3	Esquema de las etapas relevantes para el diseño y optimización de bioprocesos	17
Fig. 4	Métodos de producción e investigación para la obtención de biodiesel	21
Fig. 5	Método de extracción a partir de café tostado	22
Fig. 6	Ecuación de transesterificación por el método químico	23
Fig. 7	Producción de biodiesel en biorreactores por el método químico	25
Fig. 8	Ecuación de transesterificación por el método enzimático	25
Fig. 9	Plataforma de mini reactores de 10 ml	27
Fig. 10	Porcentaje de aceite de café obtenido por 2 tipos de solventes	31
Fig. 11	Cromatograma en el GC-Masas del aceite de café	31
Fig. 12	Proporción de FAMES del biodiesel producido a diferentes rpm.	35
Fig. 13	Biodiesel sometido a diferentes presiones de corte	35
Fig. 14	Biodiesel sometido a diferentes grados de deformación	36
Fig. 15	Biodiesel obtenido en la reacción enzimática	37
Fig. 16	Biodiesel obtenido por LPC	37
Fig. 17	Biodiesel obtenido por TTL	38
Fig. 18	Diagrama de Pareto para heptadecanóico	41
Fig. 19	Diagrama de Pareto para esteárico	41
Fig. 20	Gráfica de cubo para heptadecanóico	42
Fig. 21	Gráfica de cubo para esteárico	42

## RESUMEN

En la actualidad las reservas mundiales de combustibles fósiles han mostrado un descenso, lo cual ha traído un incremento en la investigación de combustibles a partir de fuentes renovables. La utilización de subproductos agroindustriales como materia prima es una alternativa para la obtención de combustibles tales como el biodiesel. La borra de café en la actualidad no se aprovecha, la mayor parte de este subproducto se va a vertederos de basura. En la bibliografía se encontró que el contenido de aceite en la borra de café variaba entre un 10 y un 20 % en base seca. Por lo que el aceite extraído de la borra de café puede ser utilizado como materia prima para la producción de biodiesel.

El contenido de aceite extraído de la borra de café varió dependiendo de la región y el tipo de tostado, lo cual presentó un factor de disponibilidad del aceite. Los medios de extracción estudiados en este trabajo fueron medio acuoso y medio de solventes (hexano y etanol). Se optó por el método de extracción con etanol que ofreció un buen balance entre extracción, bajo costo y contaminación.

Con el aceite extraído, calentado y filtrado se procedió a llevar a cabo la transesterificación por el método químico. Se obtuvo un porcentaje promedio de producción de 95% de biodiesel y 5 % de glicerina, que es un subproducto del proceso. Esto nos indicó que el aceite contenido en la borra de café es una buena materia prima para la producción de biodiesel. Sin embargo, el biodiesel obtenido por síntesis química requiere tratamiento para su purificación, lo cual produce contaminación, ya que se requiere del doble de cantidad de agua para su purificación por cantidad de biodiesel producido.

Una alternativa técnicamente viable para evitar este inconveniente es la utilización de enzimas que no generan este subproducto. Se estudió la transesterificación enzimática con 2 lipasas: lipasa pancreática de cerdo (LPC) y lipasa de *thermomices* (TTL). La lipasa TTL presentó los mejores porcentajes de producción.

Finalmente, se estudió la producción de biodiesel por el método enzimático en mini biorreactores tipo tanque agitado de 10 mL. Mediante un diseño experimental se determinaron las mejores condiciones de operación: pH 11.0, 40°C y una agitación de 1600 rpm.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Borra del café

La borra del café constituye un residuo urbano de importancia, tanto por las cantidades en que es generado (Tabla 1) como por su composición: contiene entre 10 y 20 % de lípidos, que pueden ser aprovechados para su transformación a biodiesel (<http://biodiesel.com.ar/5230/brasil-generan-biodiesel-con-la-borra-de-cafe>).

La composición de la borra de café la podemos observar en la Tabla 1 (Mussatto. 2011), en donde comprobamos la presencia de aceites.

**Tabla 1. Compuestos presentes en la borra de café**

Component	Arabica <sup>a</sup>	Robusta <sup>a</sup>	Constituents
Soluble carbohydrates	9–12.5	6–11.5	
Monosaccharides		0.2–0.5	Fructose, glucose, galactose, arabinose (traces)
Oligosaccharides	6–9	3–7	Sucrose (>90%), raffinose (0–0.9%), stachyose (0–0.13%)
Polysaccharides		3–4	Polymers of galactose (55–65%), mannose (10–20%), arabinose (20–35%), glucose (0–2%)
Insoluble polysaccharides	46–53	34–44	
Hemicelluloses	5–10	3–4	Polymers of galactose (65–75%), arabinose (25–30%), mannose (0–10%)
Cellulose, $\beta$ (1–4)mannan	41–43	32–40	
Acids and phenols			
Volatile acids		0.1	
Nonvolatile aliphatic acids	2–2.9	1.3–2.2	Citric acid, malic acid, quinic acid
Chlorogenic acid	6.7–9.2	7.1–12.1	Mono-, dicaffeoyl-, and feruloylquinic acid
Lignin		1–3	
Lipids	15–18	8–12	
Wax		0.2–0.3	
Oil		7.7–17.7	Main fatty acids: 16:0 and 18:2 (9,12)
N compounds		11–15	
Free amino acids		0.2–0.8	Main amino acids: Glu, Asp, Asp-NH <sub>2</sub>
Proteins		8.5–12	
Caffeine	0.8–1.4	1.7–4.0	Traces of theobromine and theophylline
Trigonelline	0.6–1.2	0.3–0.9	
Minerals		3–5.4	

From Belitz et al. (2009)

<sup>a</sup> Values in percent dry-weight basis

### 1.2. Aceites extraídos del café

Los aceites extraídos del café son de mejor calidad (mayoritariamente triglicéridos) que los obtenidos de otras fuentes alternativas de aprovechamiento de residuos tales como los aceites vegetales usados y las grasas animales. Se ha reportado. (Moreira y col. 2011) que

los aceites procedentes del café pueden transformarse, mediante el proceso convencional de transesterificación con un rendimiento del 100 %, en un biodiesel de elevada calidad (51.4 % ésteres saturados y 48.6 % ésteres insaturados) y estabilidad que puede ser utilizado industrialmente como alternativa al diesel tradicional.

### 1.3. Biodiesel

El biodiesel es definido como un combustible de mono-aquil ésteres de una cadena larga de ácidos grasos, derivados de aceites vegetales o grasas animales, designado B100. Un mono-aquil éster es el producto de una reacción de una cadena lineal de alcohol (etanol o metanol), con una grasa animal o aceite vegetal (triglicérido) para formar glicerol (glicerina) y ésteres de cadena larga de ácidos grasos (Van Gerpen., 2004). La producción de biodiesel se ha basado en un fundamento químico que se resume en la Figura 1:

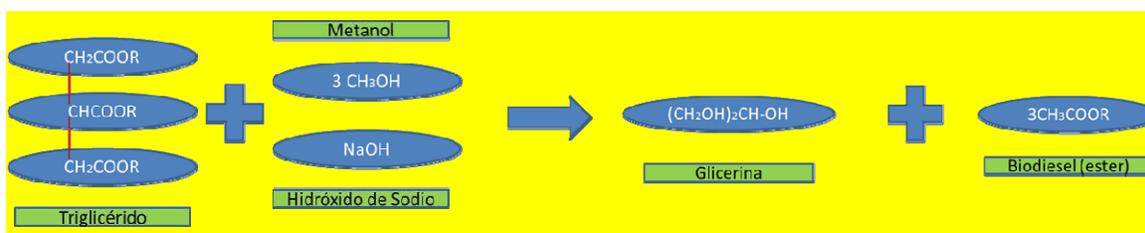


Figura 1. Ecuación de transesterificación

Donde **R** corresponde a las cadenas de carbono largas y átomos de hidrógeno, a veces llamadas cadenas de ácidos grasos. Existen cinco tipos de cadenas, que son las más comunes en los aceites vegetales y las grasas animales.

La producción de biodiesel a partir de grasas saturadas como aceites vegetales, cebo animales o grasas recicladas se realiza por medio de una transesterificación con alcohol metílico mediado por un catalizador básico mineral que puede ser hidróxido de sodio o hidróxido de potasio y un neutralizador ácido mineral, el más utilizado es el ácido sulfúrico. Esta es la vía más utilizada y se conoce como “Batch processing”. (Van Gerpen., 2004), ya que es la más económica, produce una elevada conversión (98%) con pocas reacciones secundarias y reducido tiempo de reacción, así como conversión directa a éster metílico sin pasos intermedios. (Larosa. 2005).

#### **1.4. Reacción de transesterificación**

La reacción de transesterificación se lleva a cabo en un tanque agitado donde se combinan el alcohol metílico y el aceite o grasa que contiene ácidos grasos libres, donde se obtiene un producto que se hace pasar a través del primer reactor que funciona con un catalizador donde se produce la reacción de esterificación de los ácidos grasos libres. La corriente proveniente de esta unidad se combina en un segundo mezclador, se agrega metanol para una segunda transesterificación, más un pequeño exceso del mismo, y el catalizador. Este producto ingresa en el segundo reactor tubular donde se produce la transesterificación de los triglicéridos.

El producto de la reacción, compuesto por el metil éster, la glicerina, el metanol en exceso y el catalizador, debe ser neutralizado. Para lo cual se mezclan los productos con un ácido mineral. Posteriormente en la unidad de destilación flash FC se despoja al producto de los volátiles, compuestos fundamentalmente por el alcohol metílico en exceso. Los vapores de metanol se condensan y se envían al tanque de almacenamiento para su recuperación.

El producto de fondo del evaporador flash FC, que contiene el metil éster, la glicerina, sales y agua se envía a un decantador continuo, para separar el metil éster del resto de los productos. La fase ligera (biodiesel) se envía al tanque de almacenaje, mientras la fase pesada, glicerina bruta 90%, agua y sales se envía al almacenaje como subproductos. (Larosa. 2005).

La proporción típica de químicos usados para hacer biodiesel es: Reactantes: Triglicéridos e.g. 100 kg y Alcohol primario e.g. 10 kg de metanol. Catalizador: Base mineral e.g. 0.3 kg de hidróxido de sodio. Neutralizador: Ácido mineral e.g. 0.25 Kg de ácido sulfúrico. (Van Gerpen, *y col.* 2004). Otros procesos para la producción de biodiesel son: Continuous Process Systems, High Free Fatty Acid Systems, Non-Catalyzed Systems – Biox Process, Non-Catalyzed Systems – Supercritical Process.

#### **1.5. Biodiesel producido por transesterificación**

El biodiesel se produce por transesterificación de triglicéridos con alcoholes de cadena corta o por la esterificación de ácidos grasos libres de cadena larga de origen vegetal o animal. (Rivera *y col.* 2009). Sin embargo, en una planta tradicional de biodiesel el

tratamiento de agua residual (2 ton por ton de biodiesel) es un problema serio desde el punto de vista energético y ambiental. (Suehara y col. 2005).

Una solución técnica es el uso de lipasas, como se muestra en la Figura 2, las enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones de transesterificación e inter-esterificación en presencia de solventes orgánicos. La producción de biodiesel con enzimas inmovilizadas. (Fjerbaek y col. 2009; Tan y col. 2010), comparadas con los catalizadores alcalinos o ácidos son potencialmente útiles debido a que son capaces de: producir biodiesel en menos etapas usando menos energía, reduciendo drásticamente la cantidad de agua residual, mejorar la separación de productos, producir una mejor calidad de glicerol, y ser más compatible con las variaciones en la calidad de la materia prima reusable. Por otro lado, las desventajas son: bajas tasas de reacción, su costo (1000 USD por kg: comparado con 0.62 USD para hidróxido de sodio), y pérdida de actividad, típicamente dentro de 100 días de operación.

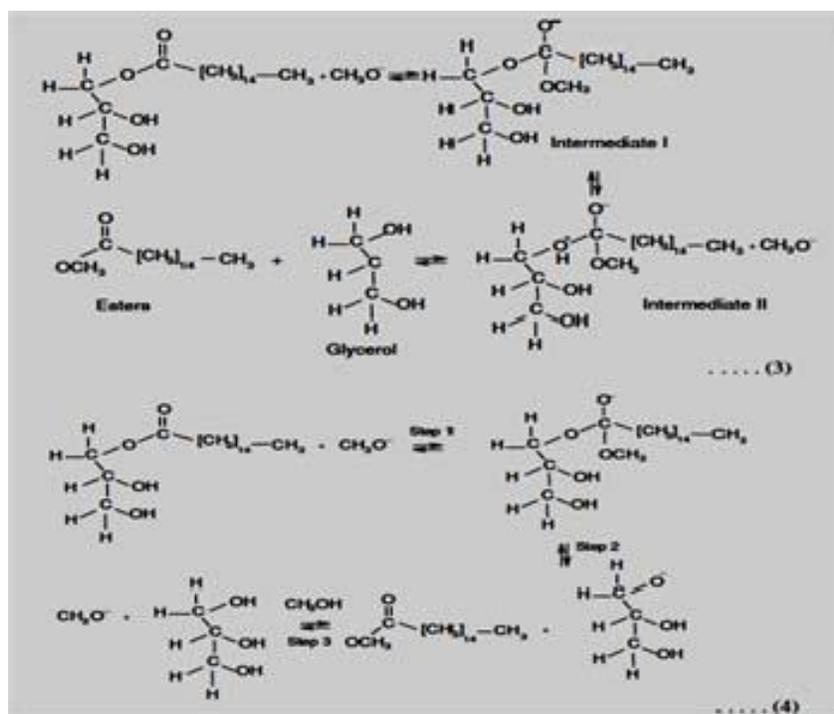


Figura. 2 Mecanismo de reacción en la transesterificación enzimática.

Además, los sistemas enzimáticos heterogéneos presentan serios problemas por limitaciones de transferencia de masa, la presencia de grandes moléculas que requieren difundir a través de pequeños poros para alcanzar la enzima, mientras que reactantes solubles requieren viajar a través de canales llenos de aceite. Igualmente el transporte de masa externo puede presentarse debido a la formación de capas límite alrededor del pellet del soporte. Se ha reportado que el glicerol, subproducto de la reacción, decrece la actividad enzimática. Este efecto sobre limitaciones de transferencia de masa en enzimas inmovilizadas, es debido a que la adsorción del glicerol en soportes sugiere la formación de capas hidrofílicas de agua y glicerol.

### **1.6. Diseño del proceso**

El diseño del proceso debe desarrollarse en un espacio de tiempo relativamente corto y escalarse desde niveles de laboratorio en mililitros hasta miles de litros o más en una planta industrial. Los costos de los retrasos pueden ser del orden de los tres millones de dólares por día. (Willoughby. 2006). El uso de sistemas de biorreactores paralelos (16-48 unidades) a escala de 100 mL puede resultar más efectivo. (Weuster-Botz. 2005). Por lo que hay un gran interés por automatizar mini y micro biorreactores con la capacidad de monitorear y controlar parámetros tales como pH, temperatura y oxígeno disuelto. (Lye y col. 2003); (Micheletti y Lye. 2007). Si la etapa limitante de un proceso es la biorreacción, afectada por inhibición por sustrato y/o producto a concentraciones bajas, esta limitación puede superarse con el uso de biorreactores de partición mediante la adición de una segunda fase que sirva como reservorio de sustrato y remoción de producto. Sin embargo, los biorreactores de partición, deberán satisfacer además áreas de transferencia interfaciales para el suministro de sustrato y remoción *in situ* de producto.

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

Estudios previos de producción de enzimas por fermentación sólida de borra de café demostraron que la actividad enzimática aumentaba cuando el material presentaba un muy bajo contenido de aceite. Por lo que la extracción del aceite de la borra de café para producir biodiesel previo a un proceso de fermentación sólida tendría un doble beneficio en su aprovechamiento.

### **2.1. Diseño y desarrollo de procesos de bioconversión.**

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en el diseño y desarrollo rápido de procesos de bioconversión, lo cual requiere tanto de experimentos a pequeña escala, que permitan obtener información experimental confiable, como del apoyo de técnicas modernas de Ingeniería de bioprocesos para poder determinar las etapas limitantes para desarrollar y optimizar el proceso. Mediante la integración de todos estos elementos (Figura 3), se han obtenido resultados en el desarrollo de técnicas para identificar la etapa limitante de bioprocesos a través del análisis de régimen mediante la determinación de tiempos característicos de los fenómenos involucrados. (Melgarejo-Torres. 2010) y el modelamiento de procesos multifásicos. (Torres-Martínez. 2010).

### **2.2. Prototipos de biorreactores de tanque agitado.**

El obtener datos experimentales confiables con la información suficiente para el diseño de bioprocesos a otras escalas, se facilita mediante el uso de plataformas de mini reactores que permitan llevar a cabo experimentos de manera simultánea variando no sólo medios de cultivo sino también condiciones de operación (temperatura, agitación, etc).

En nuestro grupo de trabajo se han construido dos prototipos de biorreactores tipo tanque agitado: uno de dos unidades de 100 ml y otro de cuatro unidades de 10 ml que trabajan de manera independiente.

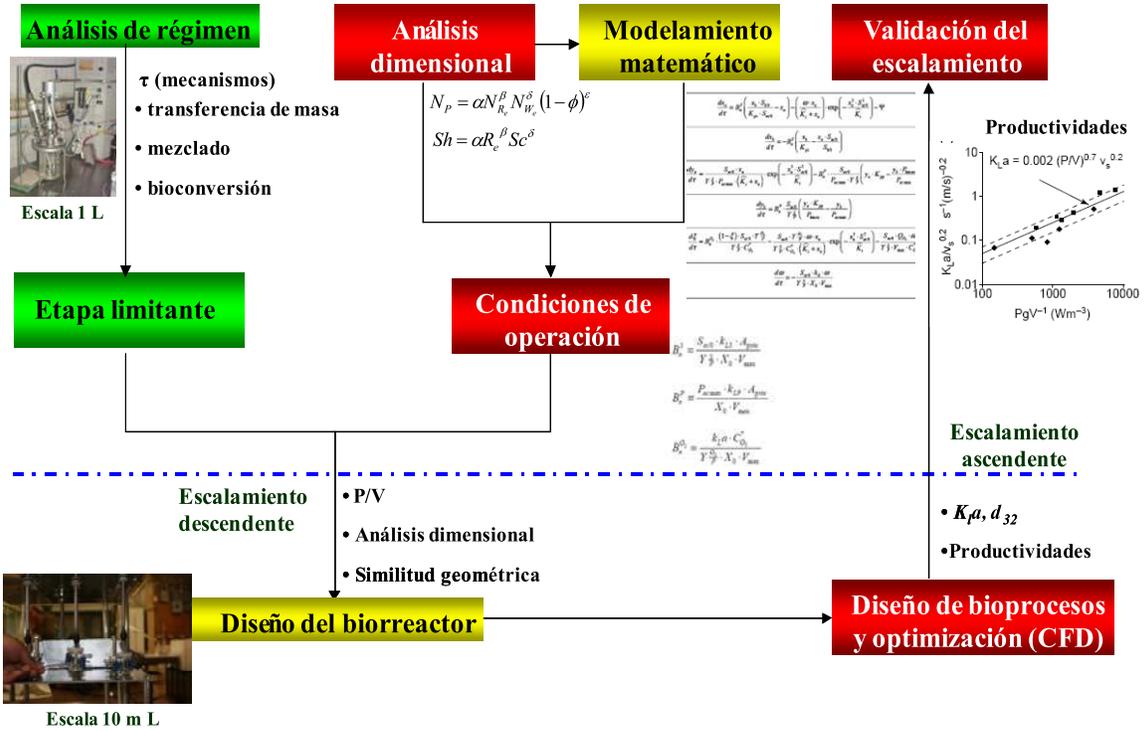


Figura 3. Esquema de las etapas relevantes para el diseño y optimización de bioprocesos

### 3. JUSTIFICACIÓN

Ante la reducción de las reservas de petróleo crudo en México, es necesario buscar fuentes alternativas de combustibles tales como: Bioetanol, biohidrógeno, biodiesel, etc. El Biodiesel es una alternativa interesante, a pesar de que la tecnología actual presenta dos grandes inconvenientes: el tratamiento de agua residual (2 ton por ton de biodiesel) lo cual es un problema serio desde el punto de vista energético, ambiental y el origen de la materia prima, pues ésta no debe competir con el sector alimentario. Por otra parte, el uso de enzimas (lipasas) en la producción de biodiesel, permite producir biodiesel en menos etapas usando menos energía y reduciendo drásticamente la cantidad de agua residual, además de mejorar la separación de productos y producir una mejor calidad de glicerol, asimismo ser más compatible con las variaciones en la calidad de la materia prima reusable. Sin embargo, el uso de lipasas presenta dos grandes desventajas: bajas tasas de reacción y su costo (1000 USD por kg comparado con 0.62 USD para hidróxido de sodio).

Además, estos sistemas enzimáticos heterogéneos presentan serios problemas por limitaciones de transferencia de masa, lo cual requiere del estudio de éstos fenómenos para identificar la etapa limitante, mediante un estudio de análisis de régimen, determinación de tiempos característicos de los fenómenos involucrados (tasa de reacción, mezclado, transferencia de masa, etc.) y proponer alternativas al diseño del proceso de producción de biodiesel.

Por otro lado, una fuente alternativa de materia prima para la producción de biodiesel, que no compita con el sector alimentario es la borra del café, la cual constituye un residuo urbano de importancia, tanto por las cantidades en que es generado como por su composición: contiene entre 10 y 20 % de lípidos. Los aceites extraídos del café son de mejor calidad (mayoritariamente triglicéridos) que los obtenidos de otras fuentes alternativas de aprovechamiento de residuos, tales como los aceites vegetales usados y las grasas animales. Mediante procesos convencionales de transesterificación se han reportado rendimientos del 100%, con un biodiesel de elevada calidad (51.4% ésteres saturados y 48.6% ésteres insaturados) y estabilidad, que puede ser utilizado industrialmente como alternativa al biodiesel tradicional.

Por lo mencionado anteriormente, en este trabajo se plantea un estudio sistemático del proceso basado en experimentos a pequeña escala en una plataforma de mini bioreactores de 100 ml para diseñar un proceso de producción de biodiesel a partir del aceite de la borra de café.

#### **4. HIPÓTESIS**

El aceite de la borra de café es un subproducto agroindustrial que puede ser utilizado para producir biodiesel, por el método químico (alcalino) y enzimático (lipasas).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Diseñar un proceso para la producción de biodiesel a partir de aceite de borra de café en mini biorreactores tipo tanque agitado de 10 mL.

### **5.2. Objetivos particulares**

- ✓ Determinar el método de extracción, la cantidad de aceite extraído y los compuestos presentes en el café tostado de diferentes regiones.
- ✓ Establecer el método de transesterificación, cantidad y características reológicas del biodiesel producido a partir del aceite de la borra de café.
- ✓ Precisar la tasa intrínseca de transesterificación de la lipasa para la producción de biodiesel.
- ✓ Determinar el efecto de las condiciones de operación en la producción de biodiesel en mini biorreactores de 10 mL.

## 6. METODOLOGIA Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1. Métodos de producción de biodiesel.

Las líneas de producción de biodiesel estudiadas se muestran en la Figura 4:

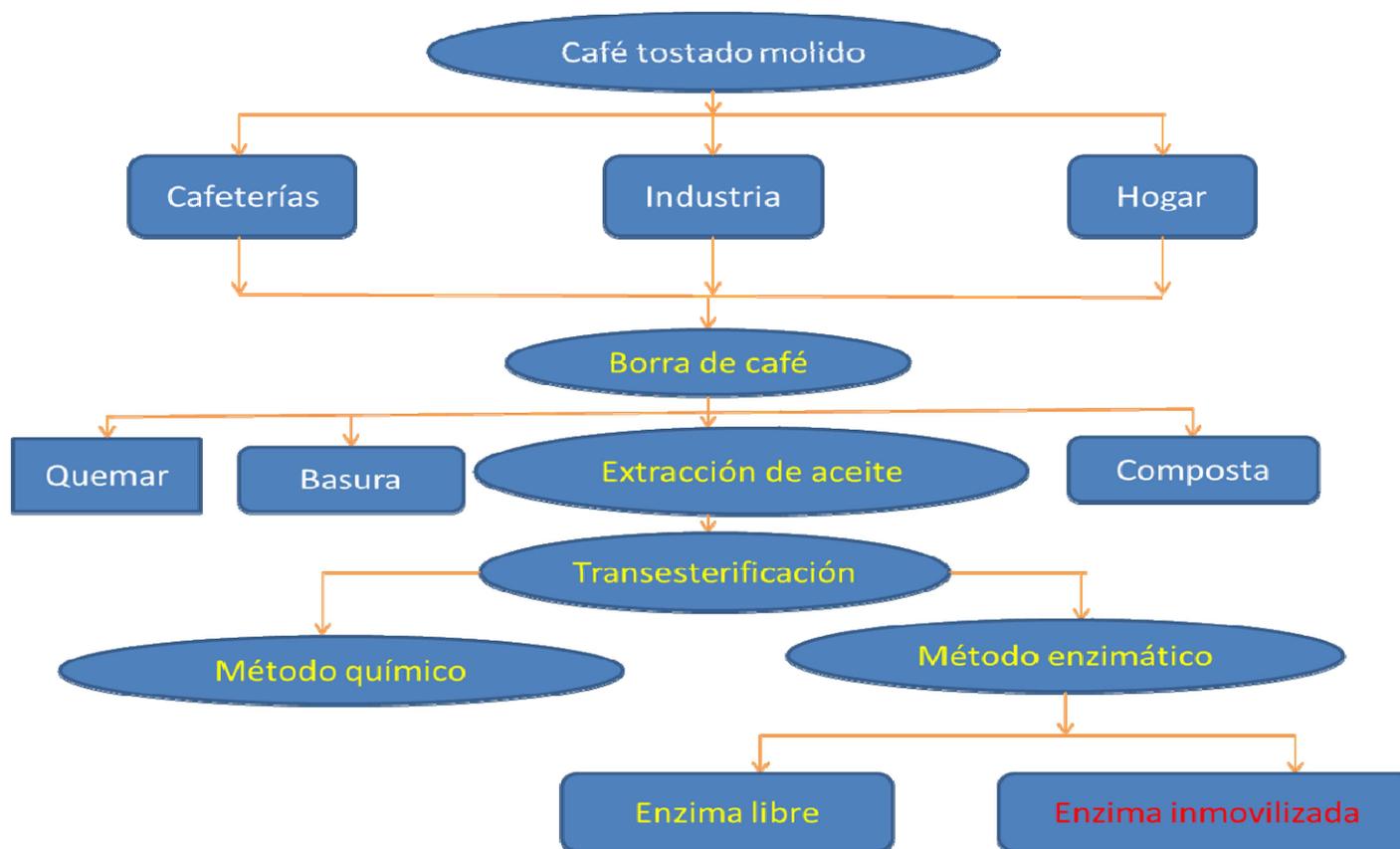
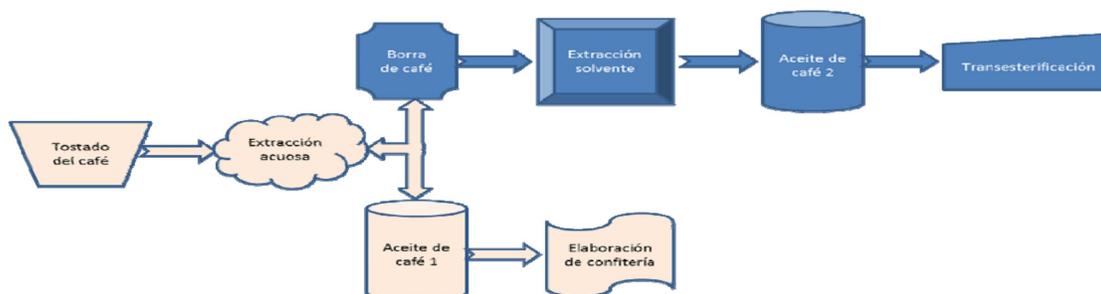


Figura 4. Métodos de producción e investigación para la obtención de biodiesel

## 6.2. Extracción de aceite de café

El proceso de extracción se llevó a cabo en dos etapas: La primera por medio de una extracción acuosa, donde se obtienen todos los aceites volátiles presentes en el café tostado y que son los más apreciados dentro del ámbito del consumo del café, que confieren el aroma, sabor y olor. Esta se lleva a cabo en el proceso de percolación en las cafeterías e industrias, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5. Métodos de extracción a partir de café tostado**

En esta técnica de extracción de aceite es importante tener en cuenta los parámetros de tostado y región de producción de café, para conocer la cantidad de aceite presente en el grano de café, así como la disponibilidad de aceite después del proceso de tostado; en el cual se engloban 4 tipos de tostado que son: claro, medio, oscuro y cubano

La segunda extracción es por solventes, (Tabla 2), en la cual se obtienen todos los aceites que no fueron removidos por el método anterior, los cuales se utilizarán para la transesterificación.

**Tabla 2.** Procesos de extracción de aceite en el café tostado y borra de café

a) Obtención de la borra de café;	b) Tamizado y limpieza de la borra;
c) El mezclado de la borra de café con agua y alcohol;	d) Extracción del aceite del contenedor;
e) Separación de la mezcla de agua, alcohol y borra;	f) Purificación del aceite extraído (triglicéridos) sólidos-líquidos;
g) Almacenaje del aceite en contenedores oscuros.	

### 6.3. Transesterificación

Los triglicéridos o triacilglicéridos, en presencia de un alcohol más una base, promueven una reacción denominada transesterificación, reacción bien conocida y descrita como hidrólisis alcalina. De modo general, la transesterificación es la reacción de un lípido con un alcohol, produciéndose un éster y un subproducto, o glicerol. (Sheehan y col. 1998). El proceso global de transesterificación de aceites vegetales y grasas es una secuencia de tres reacciones reversibles y consecutivas, en que los monoglicéridos y los diglicéridos son los intermediarios. Los triglicéridos son convertidos a diglicéridos, los cuales son convertidos en monoglicéridos y posteriormente, en glicerol (Haas y col. 2006). Cada etapa produce una molécula de éster de un ácido graso. Si la reacción es incompleta, habrá tri, di y monoglicéridos mezclados. Cada uno de estos componentes todavía contiene una molécula de glicerol que puede ser liberada. Este glicerol se denomina glicerol ligado. Cuando este último es sumado al glicerol libre obtenemos el glicerol total.

Cada molécula de aceite, contenido en grasas de plantas y animales, tienen la misma configuración y sólo difiere en la longitud de la cadena de carbono o en el número de dobles enlaces, lo cual produce diferentes puntos de fusión, estabilidad de oxidación, etc.

En esta reacción, son necesarias tres moles de alcohol por cada mol de triglicérido. En la práctica, se utiliza siempre exceso de alcohol. La conversión de equilibrio de este proceso es usualmente baja a temperaturas moderadas.

#### 6.3.1. Método químico.

La reacción de transesterificación se muestra en la Figura 6.

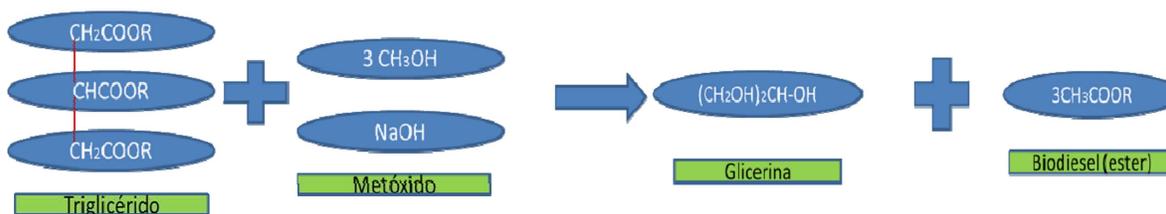
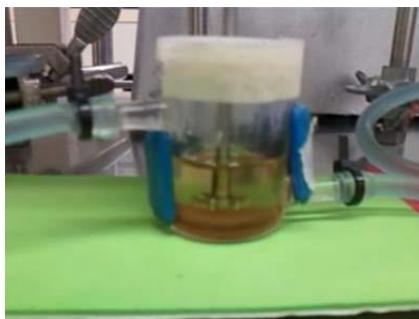


Figura 6. Ecuación de transesterificación por el método químico

En la transesterificación se debe tener en cuenta el contenido de agua y ácidos grasos libres de la materia prima, debido a que la presencia del agua puede causar la saponificación del éster y puede consumir el catalizador y reducir la eficacia de la reacción. El contenido máximo de ácidos grasos libres debe ser de 0.5%. para poder realizar la reacción de transesterificación (CORPODIB. 2003). La presencia del agua tiene un efecto negativo mayor que el de los ácidos grasos libres. (Ma y col. 1998) indicaron que el contenido en agua debe estar por debajo de 0.06% para asegurar una correcta reacción y así evitar la formación de jabón.

El procedimiento para la producción de biodiesel por el método químico se describe a continuación: 1. Filtrado del aceite. El aceite obtenido a partir de la borra de café se filtró utilizando una bomba de vacío, este procedimiento tardó aproximadamente una hora por cada litro de aceite. Se utilizaron filtros de 11  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. El aceite filtrado se conservó en un recipiente cerrado. 2. Reacción de transesterificación. La reacción se llevó a cabo utilizando diferentes relaciones molares aceite: triglicérido (1:3, 1:4 y 1:5), a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C) Antes de llevar a cabo la reacción, se mezclaron el hidróxido de sodio y el metanol, y se llevaron a la temperatura de reacción utilizando un baño María, mezclando continuamente; de esta forma se obtuvo el metóxido de sodio. Posteriormente se mezcló el metóxido de sodio con el aceite y se dejó reaccionar durante una hora a temperatura (40, 50 y 60 °C) y agitación (1600 rpm) constantes. Durante el tiempo de reacción se tomaron muestras cada minuto, las cuales se congelaron para detener la reacción y analizarlas posteriormente. 3. Separación del biodiesel. Una vez transcurrida una hora de reacción, el producto de reacción se colocó en un embudo de separación a temperatura ambiente y se dejó en reposo durante 3 horas, o hasta que se obtuvieran 2 fases bien definidas. La fase obtenida al fondo fue más viscosa, opaca y de color café, y contiene glicerina. En la parte superior se obtiene una fase cristalina de color amarillo que es el biodiesel (ver figura 7). 4. Lavado del biodiesel. Las fases descritas en el punto anterior, se separan y el biodiesel se lava añadiéndole un volumen equivalente de agua y agitándolo durante 10 minutos para que el metanol alimentado en exceso y el hidróxido de disuelvan en el agua. Posteriormente se separan las fases por decantación. Esta operación se realizó 2 veces para obtener un biodiesel con la pureza deseada. 5. Secado del biodiesel. Finalmente se elimina el agua que haya quedado en el biodiesel, calentando éste a una temperatura

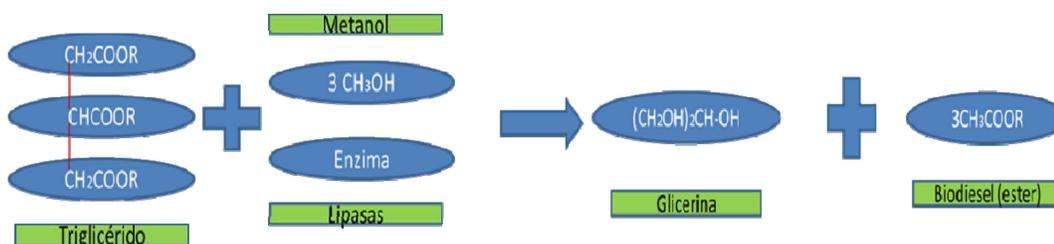
mayor que la temperatura de ebullición del agua, durante una hora. 6. Análisis de las muestras. Las muestras obtenidas durante la reacción se analizaron por cromatografía de gases, el cual consiste en incrementar la temperatura de la columna de 70 °C a 300 °C a una tasa de 10 °C por minuto y mantener la temperatura por 3 minutos a 300 °C. Se comparan los tiempos de retención y las áreas de los picos de ácidos grasos y biodiesel estándares.



**Figura 7. Producción de biodiesel en mini reactores por el método químico**

### 6.3.2. Método enzimático

Se utilizó la Lipasa pancreática de cerdo (tipo II, L3126, Sigma-Aldric) en forma libre y la TTL (Sigma-Aldric), en la cual observamos sus comportamientos en la biotransformación del aceite a biodiesel. Como lo mostramos en la Figura 8. Respetando las mismas condiciones de operación descritas en el método químico.



**Figura 8. Ecuación de transesterificación por el método enzimático**

El procedimiento para la producción de biodiesel por el método enzimático se describe a continuación: 1. Filtrado del aceite. El aceite obtenido a partir de la borra de café se filtró utilizando una bomba de vacío, este procedimiento tardó aproximadamente una hora por cada litro de aceite. Se utilizaron filtros de 11 µm de tamaño de poro. El aceite filtrado se conservó en un recipiente cerrado. 2. Reacción de transesterificación. La reacción se llevó a

cabo utilizando diferentes relaciones molares aceite: metanol a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C) Antes de llevar a cabo la reacción, se adiciono 0.1 ml de enzima con 0.1 ml de metanol, mezclando con el aceite y se dejó reaccionar durante cuatro horas a temperatura y agitación (1600, 1800 y 2000 rpm) constantes. Durante el tiempo de reacción se fue adicionando el metanol cada 20 minutos hasta alcanza un ml de metanol, las muestras tomadas se congelaron para detener la reacción y analizarlas posteriormente. 3. Obtención del biodiesel. Una vez transcurrida la reacción, se obtiene una fase cristalina de color amarillo que es el biodiesel (ver figura 15). 4. Secado del biodiesel. Finalmente se elimina el metanol que haya quedado en el biodiesel, calentando éste a una temperatura mayor que la temperatura de ebullición del metanol, durante una hora. 6. Análisis de las muestras. Las muestras obtenidas durante la reacción se analizaron por cromatografía de gases, el cual consiste en incrementar la temperatura de la columna de 70 °C a 300 °C a una tasa de 10 °C por minuto y mantener la temperatura por 3 minutos a 300 °C. Se comparan los tiempos de retención y las áreas de los picos de ácidos grasos y biodiesel estándares.

Se utilizó el medio de reacción reportado por (Ruzich y Bassi. 2010), en mini reactores tipo tanque agitado de 10 mL a diferentes condiciones de operación.

La actividad enzimática se cuantificó mediante la determinación de los ésteres de ácidos grasos obtenidos, los cuales se analizaron por cromatografía de gases utilizando una columna HP-5 (crosslinked 5% PH ME Siloxane, 0.32 mm×30 m) y un detector FID. Se utilizó el método descrito por (Seok Yang y col. 2009), el cual consiste en incrementar la temperatura de la columna de 70 °C a 300 °C a una tasa de 10 °C por minuto y mantener la temperatura por 3 minutos a 300 °C. Se comparan los tiempos de retención y las áreas de los picos de ácidos grasos y biodiesel estándares.

#### **6.4. Mini reactores**

Para los experimentos de producción de biodiesel, se utilizó una plataforma de cuatro mini reactores de 10 mL construida en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (Figura 9). Los mini reactores son de vidrio con un volumen de operación de 10 ml y cuentan con una chaqueta para control de temperatura. Se agitan mecánicamente mediante una turbina tipo Rushton y los cuatro se pueden operar de manera independiente a diferentes velocidades de agitación.



Figura 9. Plataforma de mini reactores de 10 mL.

### 6.5. Diseño experimental.

Se realizó un diseño experimental estadístico para determinar la mejor manera de obtener biodiesel por el método enzimático (Tabla 3). Se llevaron a cabo cinéticas de producción de biodiesel a diferentes condiciones de operación de los mini reactores. Se tomaron muestras (200  $\mu$ l) a intervalos de tiempo regulares y se analizaron por Cromatografía de Gases (CG).

Tabla 3. Diseño experimental

Metodo estadístico $2^k$ punto central				
Concentración	Temperatura (°C)	rpm	pH	Clave
1:2	40	1200	9	a
			11	b
		1800	9	c
			11	d
	60	1200	9	e
			11	f
		1800	9	g
			11	h
1:4	40	1200	9	a
			11	b
		1800	9	c
			11	d
	60	1200	9	e
			11	f
		1800	9	g
			11	h
1:3	50	1600	10	A

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Extracción de aceite de café

Se estudiaron 4 tipos de tostado, los cuales fueron: claro, medio, oscuro y cubano. Controlando las variables de tiempo de maduración, fermentación, especie, tamaño de grano y tiempo de secado. Los cuales arrojaron los resultados mostrados en la Tabla 4. De la cual nos enfocamos en el tipo de tostado oscuro ya que tuvo presencia de aceite (P-A).

**Tabla 4. Extracción de aceite de café según el tipo de tostado.**

Características del tostado en el café y la región					
Región	tostado	P-A	Olor	Color	Nota
Chiapas	Claro	S-P	Bajo	Claro	Rechazado
Chiapas	Medio	P-P	Medio	Medio	Aceptado
Chiapas	Oscuro	C-P	Alto	Oscuro	Aceptado
Chiapas	Cubano	V-A-P	Fuerte	Fuerte	Rechazado
Veracruz	Claro	S-P	Bajo	Claro	Rechazado
Veracruz	Medio	P-P	Medio	Medio	Aceptado
Veracruz	Oscuro	C-P	Alto	Oscuro	Aceptado
Veracruz	Cubano	V-A-P	Fuerte	Fuerte	Rechazado
Oaxaca	Claro	S-P	Bajo	Claro	Rechazado
Oaxaca	Medio	P-P	Medio	Medio	Aceptado
Oaxaca	Oscuro	C-P	Alto	Oscuro	Aceptado
Oaxaca	Cubano	V-A-P	Fuerte	Fuerte	Rechazado
Puebla	Claro	S-P	Bajo	Claro	Rechazado
Puebla	Medio	P-P	Medio	Medio	Aceptado
Puebla	Oscuro	C-P	Alto	Oscuro	Aceptado
Puebla	Cubano	V-A-P	Fuerte	Fuerte	Rechazado

Sin presencia (S-P); poca presencia (P-P); con presencia (C-P); volatilidad de aceite presente (V-A-P);

Presencia de aceite (P-A)

#### 7.1.1. Formas de extracción.

Para generar biodiesel a partir de plantas, primero debe obtenerse el aceite contenido en sus semillas, ya sea por medio del prensado mecánico (Extrusión) o mediante la extracción química empleando solventes (Alcoholes). El café tostado presenta un contenido de aceite que varía entre el 10% y el 20% en peso, dependiendo de la variedad de café de que se

trate. El aceite extraído es líquido a temperatura ambiente y presenta una porción grande de insaponificables que varían del 7% al 12%. (Bailey. 1961); Calle. 1975).

Al extraer este aceite, que varía según el método de extracción usado, ya que por el método de extrusión se obtiene un rendimiento que varía entre un 7 y 8% de aceites volátiles. (López. 2007) o la extracción acuosa que fluctúa entre el 6 y el 10 % y el resto de los aceites se encuentran en la borra los cuales serán aprovechados para la transesterificación.

### 7.1.2. Rendimientos de aceite obtenido.

El aceite obtenido se purificó por medio de calor a 110 °C con agitación para eliminar el alcohol y agua, ya que el aceite tiene un grado de evaporación más alta que éstos. La borra también se pesó en seco para su mejor cuantificación. El rendimiento de extracción ( $R$ ) se obtuvo mediante la ecuación:

$$R = \frac{\text{g aceite obtenido}}{\text{g borra de café utilizado}} 100$$

De estos datos obtuvimos un rendimiento ( $R$ ) entre el 6% y 10% de aceite en la borra de cafeterías (solvente acuoso) y entre el 7% y 8% de aceite en la borra procesos industriales (solvente alcohol). Como lo observamos en la Tabla 5. Con un tostado medio el cual es más común en los diferentes lugares donde se obtuvo la borra.

**Tabla 5. Resultados de la extracción del aceite de café de 4 regiones del país con un tostado medio por los 2 métodos de extracción acuoso (azul) y solvente (rosa).**

Extracción de aceite de café						
Tipo	Cantidad MP (Kg)	Especie	Solvente	Cantidad ob (lt)	Anotación	% de extracción
C-T- Chiapas	12	arabiga	acuoso	11.5	A-F	9.58
C-T-Veracruz	12	arabiga	acuoso	8.5	A-F	7.08
C-T-Oaxaca	12	arabiga	acuoso	7.8	A-S	6.50
C-T-Puebla	12	arabiga	acuoso	9.2	A-D	7.67
B-C Chiapas	12	arabiga	Alcohol	9.8	S-A	8.17
B-C Veracruz	12	arabiga	Alcohol	9.5	S-A	7.92
B-C Oaxaca	12	arabiga	Alcohol	9.2	S-A	7.67
B-C Puebla	12	arabiga	Alcohol	9.4	S-A	7.83

Cabe mencionar que en esta técnica de extracción de aceites, el tostado fue oscuro y es de gran importancia ya que a mayor grado de tostado se desprende mayor cantidad de aceite del grano, la primera extracción de aceite se obtuvo por el método de extracción acuosa de la obtuvimos la cantidad de 6.5-9.6 % de aceite volátil el cual es utilizado en la industria de alimentos y por el segundo método de extracción de aceite que fue por el método de solventes donde obtuvimos de 7.7-8.2 % de extracción de aceite de la borra de café la cual será utilizado para la producción de biodiesel y que no es utilizado actualmente.

Otro factor que determina la concentración de aceite es la región, ya que con la misma variedad de café y a la misma cantidad, la presencia de aceite varía de manera considerable desde un 14.2 % de aceite total en la región de Oaxaca, hasta un 17.8 % de aceite total en la región de Chiapas, aplicando los 2 métodos de extracción (Tabla 6).

**Tabla 6. Extracción total de aceites por los 2 métodos propuestos con café de diferentes regiones.**

Extracción de aceite total			
Región	E-A %	E-S %	E-T %
Chiapas	9.58	8.17	17.8
Veracruz	7.08	7.92	15.0
Oaxaca	6.50	7.67	14.2
Puebla	7.67	7.83	15.5

Extracción acuosa (E-A); Extracción por solvente (E-S); Extracción total (E-T)

### 7.1.3. Extracción por solventes

Con el equipo Soxhlet aplicamos 2 solventes para la extracción del aceite presente en la borra de café con lo cual obtuvimos 8.72 % de aceite utilizando hexano y con etanol 7.90 %. Con lo cual nos damos cuenta que no existe una diferencia significativa en el proceso de extracción del aceite, ya que es de menos 1%. Con base en estos resultados se decidió utilizar etanol. Por ser un solvente más barato y menos tóxico que el hexano (Figura 10).

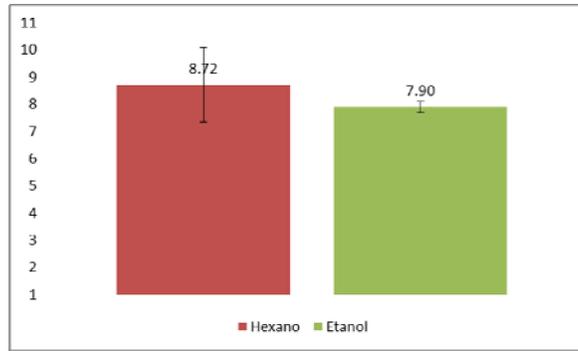


Figura 10. Porcentaje de aceite de café obtenido por 2 tipos de solventes.

Al aceite obtenido se le realizó una prueba de cromatografía de gases acoplado a masas por medio de la cual se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 11. En ellos se observa que no existe ningún tipo de aceite volátil y que sólo se encuentran aceites más pesados y que estos pueden ser aprovechados para la producción de biodiesel.

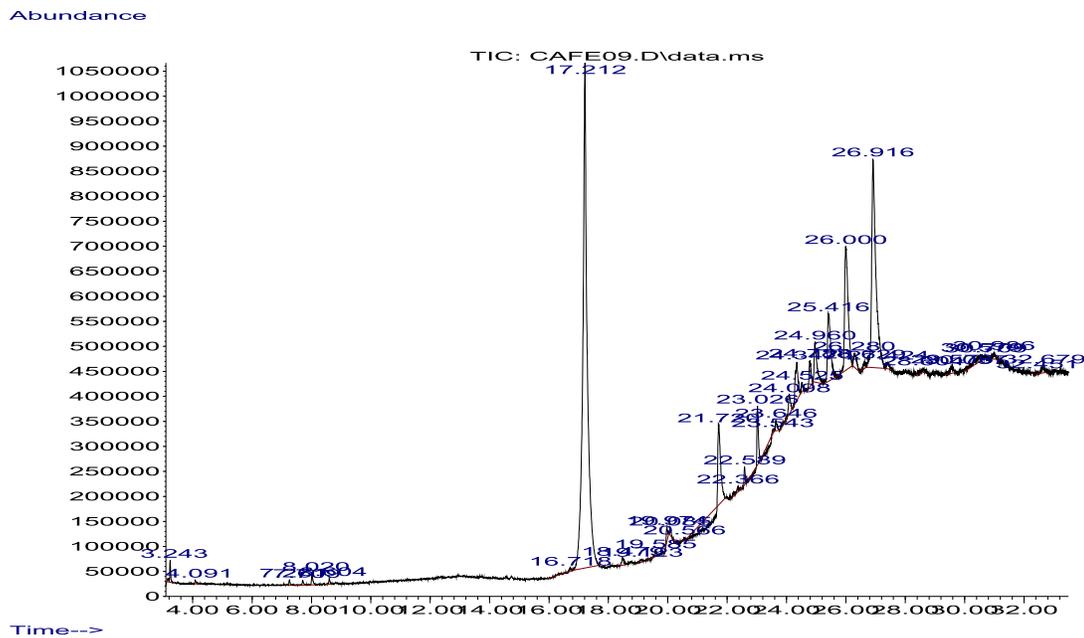


Figura 11. Cromatograma en el CG-Masas del aceite de café

El análisis de GC-masas se llevó a cabo a condiciones estándares de operación para la determinación de los compuestos presentes en este tipo de aceites. En la Tabla 7 se muestra el porcentaje de incertidumbre, el número del elemento, el nombre del compuesto y los aceites presentes.

**Tabla 7. Principales compuestos presentes en el aceite de café determinados con GC-Masas.**

Determinación de compuestos en el aceite de café por GC-Masas			
Número del elemento	Compuesto	% de asertividad	Decisión
17.212	Ácido Oleico	99	Aceptado
26.916	Gamma sitosterol	98	Aceptado
26.000	Campesterol	98	Aceptado
21.720	9-Octadecenal	95	Aceptado
23.020	Eicosane	95	Aceptado
22.366	1-nonadecene	90	Traza
20.080	7-Pentodecyne	96	Traza
19.970	7-pentodecyne	93	Traza
16.716	9,17-Octadecadienal	90	Traza
8.018	2,4-Decadienal	93	Traza
3.245	Benceno	95	Traza

Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos por López. (2007) en los cuales se registraron los diferentes aceites volátiles que se presentan en la primera extracción de aceites por extrusión, los cuales salen con agua caliente y presión, proceso común encontrado en cafeteras de hogar llamadas percoladoras o cafeteras de grupos halladas en cafeterías.

## 7.2. Transesterificación

### 7.2.1. Producción de biodiesel por el método químico

Al aceite limpio, se le somete al proceso de transesterificación, en donde se obtiene biodiesel y glicerina. Este proceso se realizó mezclando el aceite con etanol e hidróxido de sodio (NaOH), con calentamiento y agitación. Al final de este proceso, la glicerina se precipita (color opaco), mientras que el diesel se mantiene en la parte superior (color claro), como se muestra en la Tabla 8. La conversión obtenida de aceite extraído hacia biodiesel fue de más del 90%. Para finalizar el proceso, el biodiesel es sometido a lavados para la eliminación de residuos.

Con este método comprobamos que el aceite de café es un buen candidato a la transesterificación obteniendo un alto rendimiento de conversión, con el inconveniente de los lavados, ya que se requiere del doble de cantidad de agua por cantidad de biodiesel para su purificación.

**Tabla 8. Cantidad de biodiesel obtenido por el método químico.**

Biodiesel apartir de aceite de café								
Método	Cantidad (ml)	Solventes *	Mezcla	Porcentaje (%)	Biodiesel (ml)	Glicerina (ml)	Lavado	Nota
Quimico	200	Básico 0.5 %	1 : 3 A	0.5	191	9	si	opaco
Quimico	200	Básico 25 %	1 : 3 B	25	192	8	si	claro
Quimico	200	Básico 0.5 %	1 : 4 A	0.5	191	9	si	opaco
Quimico	200	Básico 25 %	1 : 4 B	25	192	8	si	claro

\* Alcohol-NaOH

#### 7.2.1.1. Producción en reactores.

Con los resultados obtenidos, se decidió estudiar el efecto de la agitación en el proceso de transesterificación, para lo cual se realizaron los experimentos con base a los parámetros de operación que se muestran en la Tabla 9, Para su aplicación en reactores de 10 mL.

**Tabla 9. Condiciones de operación para el método químico en reactores**

Proporción Aceite.Alcohol	RPM	Temperatura (°C)	pH	Solución Alcalina (ml)	Aceite
1:3	1400	40	6	0.8	5.6
	1600				
	1800				
	2000				

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10, en la cual se muestra una mayor cantidad de conversión con respecto a otras investigaciones realizadas. (Betanzos y col. 2010). Donde ellos hacen una conversión utilizando aceite quemado de la cafetería de la UAM Azcapotzalco utilizando enzimas y método químico.

**Tabla 10. Comparación de % en la producción de biodiesel**

Tabla comparativa en la producción de biodiesel				
Metodo	Mezcla	Solvente	% de conversión (A.Q) *	% de conversión (A.B.C)
Quimico	1 : 3 A	Básico	70	95.5
Quimico	1 : 3 B	Básico	74	96
Quimico	1 : 4 A	Básico	78	95.5
Quimico	1 : 4 B	Básico	82	96

\* Betanzos y col., 2010.

#### 7.2.1.2. Análisis cromatográfico.

Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante CG-masas (Ver anexos de Cromatógrafo y preparación). Los resultados obtenidos a diferentes velocidades de agitación se muestran en la Figura 12.

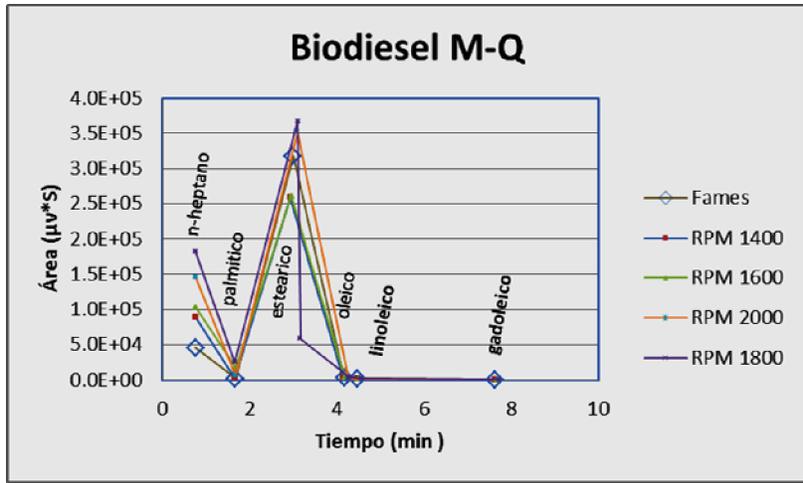


Figura 12. Proporción de FAMES del biodiesel producido a diferentes rpm.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 12 se observa la presencia de cinco ésteres y la concentración de éstos se incrementa al aumentar la velocidad de agitación. El mayor rendimiento se obtuvo a 1800 rpm.

7.2.1.3. Pruebas reológicas.

Se llevaron a cabo pruebas reológicas con el reómetro Kinexus de Malvern, con geometría cono-plato 4 de ángulo 40 de diámetro, al biodiesel producido a 1800 rpm, los resultados se muestran en la Figura 13. Donde se observa la deformación que tiene el biodiesel durante un periodo de tiempo bajo condiciones de stress que nos indica que se comporta como un pseudoplástico (esto mejora la combustión en el motor, ya que se adhiere sus paredes).

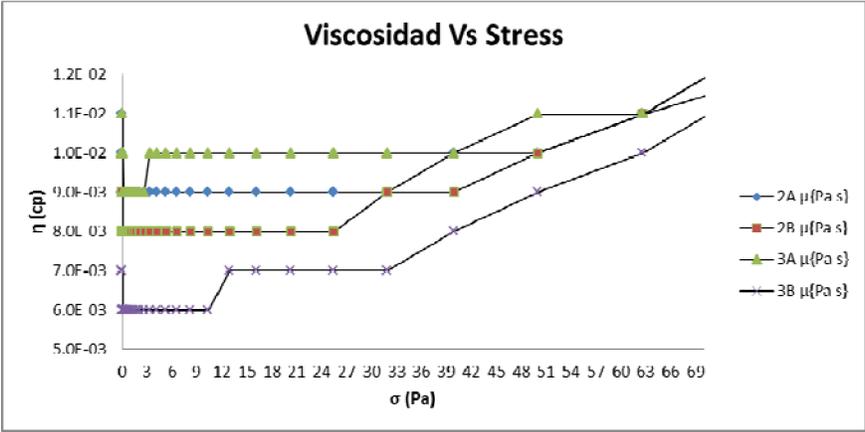
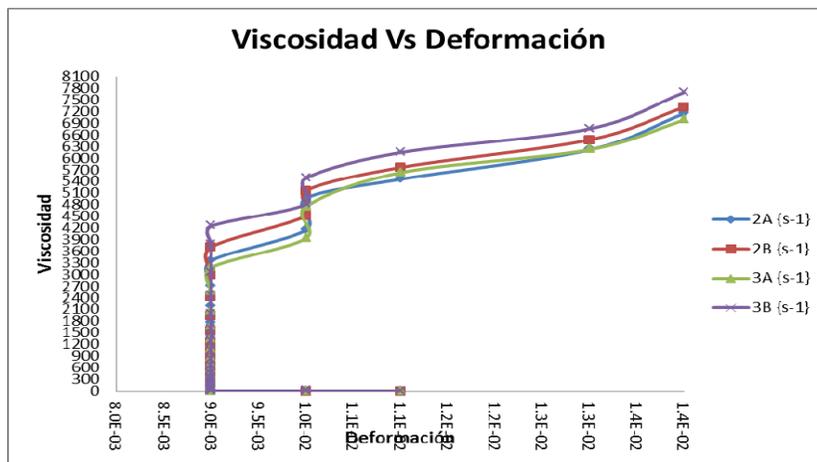


Figura 13. Biodiesel sometido a diferentes presiones de corte

En la Figura 14 se representa la respuesta que tiene el biodiesel a diferentes presiones de corte, con el cual determinamos que se comporta como un fluido newtoniano (hace disponible el acceso hacia el motor para su combustión).



**Figura 14. Biodiesel a diferentes grados de deformación**

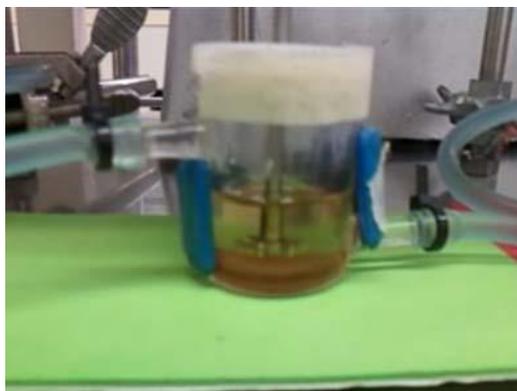
## 7.2.2. Producción de biodiesel por el método enzimático

### 7.2.2.1.- Enzimas utilizadas.

Se probaron 2 tipos de enzimas: la lipasa pancreática de cerdo (LPC) y la lipasa de *Termomyces lanuginosus* (TTL). La transesterificación se llevó a cabo a diferentes velocidades de agitación (rpm) para conocer su comportamiento en el biorreactor de 10 mL.

### 7.2.2.2. Variables en la producción de biodiesel.

Durante el proceso enzimático de transesterificación en los mini-biorreactores de 10 ml Figura 15, se controlaron la temperatura, proporción (aceite-alcohol) y pH; la tasa de agitación fue la variable que se movió para conocer su efecto en la producción de biodiesel.

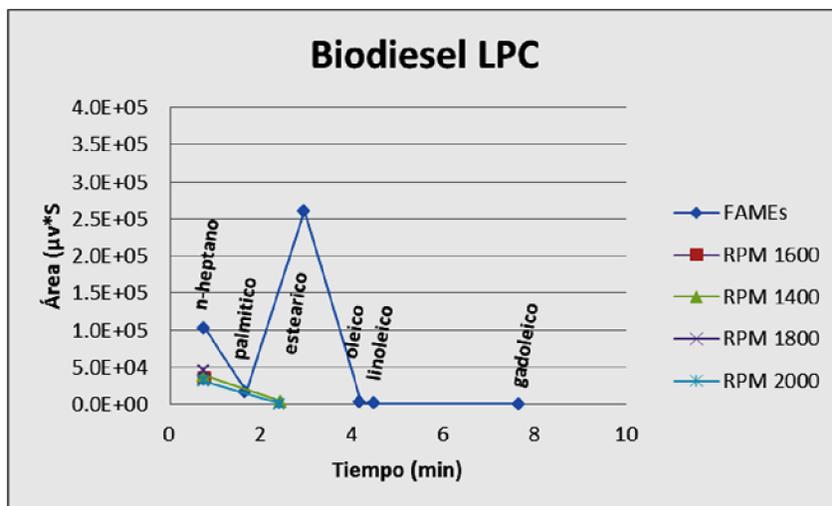


**Figura 15. Biodiesel obtenido en la reacción enzimática**

Con esto se comprobó que la tasa de agitación (rpm) es de interés ya que también se observaron diferencias en la proporción de FAMES durante la producción de biodiesel.

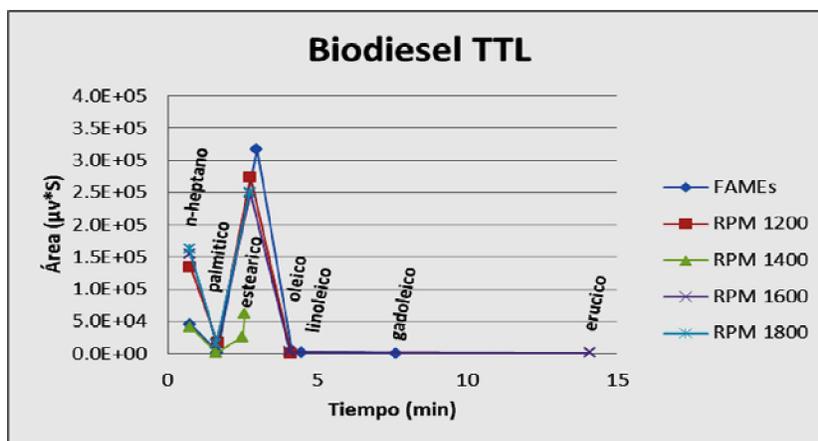
#### 7.2.2.3. Producción de FAMES por lipasas.

Las muestras obtenidas por el método enzimático fueron analizadas por cromatografía de gases. En las Figuras 16 y 17 se muestran los resultados de la proporción de ácidos grasos de metil ésteres (FAMES) por sus siglas en inglés para las 2 lipasas probadas.



**Figura 16. Biodiesel obtenido por lipasa pancreática de cerdo (LPC)**

Con la LPC se encontró una baja actividad enzimática ya que presentó una baja aparición de ésteres. Con esta enzima sólo aparecieron 2 FAMES en las muestras a 1400 y 2000 rpm.



**Figura 17. Biodiesel obtenido por TTL**

En el caso de TTL a varias condiciones de rpm se encontraron todos las FAMES más 1 nuevo éster, el cual se trata de erucico.

### 7.2.3 Diseño estadístico para la producción enzimática

#### 7.2.3.1. FAMES analizados.

Con los resultados obtenidos de los experimentos anteriores, se decidió hacer un diseño experimental más detallado que permita observar el efecto de las variables de operación sobre la proporción de FAMES. Los resultados del diseño arrojaron los datos presentados en la Tabla 11. Estos datos fueron analizados por medio del paquete estadístico llamado El StatAdvisor en el cual obtuvimos un análisis de varianza Tabla 12, grados de libertad, suma de cuadrados Tabla 13, diagrama de Pareto, gráficas de cubo y optimización de parámetros.

**Tabla 11. Datos de biodiesel analizados por el método estadístico**

M-E	Heptano	Mirístico	Palmitico	Heptadecanoico	Estearico	Oleico	Linoleico
Clave	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
a	2.024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
b	3.855	7.25	2.77	37.13	7.67	3.74	4.61
c	3.772	0.00	0.00	0.00	9.73	0.00	0.00
d	3.906	5.27	2.21	47.26	10.81	7.52	32.38
e	4.958	0.30	0.50	0.00	1.62	0.55	1.34
f	2.067	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
g	4.706	0.00	1.78	2.70	2.34	2.16	3.60
h	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
a	4.674	1.20	0.54	0.72	0.24	0.51	0.57
b	4.623	6.66	2.01	17.20	23.61	8.04	3.65
c	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
d	4.472	0.16	0.43	102.03	71.06	13.32	62.58
e	4.949	0.16	0.41	0.32	0.49	0.00	0.78
f	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
g	2.086	0.17	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00
h	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A	4.759	0.00	23.10	41.98	60.33	11.89	13.55
B	4.439	4.62	0.79	20.94	5.59	2.40	5.21

7.2.3.2.- Análisis de varianza para ésteres de heptadecanoico y esteárico

Se analizan estos ésteres ya que son los más representativos por su concentración y presencia a diferentes condiciones de operación. En este análisis podemos observar que de manera independiente la temperatura y el pH son las variables que influyen en la producción de FAMES así mismo la interrelación de ambos factores.

**Tabla 12. Análisis de varianza de 2 FAMES representativos**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:conc	184,716	1	184,716	0,53	0,4901
B:temp	2533,39	1	2533,39	7,27	0,0308
C:rpm	538,989	1	538,989	1,55	0,2535
D:pH	2497,14	1	2497,14	7,17	0,0316
AB	89,9541	1	89,9541	0,26	0,6269
AC	276,724	1	276,724	0,79	0,4023
AD	83,229	1	83,229	0,24	0,6399
BC	527,32	1	527,32	1,51	0,2583
BD	2650,09	1	2650,09	7,61	0,0282
CD	544,05	1	544,05	1,56	0,2515
Error total	2438,06	7	348,294		
Total (corr.)	12468,1	17			

**Tabla 13. Grados de libertad y suma de cuadrados**

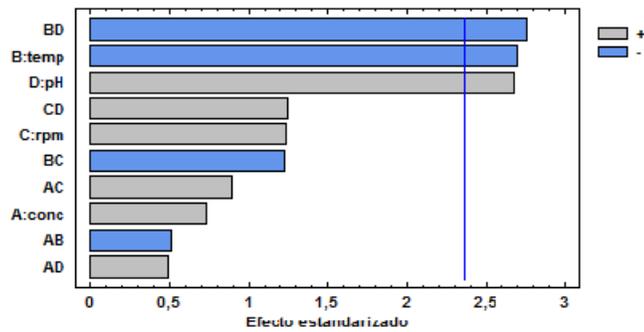
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:conc	609,596	1	609,596	1,29	0,2937
B:temp	874,237	1	874,237	1,85	0,2162
C:rpm	141,938	1	141,938	0,30	0,6009
D:pH	604,231	1	604,231	1,28	0,2956
AB	304,397	1	304,397	0,64	0,4488
AC	24,3757	1	24,3757	0,05	0,8269
AD	492,357	1	492,357	1,04	0,3416
BC	220,923	1	220,923	0,47	0,5163
BD	729,608	1	729,608	1,54	0,2543
CD	102,442	1	102,442	0,22	0,6558
Error total	3311,42	7	473,061		
Total (corr.)	7468,92	17			

En esta tabla la temperatura es un factor que influye en la producción de FAMES de manera independiente y en combinación con el pH son factores que tienen un factor de decisión estadística.

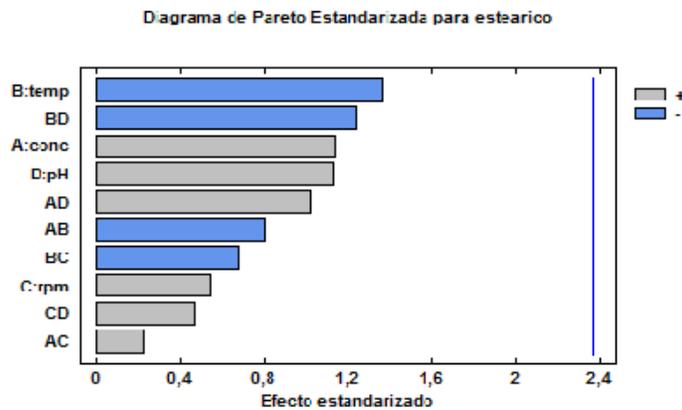
#### 7.2.3.3. Diagrama de Pareto.

En esta técnica podemos encontrar los factores que determinan de manera individual y de forma combinada la producción de FAMES por el método enzimático, Al pasar el factor estandarizado (línea azul) tienen relevancia en la producción.

Con estos datos podemos encontrar la variable que tiene mayor peso en la producción de biodiesel los cuales son mostrados en la figura 18 y 19, que en este caso es el efecto de la temperatura, el pH y la combinación de ambos.



**Figura 18. Diagrama de Pareto para heptadecanoico**



**Figura 19. Diagrama de Pareto para esteárico**

7.2.3.4. Gráfico de cubo.

Así mismo por la gráfica de cubo podemos encontrar los mejores parámetros que favorecen la producción de heptadecanoico la cual se muestra en las Figuras 20 y 21 para el metil éster del ácido esteárico. En la cual podemos observar que los mejores puntos son rpm 1400, con [3:1] y temperatura de 40°C además del punto de rpm 1800, con [4:1] y temperatura de 40°C.

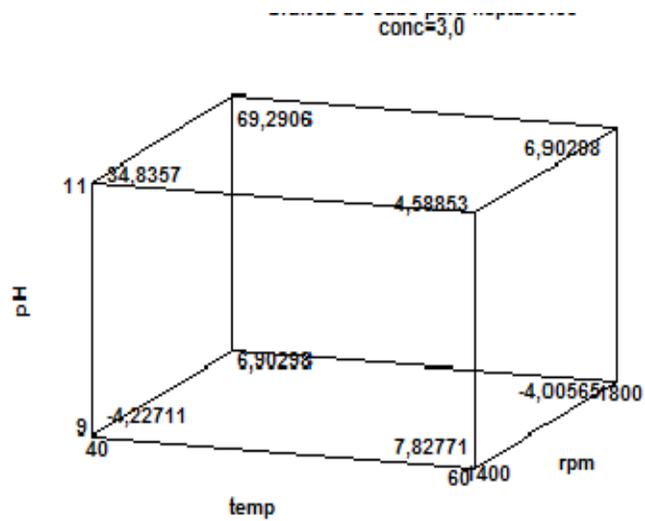


Figura 20. Gráfica de cubo para heptadecanoico

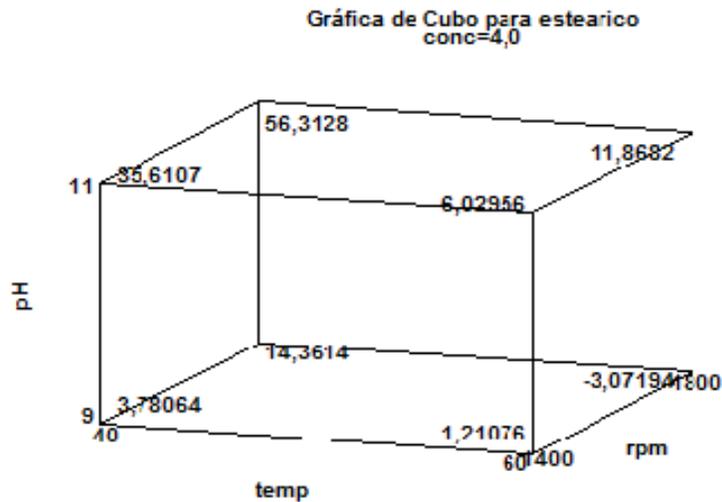


Figura 21. Gráfica de cubo para estearico

El programa también nos propone unos parámetros los cuales pueden servir de inicio para los siguientes experimentos a realizar en investigaciones posteriores. En la Tabla 14 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza heptadecanoico sobre la región indicada.

Usando el cuadro de diálogo de Opciones de Ventana se puede indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización. Y se puede establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor.

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar heptadecanoico

Valor óptimo = 67,3276 concentración de heptadecanoico

**Tabla 14. Optimización de parámetros para heptadecanoico**

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración	2,0	4,0	2,92899
Temperatura	40,0	60,0	40,3595
Rpm	1400,0	1800,0	1800,0
pH	9,0	11,0	11,0

En la Tabla 15 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza esteárico sobre la región indicada. Usando el cuadro de diálogo de Opciones de Ventana se puede indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización. Y se puede establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor.

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar esteárico

Valor óptimo = 43,8334 concentración de esteárico

**Tabla 15. Optimización de parámetros para esteárico**

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración	2,0	4,0	4,0
Temperatura	40,0	60,0	40,4136
Rpm	1400,0	1800,0	1573,27
pH	9,0	11,0	11,0

#### 7.2.4. Comparación de métodos utilizados.

Se compararon los diferentes métodos aplicados para la producción de biodiesel. Los aspectos técnicos más relevantes se muestran en la Tabla 16. Donde las variables de temperatura, agitación y pH son puntos críticos en la producción de biodiesel, en la cual podemos pasar de una conversión baja de 30% hasta una producción alta 90% en la producción enzimática y química. La producción química tiene grandes ventajas como es el tiempo de producción y el rendimiento de conversión frente a la producción enzimática, con la desventaja de subproductos y contaminación que esta produce por los lavados que esta requiere. Esto abre la puerta para la producción enzimática que resulta costosa, pero que no tiene subproductos, ni requiere de lavados para su utilización directa en motores de combustión interna. Ya que existen métodos de inmovilización de enzimas que disminuirían su costo, esto da la oportunidad de posibles investigaciones venideras.

**Tabla 16. Ventajas y desventajas de los métodos aplicados para la producción de biodiesel.**

Concepto	Método Químico	Método Enzimático
<b>Rendimiento</b>	96%	70%
	Proceso rapido (1-3 hrs)	Proceso intermedio (4-6 hrs)
<b>Ventajas</b>	Temperatura (40-60)	Temperatura (40-60)
	rpm (1600-1800)	rpm (1600-1800)
	pH alcalino	pH alcalino
	Ac-OH [1-3]	Ac-OH [1-2]
	Costo bajo	
<b>Desventajas</b>	Lavados	Costo Alto
	subproductos	

## 8. CONCLUSIONES

El rendimiento que se obtuvo en la extracción con etanol del aceite presente en la borra de café, no presentó una diferencia significativa con respecto a la extracción con hexano. Por lo que se decidió usar etanol debido a que es más fácil de manejar por ser menos peligroso en toxicidad.

Se observó que la tasa de agitación (rpm) es un factor que influye en la producción de biodiesel modificando la relación de FAMES producidos, que se vio reflejado en la producción de biodiesel por el método químico. Por lo que se utilizó como variable de operación a estudiar en los biorreactores de 10 ml utilizados.

La lipasa TTL presentó una mejor actividad de transesterificación que la lipasa LPC. Por lo que con los datos obtenidos de ella se hizo el análisis estadístico que nos arrojó las mejores condiciones de operación que fueron de 40°C, pH 11 y 1600 rpm.

Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis planteada en este trabajo.

## 9. REFERENCIAS

1. Bailey. E. A., Aceites y grasas industriales., Editorial Reverté S.A., Barcelona, España, 1961.
2. Belitz, H.-D., Grosh, W., & Schieberle, P. (2009). Coffee, tea, cocoa. In H.-D. Belitz, W. Grosh, & P. Schieberle (Eds.), Food Chemistry (4<sup>th</sup> ed., PP 938-951). Leipzig: Springer.
3. Betanzos y Garcés. 2010. Estudio de la obtención de biodiesel por método químico a partir de aceites comestibles usados. Departamento de energía de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco.
4. Calle, V., Aceites de café., Cenicafé, Colombia, 11(9), 1972, PP. 251-258.
5. CORPODIB, Corporación para el desarrollo industrial de la biotecnología y producción limpia. 2003. Programa estratégico para la producción de biodiesel, combustible automotriz a partir de aceites vegetales. Informe final. Bogotá, Colombia. 445 p.
6. Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B. 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5): 1298-1315.
7. Haas, M.J., Easterling E.P., French W.T., Hernández, R. & Lincha, M. (2006). *Bioresource Technology*, 97, 671-678.
8. Larosa 2005. Situación actual del biodiesel. *Ingeniería química*. No. 421. Pag. 97-104.
9. López Fontal M.E. 2007. Extracción de aceite de café. *Ingeniería e Investigación*, abril, año 7 vol. 27, numero 001. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia pp.25-31.
10. Lye, G.J., P. Ayazi-Shamlou, F. Baganz, P.A. Dalby, J.M. Woodley. 2003. Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques. *TRENDS in Biotechnology*, 21(1): 29-37.
11. Ma, F., Hanna, M. A. 1999 Biodiesel producción: a review. *Bioresour Technol* 70: 1-15.

12. Melgarejo Torres Rodrigo. 2010. "Análisis de régimen de un biorreactor de partición de tres fases mediante la determinación de tiempos característicos". Maestría en Biotecnología UAM-I
13. Micheletti, M., G.J. Lye. 2006. Microscale bioprocess optimization. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 611-618.
14. Moreira y col. 2011 Con la borra de café se puede obtener biodiesel, Departamento de Ingeniería Química de la Escuela Politécnica de la brasileña Universidad de São Paulo
15. Mussatto. 2011. Producción, composición y aplicación del café y sus residuos industriales. *Food Bioprocess Technol.* 4: 466-472
16. Rivera I., Villanueva G., Sandoval G. 2009. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. *Grasas y Aceites*, 60 (5): 468-474
17. Ruzich N.I. y Bassi A.S. 2010. Investigation of Lipase-Catalyzed Biodiesel Production Using Ionic Liquid [BMIM][PF<sub>6</sub>] as a Co-solvent in 500 mL Jacketed Conical and Shake Flask Reactor Using Triolein or Waste Canola Oil as Substrates. *Energy Fuels*, 24: 3214-3222.
18. Seok Yang., Young Chung., Chang Su Hong., Sep 8, 2009. Method of distributing encoding Publication type, Grant. Application number, 12/555,279.
19. Sheehan, J., Cambreco, V., Duffiel, J., Garboski, M., Shapouri, H., 1998. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. A report by Us department of Agriculture and Energy, Washington, D.C., pp. 1-35.
20. Suehara K., Kawamoto Y., Fujii E., Kohda J., Nakano Y., Yano T. 2005. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(4): 437-442.
21. Tan T., Lu J., Nie K, Deng L., Wang F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28: 628-634.
22. Torres Martínez Daniel. 2010. "Biotransformación de cetonas cíclicas empleando líquidos iónicos en un biorreactor de partición". Doctorado en Biotecnología UAMI
23. Van Gerpen., 2004 Biodiesel Fuels. *Encyclopedia of Energy*, pages. 151-162.

24. Weuster-Botz, D., R. Puskeiler, A. Kusterer, K. Kaufmann, G.T. John, M. Arnold. 2005. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **28**(2): 109-119.
25. Willoughby, N. 2006. Scaling up by thinking small: a perspective on the use of scale-down techniques in process design. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**(12):1849–1851