



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



---

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE  
POSGRADO DE INGENIERÍA  
QUÍMICA

"Estudio  
biotecnológico teórico-experimental del glicerol crudo,  
subproducto del proceso de obtención del biodiesel"

TESIS presentada por:

**M. C. ERICK ALEJANDRO MENDOZA CHÁVEZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA QUÍMICA

ASESOR:

**DR. JAIME SAUCEDO LUNA**

Co-ASESOR:

**DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA**

Morelia, Mich. Agosto, 2016

Lic. Ulises Gutiérrez Vazquez  
Jefe del Departamento de Titulación de la  
U.M.S.N.H.  
Presente.-




Asunto: Aprobación de Impresión de Tesis

Oficio número 142/2016/2016.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "ESTUDIO BIOTECNOLÓGICO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DEL GLICEROL CRUDO, SUBPRODUCTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL BIODIESEL" y revisado el manuscrito que presentó el alumno ERICK ALEJANDRO MENDOZA CHÁVEZ con matrícula 1180951G, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Atentamente,  
Morelia, Michoacán a 15 de agosto de 2016.

  
DR. JAIME SAUCEDO LUNA,  
COORDINADOR DEL DOCTORADO EN  
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA



DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO

Presidente o Asesor: Dr. Jaime Saucedo Luna 89000498

Cosesor: Dr. Jesús Campo García 00037800

Vocales:

  
Dr. Agustín Castro Montoya 01000179

  
Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Dr. José Ma. Ponce Ortega 03002829

SL/mcpa.



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Facultad de Ingeniería Química / Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Francisco J. Mujica S/N / Cal. Felicitas del Río / C.P. 58030 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443 321 3584 Ext. 1211  
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

# RESUMEN

Se predice que los productos químicos de base biológica podrían en un futuro próximo ocupar una cuota de mercado mucho mayor que la actual. El concepto de biorefinería podría ser especialmente ventajoso si se considera la conversión de los subproductos o residuos a productos de valor agregado. En este trabajo una cepa aislada recientemente y clasificada como LRB3, se caracterizó para la producción de 2,3-butanodiol (2,3-BD). En fermentaciones por lote, alimentado inicialmente con glicerol residual (contenido de glicerol 22.19 g/L<sub>cultivo</sub>) directamente, sin tratamiento previo se alcanzó una producción de 3.2 g/L<sub>cultivo</sub> de 2,3-BDO y un rendimiento  $Y_{2,3BDO/glicerol}$  0.144 g/g).

**Palabras claves:** Glicerol, fuente de carbono, biodiesel, biotecnología industrial, valorización, fermentación.

# SUMMARY

It is predicted that biobased chemicals could in the near future occupy a market share much greater than today. The biorefinery concept could be particularly advantageous when considering the conversion of waste products or value-added products. In this work, a newly-isolated strain and classified as LRB3, was characterized for 2,3-butanediol (2,3-BD) production. In batch fermentations, strain LRB3 produced 3.2g 2,3-BDO/L<sub>culture</sub> with raw glycerol (22.19 g glycerol/ L<sub>culture</sub>) directly without pretreatment reached a production of 3.2 g/Lcultivo 2,3-BDO and yield  $Y_{2,3BDO / glycerol}$  0.144 g/g).

# AGRADECIMIENTOS

Soy afortunado al tener un gran número de personas a las que agradecer su ayuda, apoyo y colaboración durante esta travesía de 4 años. Me gustaría dar las gracias mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y porras a la distancia. Además agradecer al Dr. Jaime Saucedo Luna por sus enseñanzas, el apoyo y entusiasmo constante. Un Cordial agradecimiento al Dr. Jesús Campos por recibirme y permitirme realizar gran parte de este proyecto en su laboratorio. Agradezco también, al Dr. Agustín Castro Montoya por su aportación y apoyo en todo momento.

Muchas gracias a la M. C. Alma Díaz y a todos los compañeros del laboratorio de biotecnología microbiana por compartir sus conocimientos, proporcionarme la ayuda técnica y hacer el trabajo divertido durante mi estancia con ustedes.

Un agradecimiento especial a mis compañeros de cuartel: Verónica, Nancy, Eli, Salvador y Axel por su amistad, porras y ayuda incondicional. Y gracias a Alejandra Rodríguez, Liliana Márquez, Edgar Moreno y a todos mis amigos.

Gracias a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al posgrado de Ingeniería Química, a la Red Temática de Bioenergía y al Concejo de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero para la realización de este trabajo y asistir a congresos.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
1.1 CAMBIO CLIMÁTICO	2
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	5
1.3. HIPÓTESIS	7
1.4. OBJETIVO GENERAL	7
1.5. OBJETIVOS PARTICULARES	7
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
2.1 INFORMACIÓN GENERAL	9
2.1.1. BIODIESEL	9

2.1.1.1. Producción de biodiesel en México	10
2.1.2. GLICEROL	11
2.1.3. 2,3-BUTANODIOL	13
<b>2.2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<hr/>	
<b>3.1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL GLICEROL CRUDO</b>	<b>16</b>
<b>3.2. BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CRUDO</b>	<b>17</b>
3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO	17
3.2.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LOS LODOS RESIDUALES MUESTREADOS.	19
3.1.3. SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS ASIMILADORAS DE GLICEROL CRUDO Y PRODUCTORAS DE 2,3-BDO	20
3.2.4. PARÁMETROS DE SELECCIÓN DE LOS AISLADOS	20
3.2.4.1. Crecimiento en medio YPGc	20
3.2.4.2. Generación de 2,3-Butanodiol en fermentación por lote	20
3.2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	21
3.2.6. MODELO MATEMÁTICO	22
3.2.7. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<hr/>	
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL GLICEROL CRUDO</b>	<b>24</b>
<b>4.2. BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL CRUDO</b>	<b>25</b>
4.2.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	25
4.2.2. SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS ASIMILADORAS DE GLICEROL CRUDO Y PRODUCTORAS DE 2,3-BDO	26
4.2.3. GENERACIÓN DE 2,3-BUTANODIOL EN FERMENTACIÓN POR LOTE	29
<b>4.3 PUBLICACIONES EN REVISTAS INDEXADAS</b>	<b>38</b>
4.3.1. THERMODYNAMIC ANALYSIS OF ETHANOL SYNTHESIS FROM GLYCEROL BY TWO-STEP REACTOR SEQUENCE	38
4.3.2. SIMULATION OF SYNGAS PRODUCTION FROM LIGNIN USING GUAIACOL AS A MODEL COMPOUND	56
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<hr/>	
<b>6 REFERENCIAS GENERALES</b>	<b>59</b>
<hr/>	

# LISTA DE FIGURAS

FIG. 1 COMPARACIÓN DE RUTAS DE PRODUCCIÓN DE COMBUSTIBLES LÍQUIDOS Y GASEOSOS A PARTIR DE BIOMASA Y COMBUSTIBLES FÓSILES (ADAPTADO DE CREUTZIG ET AL., 2014).	4
FIG. 2. POSIBLES RUTAS DE CONVERSIÓN DEL GLICEROL.	12
FIG. 3 EQUIPO CALORIMÉTRICO AUTOMÁTICO MARCA PARR	17
FIG. 4. MUESTREO DE LODOS RESIDUALES EN LAS INSTALACIONES DE LA PLANTA MEXICANA BIODIESEL MORECO.	18
FIG. 5. CAMBIO DE COLORACIÓN DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE ACETOÍN, PRUEBA DE VOGES–PROSKAUER.	27
FIG. 6. ESPECTRO DE IR EN LA REGIÓN DE ESTIRAMIENTO OH Y LA ESTRUCTURA (INSERCIÓN) DEL 2,3-BDO.	27
FIG. 7. PERFIL DE CRECIMIENTO REALIZADOS EN EL MEDIO YPGP AL 2% V/V DE GLICEROL DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE 2,3-BDO.	28
FIG. 8. ESTÁNDARES DE 2,3-BDO Y GLICEROL POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	29
FIG. 9. IDENTIFICACIÓN DE 2,3-BDO POR HPLC. ANÁLISIS DE CULTIVOS POR LOTES DE BACTERIA LRB3.	31
FIG. 10. PERFIL DE FORMACIÓN DE 2,3-BUTANODIOL EN LA CEPA LRB3, A 35 °C Y TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO (2, 4 Y 6% V/V).	32
FIG. 11. PERFIL DE FORMACIÓN DE 2,3-BUTANODIOL EN LRB3, A 40 °C Y TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO (2, 4 Y 6% V/V).	33
FIG. 12. PERFIL DE FORMACIÓN DE 2,3-BUTANODIOL EN LA CEPA LRB3, A 45 °C Y TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO (2, 4 Y 6% V/V).	34
FIG. 13 DIAGRAMA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO	35
FIG. 14. PERFIL DE FORMACIÓN DE 2,3-BUTANODIOL CON LA CEPA LRB3, A 37 °C DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO (2, 4 Y 6% V/V).	36

# LISTA DE TABLAS

TABLA 1 TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL GLICEROL CRUDO. ....	17
TABLA 2. CONCENTRACIONES Y SU EQUIVALENTE EN GRAMOS DE LOS MEDIOS PREPARADOS. ....	21
TABLA 3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GLICEROL CRUDO. ....	25
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LAS CEPAS AISLADAS. ....	26

# CAPÍTULO I

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cambio Climático

El cambio climático se ha convertido en uno de los problemas más difíciles que enfrenta el mundo en el siglo 21. En París, se celebró del 30 de noviembre al 11 de diciembre del 2015 la XXI Conferencia Internacional sobre Cambio Climático o 21ª Conferencia de las Partes (COP21) y la undécima sesión de la Conferencia de la Partes en calidad de reunión de las Partes al Protocolo de Kyoto (CMP) (UNFCCC, 2015). La conferencia de las Naciones Unidas sobre el cambio climático concluyó con la adopción de un acuerdo histórico para combatir el cambio climático e impulsar medidas e inversiones para un futuro bajo en emisiones de carbono, resiliente y sostenible.

El objetivo principal del acuerdo universal es mantener el aumento de la temperatura en este siglo muy por debajo de los 2 °C e impulsar los esfuerzos para limitar el aumento de la temperatura incluso más, por debajo de 1.5 °C sobre los niveles preindustriales. Además el acuerdo busca reforzar la habilidad para hacer frente a los impactos del cambio climático.

Las evaluaciones de los impactos globales y regionales del cambio climático juegan un papel relevante como herramienta en los debates de política climática. El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), creado conjuntamente en 1988 por la Organización Meteorológica Mundial y por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, constituye el principal cuerpo científico a nivel mundial de valoración y evaluación sobre cambio climático (Mach *et al.*, 2016).

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) tiene la segunda mayor contribución directa al efecto invernadero de todos los gases (IPCC, 2014). Desde el comienzo de la revolución industrial la quema de combustibles fósiles ha contribuido al aumento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera. Por otra parte, las emisiones de CO<sub>2</sub> nacional están fuertemente vinculadas a la riqueza, y un objetivo estratégico global debería ser prevenir el crecimiento a expensas de la sostenibilidad. Una gran proporción de la producción de CO<sub>2</sub> surge de las actividades industriales. Por lo tanto, es de vital importancia para la industria reducir el impacto al ambiente.

Para afrontar el reto de la reducción de gases de efecto invernadero (GEI) la industria ha respondido en la mayoría de los países y como resultado se han disminuido considerablemente en los últimos años. Sin embargo los objetivos de reducción son muy ambiciosos y todavía queda mucho por hacer. Así, la idea de "crecimiento sostenible" ha afianzado. Las nuevas tecnologías se están desarrollando para contrarrestar las emisiones de GEI. Desde esta perspectiva, las biorefinerías y la biotecnología industrial han surgido como alternativas sostenibles a las refinerías petroquímicas, las cuales están tomando presencia en el marco de la bioeconomía mundial, como estructuras industriales que integran procesos para la conversión de la biomasa a múltiples bioproductos, principalmente biocombustibles y productos químicos de alto valor agregado (Moncada *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2012).

Numerosas tecnologías de conversión pueden transformar la biomasa a calor, poder, combustibles líquidos, gaseosos, biomoléculas y precursores para la industria de alimentos y fármacos. En la Figura 1.2 se muestran algunos productos generados a partir de biomasa y/o combustibles fósiles mediante rutas térmicas, catalíticas, gasificación, fermentación, etc (Creutzig *et al.*, 2014).

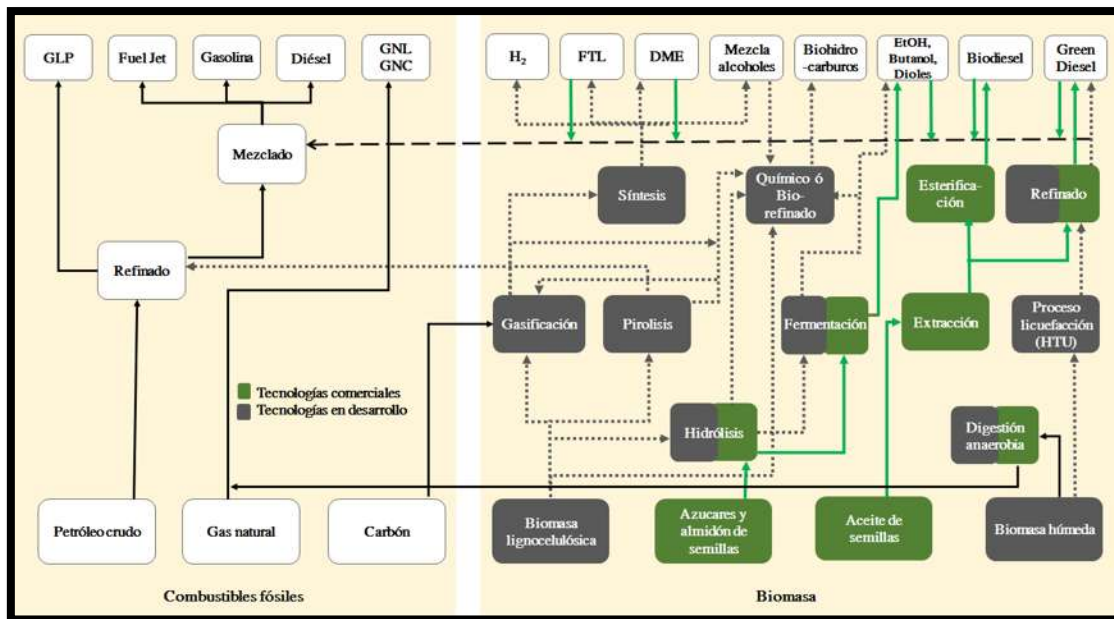


Fig. 1 Comparación de rutas de producción de combustibles líquidos y gaseosos a partir de biomasa y combustibles fósiles (adaptado de Creutzig et al., 2014).

La biotecnología industrial debe ser vista como parte de las herramientas de la tecnología, clave para el desarrollo económico futuro. La biotecnología industrial, al basarse en recursos renovables, puede mejorar el consumo energético y reducir significativamente las emisiones de CO<sub>2</sub>.

La nueva biotecnología industrial surgió de interés internacional en la producción de biocombustibles a partir de una variedad de materias primas, microorganismos y enzimas, así como su diversidad (Raheem *et al.*, 2016). Muchos países tienen ahora las estrategias y objetivos de bioenergía. En poco tiempo, muchas de las políticas de apoyo fueron desarrolladas para la producción y utilización de biocombustibles, particularmente de bioetanol y biodiesel (Pandey *et al.*, 2015). Sin embargo, muy rápidamente el auge de los biocombustibles causó controversia, especialmente la discusión de alimentos contra combustible. Ahora hay un cambio en la política hacia los biocombustibles de segunda generación que utilizan cultivos no alimentarios como materias primas.

Además de los biocombustibles, la biotecnología industrial puede contribuir a la mitigación del cambio climático a través de diversos productos en una amplia variedad de sectores. Estos productos son menos controvertidos, algunos son del mercado de los biocarburantes de segunda generación, y sin embargo, no disfrutan del apoyo de las políticas de oferta y demanda de apoyo como se ha visto con los biocombustibles (Pandey *et al.*, 2015).

Varias fuentes predicen que los productos químicos de base biológica podrían en un futuro próximo ocupar una cuota de mercado mucho mayor que la actual. Como corresponde a la extraordinaria biodiversidad de microorganismos, la diversidad de los posibles productos químicos de base biológica es amplia (Bidy *et al.*, 2016). En muchos casos, la química orgánica no tiene reemplazo viable, en otros casos, los productos químicos de base biológica pueden sustituir a sus homólogos de origen fósil con reducciones significativas de las emisiones de GEI. De esta manera, el biodiesel y el bioetanol son las plataformas tecnológicas más importantes para la producción de combustibles líquidos.

A pesar de que los biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol representan una alternativa renovable, conveniente y amigable con el ambiente para la sustitución de los combustibles fósiles, también causan preocupación en relación con su viabilidad económica. La implementación de las biorefinerías como un proceso adicional para la producción de biocombustibles es una alternativa interesante para superar tanto la rentabilidad limitada de estas tecnologías y el uso de los subproductos generados.

Por lo tanto, el concepto de biorefinería podría ser especialmente ventajoso si se considera la conversión de los subproductos o residuos a productos de valor agregado.

## 1.2. Planteamiento del problema de investigación

El glicerol como el principal subproducto en la producción de biodiesel se obtiene en alta concentración en una relación en peso de 1:10 (glicerol/biodiesel). El problema con glicerol crudo de la producción de biodiesel es que es considerado como altamente contaminante por el metanol tóxico, por el alto contenido de sales y ácidos grasos libres y el color marrón oscuro. Esto hace que el glicerol crudo sea inadecuado para la mayoría de los mercados tradicionales de glicerol. El proceso de fabricación de biodiesel convencional utiliza una relación 6:1 molar de metanol a aceite con el fin de conducir la reacción hasta su finalización. La mayor parte del

exceso de alcohol termina en la capa del glicerol, en algunos casos el metanol se recupera mediante costosos métodos como la destilación (Da Silva *et al.*, 2009; Gupta y Kumar, 2012).

Por otra parte el creciente mercado de biodiesel ha generado un exceso de oferta de glicerol. La producción mundial de glicerol a partir biodiesel ha pasado de 200 000 toneladas en 2003 a 600 000 toneladas en 2006, progresando a más de 2 millones de toneladas en 2011 y de igual manera la producción en 2012 superó de nuevo los 2 millones de toneladas incluyendo la fabricación por fracción oleoquímicos. Según un informe de investigación publicado por Transparency Market Research (TMR's), el crecimiento del mercado global de glicerol es una tasa compuesta anual de 6.30% del 2012 hasta 2018. Por lo que, los usos tradicionales del mercado de glicerol refinado en los Estados Unidos, Asia, América Latina y Europa de repente no eran capaces de absorber más este excedente y la mayoría de los productores claves se retiraron del mercado (Ciriminna *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2009).

Los bajos precios de glicerol afectan la economía de los productores de biodiesel negativamente, esto debido a que las ventas de glicerol representan una mejora importante en la rentabilidad del proceso de obtención de biodiesel. Por esa razón, la correcta explotación de glicerol como materia prima se debe centrar en su transformación en productos de valor agregado. Por lo tanto, el uso del glicerol es un tema de alta prioridad para los gestores e investigadores relacionados con la producción de bioproductos. En este sentido, el establecimiento de biorefinerías de glicerol capaces de co-generar productos de valor añadido es una excelente oportunidad no sólo para aumentar la rentabilidad, sino también para producir otros productos químicos a partir de una materia prima de base biológica. De esta manera, con el fin de evitar tanto los inconvenientes económicos y ambientales relacionados con el uso y la eliminación del glicerol, es necesario encontrar usos alternativos como materia prima para la producción de compuestos de valor agregado. Por ello en este estudio nos planteamos la siguiente hipótesis.

### 1.3. Hipótesis

Se obtendrá 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana usando como fuente de carbono el glicerol residual resultante del proceso de producción de biodiesel.

### 1.4. Objetivo general

Generar un bioproceso para la obtención de 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana usando como fuente de carbono el glicerol residual subproducto del proceso de producción de biodiesel.

### 1.5. Objetivos particulares

1. Caracterizar el glicerol residual subproducto del proceso de producción de biodiesel
2. Aislar, seleccionar y caracterizar, cepas de microorganismos con potencial de degradar el glicerol residual resultante de la producción de biodiesel y que sean capaces de producir de 2,3-butanodiol.
3. Seleccionar una cepa de m.o. con alta capacidad productora de 2,3-butanodiol.
4. Establecer las condiciones óptimas de fermentación del glicerol residual.

# CAPÍTULO II

# ANTECEDENTES

# ANTECEDENTES

## 2.1 Información general

### 2.1.1. Biodiesel

El biodiesel es metil o etil éster de ácidos grasos fabricado a partir a partir de fuentes renovables (aceites vegetales, grasas animales o aceites de cocina usados) y alcoholes de cadena corta (metanol, etanol o butanol), para producir un grupo metilo, etilo o butilo ésteres mezcla de ácidos grasos. El proceso crea dos salidas biodiesel y glicerol. Las entradas requeridas y salidas creadas dependen de la química y para el caso del aceite de soja se muestra en la Ec. 1. Esta metodología se utiliza para calcular los rendimientos de los otros materiales de alimentación de la producción de biodiesel.

100 kg de aceite + 10.5 kg de MeOH  $\rightarrow$  100 kg de metil esterres (biodiesel) +10.5 kg de Glicerol [1]

El biodiesel se define como un combustible limpio para motores diésel, puede mezclarse en cualquier proporción con diésel mineral para crear una mezcla de biodiesel o puede ser utilizado en su forma pura (Agarwal, 2007). Además el biodiesel tiene entre otras características potencialmente beneficiosas:

- Es un combustible con baja viscosidad, no tóxico y biodegradable.

- Podría reducir la cantidad de importaciones de combustibles fósiles requerido en muchos países, a su vez, reducir la dependencia de las importaciones de las zonas políticas potencialmente inestables del mundo y aumentar la seguridad energética nacional.
- Producido a gran escala puede reducir la demanda de combustibles fósiles y podría limitar potencialmente el incremento de los precios de los mismos.

De ahí que, el sector de producción de biodiesel es una industria dinámica, con un rápido crecimiento del mercado global. Por ejemplo, en la última década la producción de biodiesel fue impulsado por algunos gobiernos con el objetivo de desarrollar las industrias de gran escala. Por lo tanto, La Unión Europea (EU) tomó la delantera con más de 1.6 millones de toneladas de biodiesel producidos en 2002 (capacidad de aprox. 2.1 millones de toneladas), mientras que en los EE.UU. fueron producidos aproximadamente 40,000 toneladas. Por otra parte, en 2008 la producción mundial de biodiesel había llegado a más de 11.1 millones de toneladas, lo que representa alrededor del 1% del consumo total de diésel de los EE.UU. y entre 2-3% del consumo total de transporte de la EU (Almeida *et al.*, 2012). Aunque, la EU representa el 80% de la producción y consumo mundial de biodiesel, los EE.UU. están aumentando su producción a un ritmo más rápido que Europa, mientras que Brasil se espera que supere la producción de biodiesel de EE.UU. y Europa para el año 2018.

Bajo la situación descrita anteriormente, se producen continuamente cantidades elevadas de glicerol en una proporción de 10% en peso respecto a la producción de biodiesel con muchas impurezas que disminuyen su calidad comercial. Debido a este aumento su precio se ha desplomado de \$ 2/kg en 2002 a cerca de \$ 0.10/kg en la actualidad, por lo que muchos fabricantes de biodiesel ahora simplemente lo desechan (Pott *et al.*, 2013).

### 2.1.1.1. Producción de biodiesel en México

La producción de biodiesel a escala comercial puede ser factible en México ya que se tiene una alta biodiversidad, una actividad intensiva de la agricultura y los desechos de biomasa no están siendo explotados de manera productiva. Por ejemplo, se estima que el potencial de la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal residual es de 7.8 a 17.7 PJ a nivel nacional (Montero *et al.*, 2015).

El desarrollo de la industria del biodiesel en México muestra sus primeros pasos, apoyándose en las tecnologías de primera y segunda generación de biocombustibles. En la actualidad, las universidades, agencias gubernamentales y centros de investigación están llevando a cabo la investigación y el desarrollo de biodiesel se centraron en la optimización de procesos, nuevos catalizadores, nuevas materias primas para la producción de biodiesel y los impactos de biodiesel en los materiales. Las investigaciones en curso implican la producción de primera, segunda y tercera generación biodiesel. Además, se están llevando a cabo proyectos de biorefinerías a escala piloto.

### 2.1.2. Glicerol

La molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol) es un tri-alcohol altamente reactivo que tiene dos grupos hidroxilo primario y un secundarios. Es un compuesto orgánico que tiene la fórmula química  $C_3H_8O_3$ . El glicerol es prácticamente no tóxico para la salud humana y el ambiente. Algunas características físicas son las siguientes: Soluble en agua, incoloro, inodoro, viscoso, higroscópico y líquido de sabor dulce, con una gravedad específica de  $1.261 \text{ g ml}^{-1}$ , temperatura de fusión de  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ , punto de ignición  $177 \text{ }^\circ\text{C}$  y una temperatura de ebullición de  $290 \text{ }^\circ\text{C}$  (acompañado de descomposición). A presión atmosférica normal, el glicerol tiene un peso molecular de  $92.09 \text{ g/mol}$ , y la viscosidad de  $1.5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  (Tan *et al.*, 2013; (Pagliaro & Rossi, 2010). Debido a estas propiedades particulares definidas, el glicerol tiene más de 1500 usos o aplicaciones finales conocidos.

Químicamente, el glicerol es capaz de reaccionar con un alcohol estable bajo la mayoría de condiciones operativas. La clave de su utilidad es la combinación particular entre sus propiedades físico-químicas, la compatibilidad con otras sustancias, y el fácil manejo, lo que le permite ser utilizado en una gran cantidad de productos sea directamente como un aditivo o como materia prima: humectante, plastificante, emoliente, espesante, disolvente, medio de dispersión, lubricantes, edulcorantes, y anticongelante. El glicerol es un producto químico obtenido principalmente como un subproducto a partir de reacciones de saponificación y de hidrólisis en las plantas oleoquímicas, así como reacción de transesterificación en plantas de biodiesel.

En la Fig. 2. Posibles rutas de conversión del glicerol. se analizan las posibilidades de conversión de glicerol por diferentes rutas. Esta molécula altamente funcional se ha identificado como una materia prima potencial para la síntesis orgánica de muchos productos intermedios y productos químicos. Químicamente el glicerol puede ser transformado de muchas maneras, como la oxidación, hidrogenólisis, eterificación, pirólisis y gasificación. Por lo tanto, los diferentes tipos de productos como hidrógeno, 1,2-propanodiol, gas de síntesis entre muchos otros compuestos pueden obtenerse químicamente. Por otra parte, a partir del glicerol también puede ser transformado bioquímicamente a compuestos de valor agregado. Algunos de los productos de fermentación de glicerol son: 2,3-butanodiol, 1,3-propanodiol, etanol, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido láctico, poli-3-hidroxi-butirato, piruvato, acetoína, dihidroxiacetona y biosurfactantes. Debido a la amplia variedad de productos potenciales de glicerol, su biorefinería es una excelente oportunidad comercial.

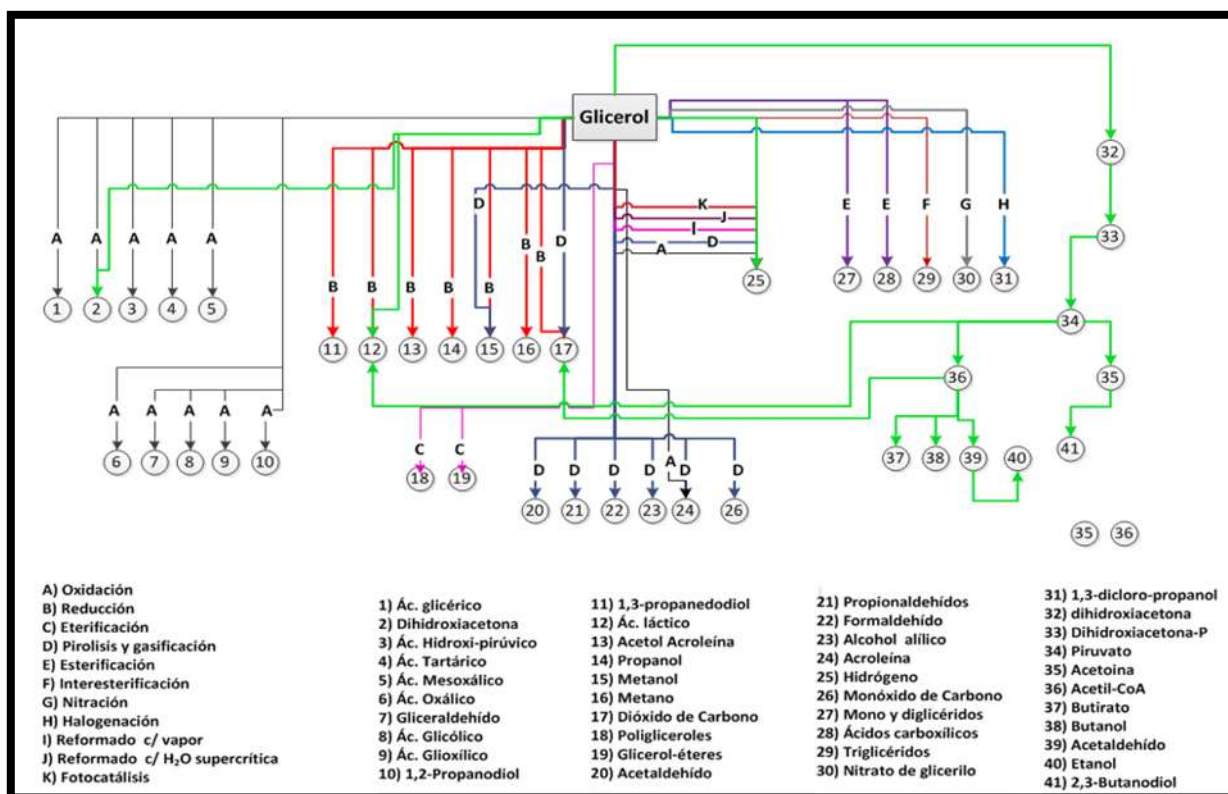


Fig. 2. Posibles rutas de conversión del glicerol.

### 2.1.3. 2,3-butanodiol

El 2,3-butanodiol (2,3-BD), también conocido como 2,3-butilenglicol y 2,3-dihidroxiбутano, es un diol de cuatro carbonos sintetizado como producto de fermentación. Existe un creciente interés en la producción de este importante producto químico industrial a partir de recursos renovables por fermentación microbiana, debido a sus usos potenciales como una sustancia polimérica. Es un líquido incoloro e inodoro que tiene un punto de ebullición muy alto (180-184 ° C), alto valor calórico (27.198 J g<sup>-1</sup>) y bajo punto de congelación, el isómero *levo* (- 60 ° C) de butanodiol se puede utilizar como un agente anticongelante.

Sin embargo, la aplicación comercial del diol no se limita a la fabricación de anticongelante, puede ser convertido a metil etil cetona (MEK) y 1,3-butadieno, importante en la producción de caucho sintético los precios por kg de los cuales han pasado de US \$ 1.67 a 2.32 y de US\$ 2.20 y 3.99 por kg, respectivamente, durante la primera mitad de 2011, debido principalmente al aumento de los precios de las materias primas fósiles (Petrov y Petrova, 2009).

Por otra parte, las bacterias y levaduras se han estudiado durante más de 100 años con el objetivo de producir 2,3-BDO por fermentación microbiana. Aunque muchos microorganismos inherentemente producen 2,3-BDO mediante fermentación *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y *Bacillus polymyxa* pueden producir más de 2,3-BDO que otras cepas. Entre ellos, especies de *Klebsiella*, *K. neumonía* y *K. oxytoca*, han demostrado la mejor producción de 2,3-BDO por fermentación a partir de una amplia gama de sustratos, incluyendo las pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, y galactosa), y disacáridos (sacarosa, lactosa, celobiosa). Algunas especies de *Klebsiella* también pueden producir 2,3-BDO a partir de glicerol, una de las fuentes de carbono más baratas en los últimos días debido a su disponibilidad excedente como un subproducto de biodiesel (Lee *et al.*, 2012).

## 2.2. Marco teórico

Actualmente existen numerosos estudios sobre fermentación de azúcares para la producción de 2,3-BDO (Taylor y Juni, 1960; Yang *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014). A pesar de que se han logrado altas eficiencias en la productividad a través de la conversión de la glucosa, el alto costo de la materia prima es considerado como un factor importante en la producción de

2,3-BDO. Por lo tanto, es de alta prioridad utilizar sustratos derivados de la biomasa alternativos para su obtención.

La producción de biodiesel a partir de aceites vegetales y grasas animales genera grandes cantidades de glicerol como subproducto (Ciriminna *et al.*, 2014). Dado que el glicerol puede ser utilizado como una fuente de carbono en microbiología industrial, este subproducto añade valor a la cadena productiva de la industria del biodiesel, contribuyendo a su competitividad. El glicerol crudo es un sustituto económico para el glicerol puro como un sustrato de fermentación (Yang *et al.*, 2015).

En la mayoría de los estudios sobre biosíntesis de 2,3-BDO, se han utilizado cepas de *E. coli*, y una fuente de carbono cara, como la glucosa (Yan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Algunos autores han investigado la biosíntesis de 2,3BDO usando como sustrato y co-sustrato glicerol puro y glucosa respectivamente con diferentes bacterias *Klebsiella*, *Clostridium* y *Citrobacter* (Biebl y Marten 1995; Yang *et al.*, 2011; Metsoviti *et al.*, 2011). Recientemente, algunos investigadores se han centrado en la optimización de las condiciones de fermentación para la conversión del glicerol y producción de 2,3-BDO (Petrov y Petrova, 2010). Otros investigadores han informado que las cepas de *Klebsiella* pueden metabolizar el glicerol puro a 2,3-BDO, pero estas reacciones generan grandes cantidades de 1,3-PDO (Petrov y Petrova, 2010). Es importante destacar que, debido a *Klebsiella pneumoniae* es un microorganismo patógeno, que no se ajusta a las normas de seguridad de la fermentación a escala industrial (Yang *et al.*, 2013).

# CAPÍTULO III

# MATERIALES Y

# MÉTODOS

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1. Caracterización fisicoquímica del glicerol crudo

Las muestras de glicerol se caracterizaron para la viscosidad, contenido de humedad, contenido de glicerol, cenizas, jabones, densidad y metanol (Tabla 1). La concentración de glicerol se analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento mediante un sistema Varian ProStart-230 (HPLC), equipado con un detector de índice de refracción RID-Varian 350 y un muestreador automático Varian modelo 410. Las fases estacionarias y móviles fueron una columna Hi-Plex H (7.7 mm de diámetro interno x 300 mm; Varian) y H<sub>2</sub>O destilada a 0.60 mL/min, respectivamente. La temperatura de la columna se controló a 60 °C con un calentador de columna Eppendorf CH-30. El contenido de agua se midió siguiendo el método estándar ISO 2097- 1972 mediante el método Karl Fisher. El contenido de cenizas se analizó de acuerdo con el método gravimétrico ISO 2098:1972 por la combustión de 1 g de glicerol en horno de mufla a 750 °C durante 3 h. Aproximadamente 1 g de glicerol crudo se disolvió en 50 ml de agua desionizada y el pH de la solución se midió usando un pH-metro a temperatura ambiente (24.5 ± 1 °C), después de la calibración del aparato con soluciones tampón de pH 7 y 10. La densidad se determinó de acuerdo con ASTM D 891-95 método estándar para la gravedad específica. La determinación de poder calorífico se realizó conforme a la NMX-AA-033-1985 (SECOFI, 1985b), utilizando un equipo calorimétrico (Fig. 3).



Fig. 3 Equipo calorimétrico automático marca PARR

Tabla 1 Técnicas empleadas en la caracterización del glicerol crudo.

Determinación	Técnica empleada
Poder calorífico (cal/g)	Bomba calorimétrica
% Cenizas	ASTM D482
% jabón	ASTM D6751
% Me-OH	Destilación
% humedad	Titulación Karl Fisher (ASTM E 203-01)
Viscosidad (cP)	Viscosímetro
Densidad (kg/cm <sup>3</sup> )	Densímetro
Contenido de Glicerol	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

## 3.2. Bioproceso para la producción de 2,3-Butanodiol a partir de Glicerol crudo

### 3.2.1. Medios de cultivo

El glicerol crudo y lodos residuales para el aislamiento de cepas fueron colectados en la empresa productora de biodiesel Mexicana Biodiesel Moreco, ubicada en Tarímbaro Michoacán (Fig. 4).



Fig. 4. Muestreo de lodos residuales en las instalaciones de la planta Mexicana Biodiesel Moreco.

A continuación se enlistan los medios de cultivos utilizados en este trabajo para crecer los microorganismos. Medio extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa (YPD), los medios de selección y mantenimiento de microorganismos (YPGI, YPGs), los medios de fermentación (YPGp y YPGc). En la preparación de los medios se utilizaron reactivos de Sigma-Aldrich y Merck, fueron preparados con agua destilada y se esterilizaron 15 minutos a 121°C. Los pH de los medios no fueron ajustados.

- La composición de YPD ( $l^{-1}$ ): Extracto de levadura, 10 g; peptona de caseína, 20 g; agar bacteriológico, 15 g y glucosa, 20 g.
- La composición de YPGI ( $l^{-1}$ ): glicerol grado reactivo, 40 g; NaCl, 4 g; extracto de levadura, 4 g; peptona 1 g. Las placas de YPGs se prepararon adicionando 2.0% (peso/volumen) agar al medio YPGI.
- La composición del medio de fermentación YPGp ( $l^{-1}$ ): glicerol grado reactivo, 40 g;  $KH_2PO_4$ , 0.65g;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.20 g; KCl, 4.3g;  $K_2SO_4$ , 0.2 g; NaCl, 4 g; extracto de levadura, 1 g; peptona 1 g, y 4.0 mL de solución de oligoelementos.
- La solución de oligoelementos tiene la siguiente composición ( $l^{-1}$ ):  $Fe_2SO_4$ , 2.85 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.735 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.422 g;  $ZnCl_2$ , 1.363 g;  $Na_2MoO_4$ , 0.242 g;  $Na_2SeO_3$ , 0.044 g;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 1.19 g.
- El medio YPGc fue preparado sustituyendo el glicerol grado reactivo (SIGMA-ALDRICH) por glicerol crudo (aséptico), recolectado de la planta de biodiesel

- El medio para almacenamiento: Los microorganismos (m.o) seleccionados fueron almacenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en viales de 1.5 mL en medio YPD y glicerol (grado reactivo) al 20% v/v.
- El medio de cultivo Clark y Lubs ( $l^{-1}$ ): Peptona tamponada, 7 g; dextrosa 5g; buffer fosfato dipotásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g; Agua desionizada, 1000 mL; ajustar el pH a 6.9. Refrigerar para su conservación ( $4\text{-}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), el vencimiento del medio es de 6-8 semanas.
- Método de preparación para los reactivos de Barritt empleado en la prueba Voges-Proskauer (V-P).
  - $\alpha$ -Naftol al 5%, intensificador de color:  $\alpha$ -Naftol 5g; Etanol (95%) 100 mL. Se disolvió el  $\alpha$ -Naftol en etanol y posteriormente se aforó a 100 mL con etanol.
  - Hidróxido de potasio KOH al 40%, agente oxidante: KOH, 4g; agua destilada, 100mL. Se disolvió el KOH en un vaso de precipitación con 60 mL de agua destilada, se colocó el recipiente en un baño con agua fría para controlar la temperatura, posteriormente se transfirió la solución a un matraz y se aforó a 100 mL con agua destilada. Se conservó en un frasco de vidrio sellado y recubierto con parafina. Vencimiento de la solución de 2-3 semanas.

### 3.2.2. Aislamiento de microorganismos de los lodos residuales muestreados.

El proceso de aislamiento se realizó en el laboratorio de biotecnología microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. En esta primera etapa fueron aisladas cepas nativas de distintas matrices de lodos residuales de la planta productora de biodiesel.

Las muestras se procesaron mediante diluciones a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las diluciones se realizaron con agua destilada y esterilizada, se mantuvieron en agitación constante (300 rpm) por 15 minutos. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla fueron tomados y adicionados a 100 mL de medio YPGI contenidos en frascos estériles de 250 mL, se incubaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se realizaron 2 muestreos (24 y 48 h). Se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000.

Para aislar las diversas colonias presentes en las diluciones, se utilizó la técnica siembra por estrías o rayado de placas. Cuando se desarrollaron las colonias bien separadas en la superficie del medio YPD cada una fue tomada con una aguja de inoculación y transferida a una placa para

ser identificada con un nombre clave. Este procedimiento se repitió hasta asegurar la pureza de los cultivos.

### 3.1.3. Selección de cepas nativas asimiladoras de Glicerol crudo y productoras de 2,3-BDO

Para la determinación Voges-Proskauer (V-P) (Ljutov, 1963) fueron incubadas las cepas aisladas en la sección 4.1.2 en tubos de ensayo con 5 mL de medio de Clark y Lubs en condiciones anaeróbicas a 30 °C por 48 h. Posteriormente y en el siguiente orden se adicionó de manera aséptica (con pipeta) 0.6 mL de  $\alpha$ -Naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40%, se agitaron los tubos con suavidad durante 60 seg de modo que el medio se expusiera al oxígeno atmosférico para oxidar la acetoína y obtener una reacción de color y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente (25 a 27°C).

Las cepas fueron observadas utilizando un microscopio óptico (Leica ICC50 HD). Los resultados de estos ensayos son presentados en la Tabla 4. Los cultivos puros fueron conservados en medio para almacenamiento a -70 °C en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

### 3.2.4. Parámetros de selección de los aislados

#### 3.2.4.1. Crecimiento en medio YPGc

Se evaluó el crecimiento de aquellas cepas que dieron positivo en la prueba de V-P y con la capacidad de asimilar glicerol crudo. Este ensayo se llevó a cabo en condiciones de anaerobiosis a 30 °C, se ejecutó en botellas de vidrio de 250 mL con volumen de operación de 100 mL y una concentración de glicerol crudo al 4%, el cultivo principal de fermentación se inoculó a una densidad de 105 células por mL y agitando a 250 rpm en agitador orbital. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 3.2.4.2. Generación de 2,3-Butanodiol en fermentación por lote

Para este ensayo se utilizó bacteria identificada como LRB3, se montaron bioreactores (BRX) en botellas de vidrio de 250 ml con volumen de operación de 100 mL, a tres diferentes concentraciones de glicerol crudo (Tabla 2), en condiciones de anaerobiosis y a 30 °C. Cada BRX se inoculó con una densidad de 105 células por mL y se mantuvo en agitación constante (250 rpm). Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron muestras periódicamente de los BRX durante el periodo de cultivo, se centrifugaron a 17, 000 x g, a 27 °C durante 20 min, para la separación celular. El sobrenadante libre de células se almacenó a -20 °C para la

determinación de glicerol y la concentración de 2,3-BDO. La concentración de 2,3-BDO y glicerol en el sobrenadante se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Tabla 2. Concentraciones y su equivalente en gramos de los medios preparados.

Concentraciones de Glicerol crudo en el medio (% v/v)	Contenido de glicerol (gr)
2	6.494
4	13.838
6	18.945
7	22.19

### 3.2.5. Métodos analíticos

La biomasa se determinó monitoreando la absorbancia a 600 nm usando un espectrofotómetro Jenway-7305 después de una dilución apropiada. Se tomaron mediciones D.O a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12 y 24 hr).

La cuantificación y análisis de metabolitos, tanto cuantitativa como cualitativamente, se realizó mediante un sistema Varian ProStart-230 de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), equipado con un detector de índice de refracción RID-Varian 350 y un muestreador automático Varian modelo 410. Las fases estacionarias y móviles fueron una columna Hi-Plex H (7.7 mm de diámetro interno x 300 mm; Varian) y H<sub>2</sub>O destilada a 0.60 mL/min, respectivamente. La temperatura de la columna se controló a 60 °C con un calentador de columna Eppendorf CH-30.

Además se realizaron análisis de infrarrojo, en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la UMSNH, usando un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), con frecuencia que va de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>, IR- Medio, Marca: Bruker modelo Tensor 27 No. serie T27 0680 04. Todas las muestras se disolvieron en agua, se utilizó una concentración baja para asegurar la lectura de moléculas monodispersas. Las mediciones para

cada muestra se realizaron por triplicado, a una temperatura de 26.9°C y humedad relativa (HR) de 32%. El informe del reporte con número LEIR-025/2016 se presenta en anexo I.

### 3.2.6. Modelo matemático

Se llevó a cabo un diseño de experimento factorial  $3^3$  para la producción de 2,3-BDO. Un diseño de experimento factorial de tres niveles fue usado para investigar el efecto de la temperatura y la concentración del glicerol crudo como sustrato para la bacteria LRB3. Las variables de los parámetros de entrada fueron temperatura (30-45 °C), concentración de glicerol crudo (2-6% v/v) y el tiempo de fermentación (48-144). La producción de 2,3-BDO fue la variable de salida

### 3.2.7. Optimización del proceso de fermentación

Para preparar el cultivo de siembra, las células se inocularon en medio YPGp, se incubaron por 24 h a 37 °C en agitación constante (250 rpm) y en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, en botellas de vidrio de 250 ml con volumen de operación de 100 mL se inocularon en medio YPGc al 7 % v/v glicerol crudo y a 37 °C por 96 h condiciones apropiadas para la optimización de acuerdo al análisis estadístico realizado. La concentración de 2,3-BDO y glicerol se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Todos los parámetros de optimización se realizaron por triplicado.

# CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1. Caracterización fisicoquímica del glicerol crudo

Las pruebas analíticas se llevaron a cabo en el glicerol residual muestreado en la planta productora Mexicana de Biodiesel Moreco. Las mediciones incluyen la viscosidad, densidad, poder calorífico, pH, porcentaje de cenizas, jabones, metanol, humedad y glicerol.

En la Tabla 3 se muestran los promedios de tres mediciones de cada análisis. El glicerol residual utilizado en este estudio contenía 4.3% metanol cuando se hicieron estas pruebas. El bajo contenido de poder calorífico y de la alta viscosidad sugieren que se debe al contenido de jabones, glicéridos y esteres disueltos en la mezcla. El poder calorífico de la mezcla de glicerol residual fue en promedio de 6564.115 cal/g, aproximadamente 34% mayor que la de glicerol puro, que es de 4289.913 cal/g (Gupta y Kumar, 2012). Con base en el calor de combustión, un uso térmico es una elección obvia para el uso directo del glicerol residual. Los estudios han informado de que la co-combustión del glicerol residual con otro tipo de biomasa podría dar resultados favorables (Thompson y He, 2006).

El glicerol residual del proceso de biodiesel es una sustancia valiosa al cual se puede dar cientos de usos. Sin embargo, para este residuo el proceso de purificación implica un alto costo y generalmente fuera de la viabilidad económica para las pequeñas y medianas plantas productoras de biodiesel. Por ello, la necesidad de explorar usos alternativos para el glicerol residual y así producir biodiesel más competitivo en el creciente mercado global.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo.

Determinación	Valores			
	Este trabajo	(Hu <i>et al.</i> , 2012)	(Thompson y He, 2006)	(Yang, <i>et al.</i> , 2015)
Poder calorífico (cal/g)	6564.115	-	4442.533	-
% Cenizas	4.12	2.7	2.8	4
% jabón	2.67	ND	22	-
% Me-OH	4.3	6.2	23.4	0.2
% humedad	0.389	28.7	10	5
Viscosidad (cP)	58	15	8.882	-
pH	10	6.9	6.97	-
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	1.025	1.2	-	-
% Glicerol	38	63	12.3	88

ND: No detectado.

## 4.2. Bioproceso para la producción de 2,3-Butanodiol a partir de Glicerol crudo

### 4.2.1. Aislamiento de microorganismos

Se aislaron 17 diferentes cepas nativas en medios selectivos YPGI y YPGs de los lodos muestreados en la planta de biodiesel. Las cepas que metabolizaron glicerol puro fueron once y a excepción de tres, ocho fueron capaces de metabolizar glicerol crudo aunque presentaron crecimiento tardío con este sustrato, Todas fueron capaces de fermentar lo glucosa. Esto se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Características bioquímicas y fisiológicas de las cepas aisladas.

	ID	Interpretación de resultados Voges–Proskauer (VP)	Bacteria	Sustrato		
				Glucosa	Glicerol puro	Glicerol Crudo
1	LAR1	Negativo	Hongo	5	0	0
2	LAR2	Negativo	Hongo	4	0	0
3	LAR3	Negativo	Bacteria	5	0	0
4	LAR4	Negativo	Hongo	3	0	0
5	LAR5	Negativo	Bacteria	5	2	0
6	LAR7	Negativo	Hongo	5	0	0
7	LAR11	Negativo	Bacteria	5	2	0
8	LAR24	Negativo	Hongo	5	0	0
9	LRB3	<b>Positivo</b>	Bacteria	5	3	2
10	LRB4	<b>Positivo</b>	Bacteria	5	3	2
11	LRB11	Negativo	Bacteria	4	3	1
12	LRB12	Negativo	Bacteria	3	3	1
13	LRB18	<b>Positivo</b>	Bacteria	5	3	1
14	LRBD1	<b>Positivo</b>	Bacteria	5	2	1
15	LRBD5	Negativo	Bacteria	4	2	0
16	LRBD6	<b>Positivo</b>	Bacteria	5	3	2
17	LRBD9	Negativo	Bacteria	5	2	2

Interpretación: Nivel de crecimiento con diferentes sustratos, donde 0 es nulo y 5 el mayor.

#### 4.2.2 Selección de cepas nativas asimiladoras de Glicerol crudo y productoras de 2,3-BDO

Al realizar la fermentación en los medios YPGp y YPGc se pudo determinar que once de las cepas aisladas de los lodos extraídos de la planta de biodiesel fueron bacterias con la capacidad de asimilar el glicerol puro y ocho utilizaron el glicerol crudo como fuente de carbono. Cabe señalar que todas crecieron en medios YPD con glucosa como sustrato.

La detección mediante la prueba Voges-Proskauer, que detecta acetoin y diacetilo, que son intermedios en la producción de 2,3-BDO, dio como resultado positivo para cinco cepas (LRB3, LRB4, LRB18, LRBD1 y LRBD6). En la Fig. 5 se puede apreciar el cambio de coloración del medio de amarillo a rojo, esto debido a que el acetoin en presencia de oxígeno se oxida a diacetilo y origina una coloración roja al reaccionar con los restos guanidínicos de algunos aminoácidos de la peptona del medio (Ej. Arginina).



Fig. 5. Cambio de coloración debido a la producción de acetoín, prueba de Voges–Proskauer.

Los análisis de FTIR se llevaron a cabo para confirmar la producción de 2,3-BDO en los fermentados con las cepas aisladas. En la Fig. 6 se aprecia las bandas infrarrojas características de las bandas de estiramiento O-H y C-O en alcoholes. Además, se observan una banda ancha de estiramiento O-H centrada entre  $3500\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$  y en la región  $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda característica de C-O en alcoholes y fenoles. La vibración de estiramiento C-C-O de alcoholes secundarios en este caso para el 2,3-BDO se localiza en la región  $1058\text{ cm}^{-1}$ . Mientras que la absorción por estiramiento O-H se observa en la región de  $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ .

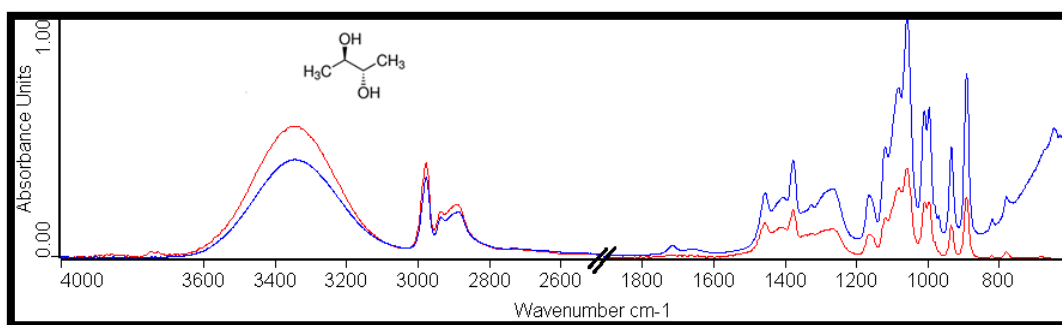


Fig. 6. Espectro de IR en la región de estiramiento OH y la estructura (inserción) del 2,3-BDO.  
 (— Espectro IR del 2,3-BDO base de dato; — Espectro IR del fermentado de la cepa LRB3).

Para seleccionar la cepa que se emplearía en el presente trabajo, se realizó un perfil de crecimiento con las cinco colonias aisladas. La evaluación, se realizaron en medio YPGp al 2% v/v y bajo condiciones anaeróbicas. El medio fue suplementado con peptona y extracto de levadura (1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), para asegurar el crecimiento, independientemente de la capacidad de velocidad de fermentación de los aislados. El crecimiento, en comparación en medio YPD (2%) fue menor. El porcentaje de glicerol residual al inicio de la fase estacionaria era del 2%, es decir que la fuente de carbono no era lo que estaba limitando el crecimiento. De acuerdo a los resultados (Fig. 7) la colonia con LRB3 presentó producción de 2,3-BDO (de acuerdo a la prueba de Voges-Proskauer y al FTIR) y una mayor velocidad de crecimiento usando glicerol como sustrato, en consecuencia fue seleccionada para futuras evaluaciones.

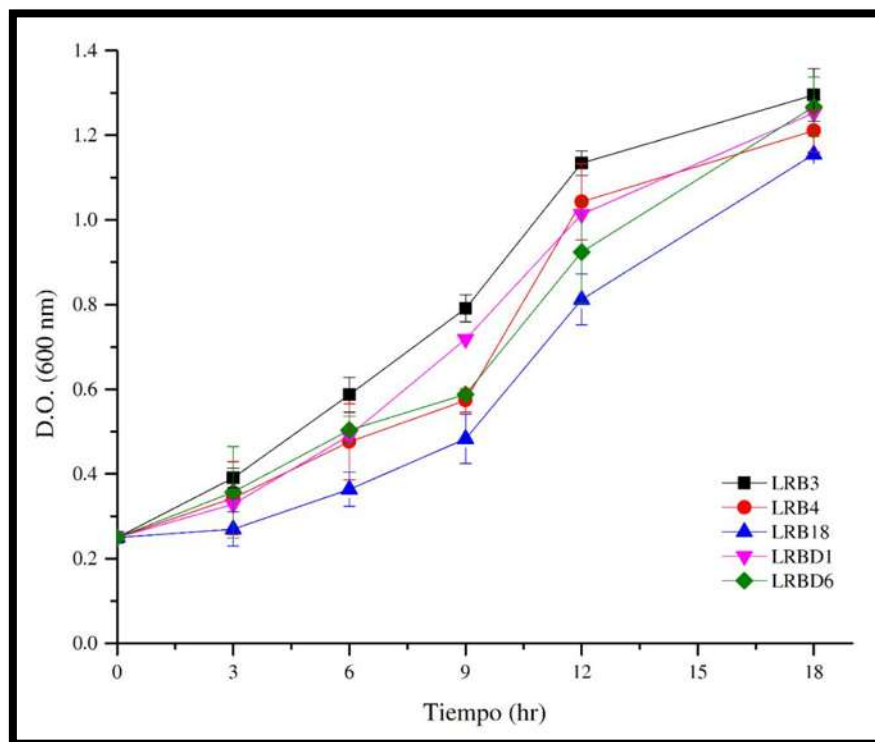


Fig. 7. Perfil de crecimiento realizados en el medio YPGp al 2% v/v de glicerol de las cepas productoras de 2,3-BDO.

## 4.2.3. Generación de 2,3-Butanodiol en fermentación por lote

La cepa LRB3 fue la que mostró un mayor crecimiento lo que sin duda es una característica relevante a la hora de seleccionar los candidatos para formar parte de cultivos iniciadores en el en glicerol crudo. Con el objeto de conocer los perfiles de fermentación de la cepa LRB3 se realizaron ensayos con diferentes temperaturas, tiempos y concentraciones del sustrato en medio YPGc suplementado con peptona y extracto de levadura, para asegurar el crecimiento, independientemente de la capacidad de velocidad de fermentación. Para el análisis se utilizó el HPLC. El pico del 2,3-BDO y sus posibles impurezas mostraron solapamiento, pero no fue un problema durante este experimento debido a que las impurezas no se detectaron durante el período de fermentación (Fig. 8).

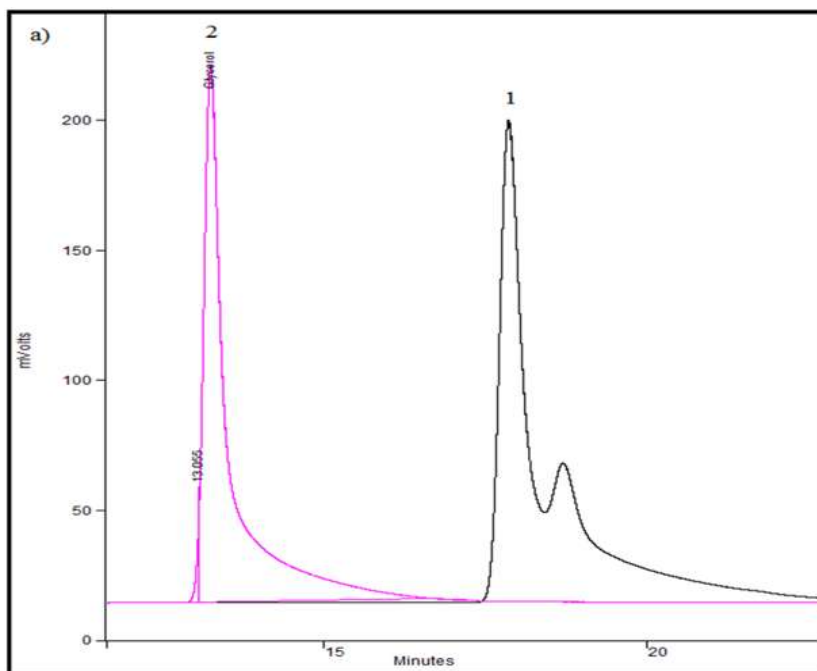


Fig. 8. Estándares de 2,3-BDO y glicerol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).  
Pico 1: 2,3-BDO; pico 2: glicerol.

La eficiencia de la producción de 2,3-BD por la bacteria identificada como LRB3 se evaluó mediante el cultivo de la cepa en condiciones de fermentación por lote en un medio complejo a diferentes concentraciones iniciales de glicerol crudo (2, 4 y 6% v/v), sin regulación de pH. El glicerol crudo se usó directamente sin purificación previa, lo que simplifica el proceso y reduce los costes de funcionamiento. La fermentación se continuó hasta que el sustrato se agotó completamente. En la Fig. 9 se comparan los diferentes perfiles de producción de 2,3-BDO de los diferentes experimentos a las 96 h de operación.

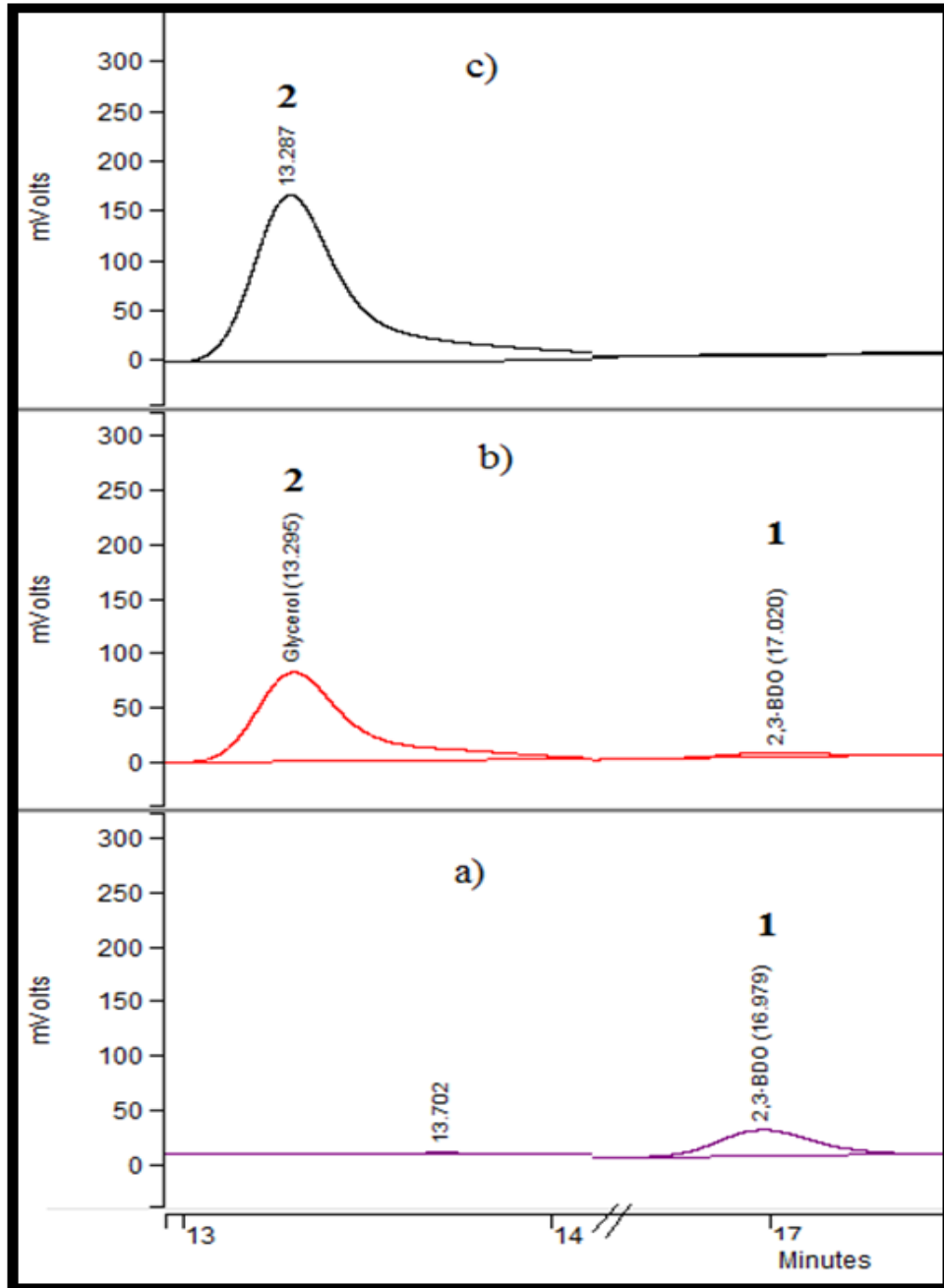


Fig. 9. Identificación de 2,3-BDO por HPLC. Análisis de cultivos por lotes de bacteria LRB3. Concentración del medio glicerol crudo al 2% (v/v) y diferentes condiciones de temperatura a) 35 °C; b) 40 °C y 45 °C. Pico 1:2,3-BDO; pico 2: glicerol

Los experimentos se hicieron por triplicado y se representan sus promedios indicando la desviación estándar con barras de error en las Fig. 10, 11 y 12.

La producción de 2,3-BDO es ligeramente lenta pero estable para los fermentados alimentados con diferentes concentraciones de glicerol crudo a 35 y 40°C. Las concentraciones de 2,3-BDO alcanzaron su mayor producción (1.114 g/l<sub>cultivo</sub>) a las 96 h bajo las condiciones de 6% a 40°C en comparación con la de 35°C a la misma concentración de sustrato en un menor tiempo (72 h) la máxima producción (0.90 g/l<sub>cultivo</sub>). Por otro lado, la producción a 45 °C fue nula para todas las concentraciones planteadas (Fig. 12).

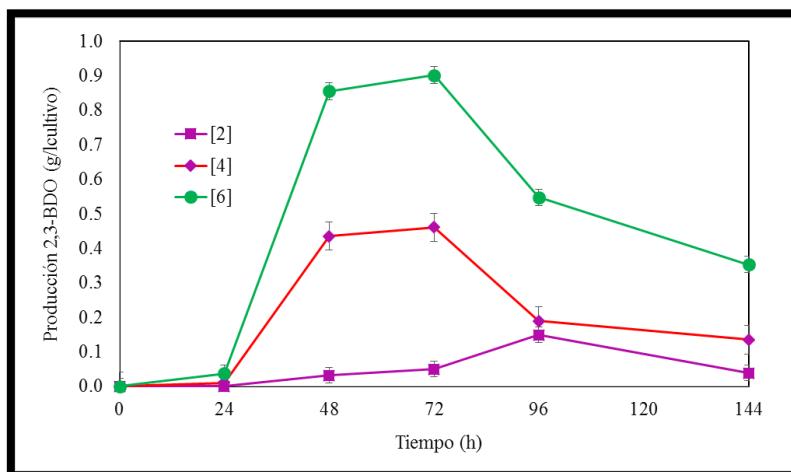


Fig. 10. Perfil de formación de 2,3-butanodiol en la cepa LRB3, a 35 °C y tres diferentes concentraciones de glicerol crudo como sustrato (2, 4 y 6% v/v).

En las tres concentraciones planteadas se produjeron niveles de 2,3-BDO para los ensayos a 35 y 40 °C. La cepa fue capaz de metabolizar el glicerol transcurrido 96 h. Sin embargo para el ensayo a 45 °C no hubo actividad microbiana lo cual se vio reflejado en el consumo del glicerol y la nula producción del 2,3-BDO como se observa en la Fig. 10.

En cuanto a la producción del 2,3 BDO, la temperatura de operación a 40 °C favoreció a la cantidad de producción, presentaron una concentración del metabolito mayor que en las

temperaturas restantes, lo que indica un mayor desplazamiento de la ruta de degradación de piruvato hacia la formación de 2,3-BDO por la acción de la 23BDO deshidrogenasa (Köpke *et al.*, 2011).

En función de la producción de 2,3-BDO, pueden distinguirse 2 temperaturas de operación diferentes, con unos niveles de producción medios de 1.114 g/L<sub>cultivo</sub> y 0.902 g/L<sub>cultivo</sub> a 35 y 45 °C respectivamente.

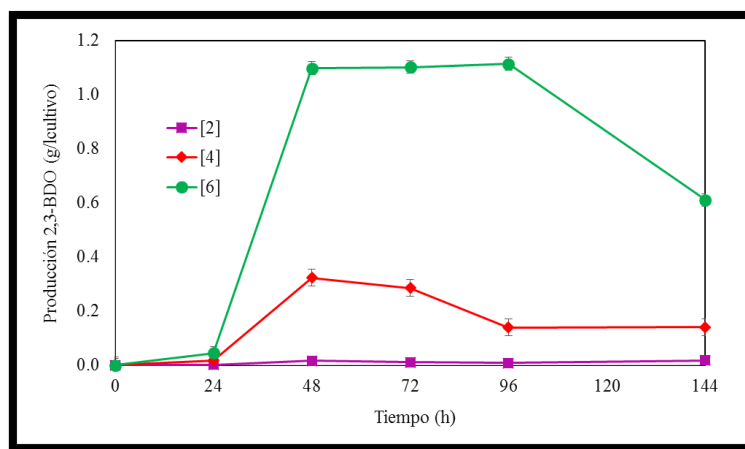


Fig. 11. Perfil de formación de 2,3-butanodiol en LRB3, a 40 °C y tres diferentes concentraciones de glicerol crudo como sustrato (2, 4 y 6% v/v).

En la Fig. 12 se logra apreciar que a alta temperatura (45 °C) el proceso se inhibe originando una pérdida de actividad por parte de la cepa utilizada lo cual es excesivamente significativo.

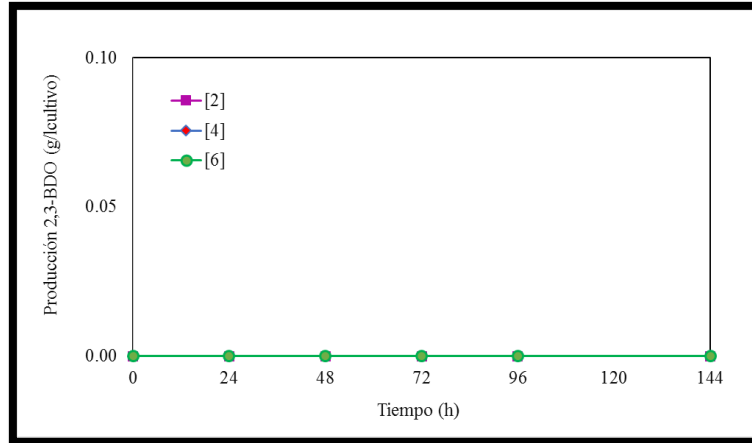


Fig. 12. Perfil de formación de 2,3-butanodiol en la cepa LRB3, a 45 °C y tres diferentes concentraciones de glicerol crudo como sustrato (2, 4 y 6% v/v).

Se desarrolló un modelo matemático para la optimización del proceso de producción de 2,3-BDO a partir del glicerol residual. El análisis de varianza (ANOVA) demostró que las variables estudiadas poseen un efecto individual y sinérgico en la producción del 2,3BDO. La [Ec. 2] representa el modelo empírico encontrado para las condiciones experimentales usadas en el estudio.

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & -0.57525 - 0.0174792 * X_1 + 0.0803042 * X_2 - 0.0134306 * X_3 + 0.0387813 * X_1^2 - & [Ec. 2] \\
 & 0.0014625 * X_1 * X_2 - 0.00128299 * X_1 * X_3 - 0.00129708 * X_2^2 + 0.000134722 * X_2 * X_3 \\
 & + 0.0000581055 * X_3^2
 \end{aligned}$$

Donde:  $Y_1$  es la concentración de 2,3-BDO, y las variables de operación  $X_1$  es la concentración de glicerol crudo,  $X_2$  es la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $X_3$  es el tiempo (h).

En la Fig. 13 se observa que la concentración máxima de 2,3-BDO que se podía obtener de 2.28  $\text{g/L}_{\text{cultivo}}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  y con una alimentación inicial de 7% v/v de glicerol crudo. La producción proyectada es incrementada en 104%.

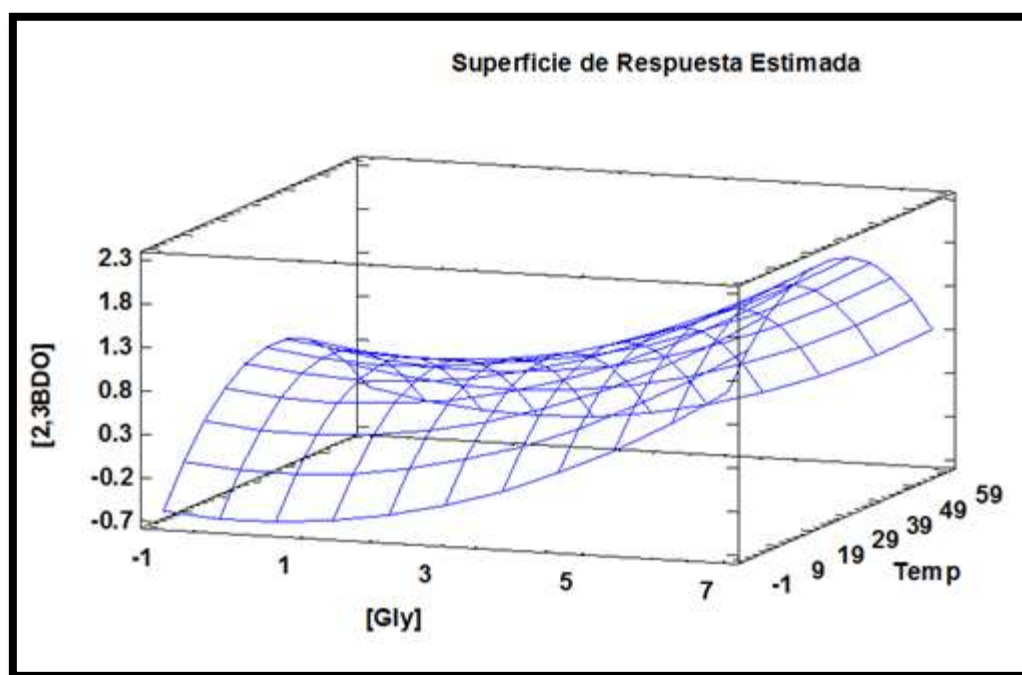


Fig. 13 Diagrama superficie de respuesta de la producción de 2,3-BDO

En este estudio, utilizando la cepa aislada LRB3, las condiciones de temperatura  $37^{\circ}\text{C}$  y 7 % v/v mejoraron la asimilación y el consumo final de glicerol, reflejándose directamente en la producción final del 2,3-BDO, mejorando significativamente en un 65.18% en comparación con las condiciones de trabajo inicialmente. Notablemente mejoradas las concentraciones alcanzadas ( $3.2 \text{ g/L}_{\text{cultivo}}$ , rendimiento  $Y_{2,3\text{BDO/glicerol}} 0.144 \text{ g/g}$ ). Lee *et al.* (2012) reportaron la producción de de  $6.9 \text{ g/L}_{\text{cultivo}}$ , usando una cepa genéticamente modificada (*E. coli* SGSB03) y

con un rendimiento relativamente alto de conversión de glicerol consumido de 0.80 g/g. Por otro lado, Metsoviti *et al.*, 2011 aislaron una *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 con la cual se obtuvo una concentración de 2,3-BDO de 22 g/l y un rendimiento relativamente alto de conversión de glicerol consumido de 0.40 g/g. Además, Sattayasamitsathit *et al.* (2011) investigaron el uso potencial de glicerol crudo como único sustrato para la producción de 2,3-BDO, pero su técnica produjo también bajos rendimientos (9.54 g/L).

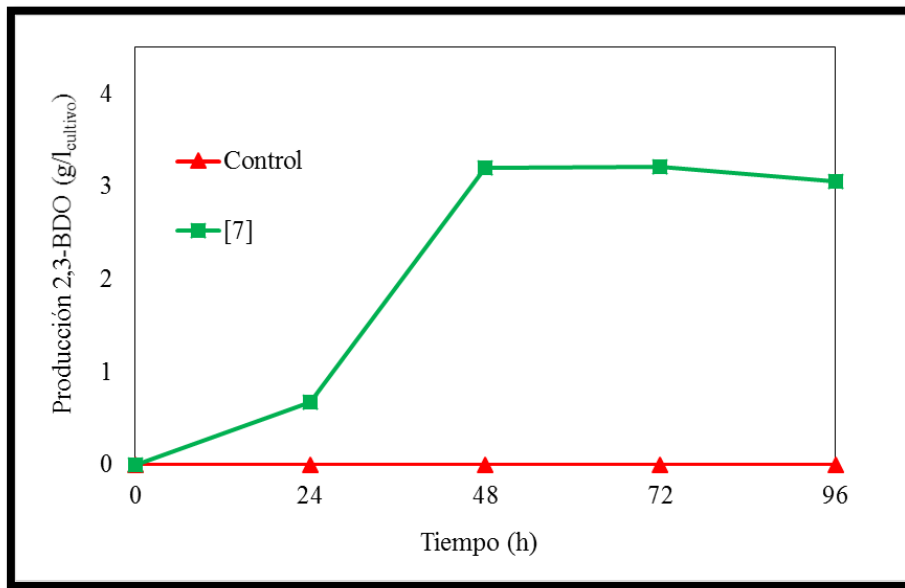


Fig. 14. Perfil de formación de 2,3-butanodiol con la cepa LRB3, a 37 °C diferentes concentraciones de glicerol crudo como sustrato (2, 4 y 6% v/v).

Estos resultados sugieren que el glicerol crudo es adecuado como materia prima. Sin embargo, el glicerol tiene un valor energético menor en comparación con la glucosa y otros carbohidratos de 6 carbonos (Martínez-Gómez *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Por lo tanto, en comparación con la glucosa, se espera que el glicerol de rendimientos menores de productos bioquímicos derivados de piruvato (Zhu *et al.*, 2010). Además, el bajo contenido de glicerol (38 %) en el subproducto del biodiesel utilizado, impidió que la concentración de metabolito fuera mayor.

Además, hasta donde se conoce, un número limitado de investigaciones tratan con la producción de 2,3-BDO como el metabólico principal de la asimilación de glicerol residual sin tratamiento previo y sin co-sustrato alguno (ej. glucosa).

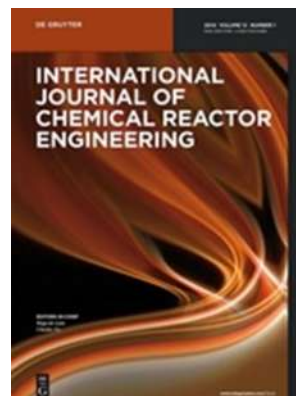
### 4.3 Publicaciones en revistas indexadas

#### 4.3.1. Thermodynamic analysis of ethanol synthesis from glycerol by two-step reactor sequence

Erick A. Mendoza-Chávez <sup>a</sup>, Nancy E. Rodríguez-Olalde <sup>b</sup>, Rafael Maya-Yescas <sup>a</sup>, Jesús Campos-García <sup>c</sup>, and Jaime Saucedo-Luna <sup>a</sup>, Agustín J. Castro-Montoya <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería Química, <sup>b</sup> Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera, <sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, México

\* Corresponding author: E-mail: ajcastro@umich.mx



#### Highlights:

- Glycerol was dry-reformed to syngas and sequentially utilized for ethanol synthesis
- Adding CO<sub>2</sub> to the glycerol dry reforming reactor was advantageous for ethanol synthesis
- Maximum yield was 1 mole ethanol per mole glycerol at CO<sub>2</sub>/glycerol ratio  $\geq 2$
- ethanol synthesis from syngas was dependent on the temperature and CO<sub>2</sub>/glycerol ratio
- Wasted glycerol from biodiesel-manufacturing is suitable for syngas/ethanol production

**Abstract**

Conversion of biomass-derived syngas to ethanol has recently received significant attention because of strong demands for alternative and renewable energy sources; therefore glycerol has been suggested as promising raw material for obtaining ethanol in two consecutive steps. In this work, a thermodynamic study of glycerol dry reforming to produce syngas and subsequent ethanol production, as two-step process, was evaluated by means of the method of Gibbs free energy minimization. The effect of parameters such as reaction temperature, CO<sub>2</sub>/glycerol ratio (CGR), and pressure (P) on system performance was investigated. Reactions were simulated between 700 K–1500 K and CGR range of 0–5, at 1 atm pressure. Calculations were performed with Aspen Plus 8.4, using Peng–Robinson thermodynamic method for properties estimation. Optimum conditions for syngas and ethanol production were determined, in order to prevent carbon deposition and methane formation. At temperatures above 900 K and CGR < 1, between 3 to 7 mole of H<sub>2</sub> / mole of glycerol can be generated. Results indicated that the addition of CO<sub>2</sub> to the glycerol dry reforming reactor favored syngas and ethanol synthesis. The maximum yield obtained was 1 mole of ethanol per mole of glycerol at CGR ≥ 2. Simulations indicate that temperature and CGR are essential factors for determining the process efficiency of the production of ethanol from syngas. These results suggest that glycerol wasted from biodiesel manufacturing should be useful as efficient raw material for syngas and ethanol production.

**Key words:** biofuels, biomass, glycerol dry reforming, ethanol, syngas, thermodynamics.

## 1. Introduction

### 1.1. Novel energies and fuels

The use of renewable energy is one of the most efficient ways to achieve sustainable development. Novel energy generation processes have been developed in recent years that use renewable energy sources and feedstock, which does not compete with food sources. Therefore, green energy processes have promising role in future chemical industries. In order to be attractive for commercial applications, bioenergy and biofuels processes should exhibit competitive costs, worldwide availability, and built-in functionality (Kauffman *et al.*, 2014). Biodiesel production by trans-esterification processes using tri-glycerides and methanol as raw materials has been an important alternative method for biodiesel production; however it has generated excess of glycerol waste. Although this glycerol by-product is impure and not acceptable for use in foods or pharmaceuticals, its price is typically lower than propylene-glycol or sorbitol, which makes it attractive as raw material for energy production (Sarma *et al.*, 2012; Bion *et al.*, 2012; Climent *et al.*, 2010; Nanda *et al.*, 2014; Authayanun *et al.*, 2013).

### 1.2. Resources and options for energy production

Glycerol can be raw material for the synthesis of many compounds using oxidation, etherification, esterification, trans-esterification, aqueous reforming, auto-thermal reforming, and dry reforming. Accordingly, the conversion of glycerol into high energetic chemicals, such as ethanol, has been a research topic of increased interest in recent years (Gong *et al.*, 2012; Khanna *et al.*, 2013). Ethanol production has attracted attention worldwide, because it can be used as fuel additive and partial substitute for gasoline, hydrogen carrier or chemical feedstock (Gong *et al.*, 2012; Toscano *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Thus, production of ethanol from a renewable and cheap feedstock would help promote sustainable energy development (Wang *et al.*, 1992).

Currently, ethanol is mainly produced by fermentation of biomass-derived sugars, a process that is restricted to biomass components in the low substrate range (such as starch and cellulose), because some biomass components (such as lignin) are not suitable to be converted into sugars

during fermentation. Another major process for the commercial production of ethanol involves ethylene hydration over solid acidic catalysts, which is considered unsustainable, because it involves depletion of fossil fuels. Therefore, catalytic conversion of syngas (syngas) to ethanol in large quantities seems attractive; however, the direct conversion of syngas to ethanol remains challenging. Although some attempts have been ongoing for the past 90 years, commercial processes for the generation of ethanol from glycerol do not exist; these processes exhibit handicaps such as low yields and poor product selectivity, due to the slow kinetics of the initial C–C bond formation and the fast chain growth of C<sub>2</sub> intermediates (Yue *et al*, 2014).

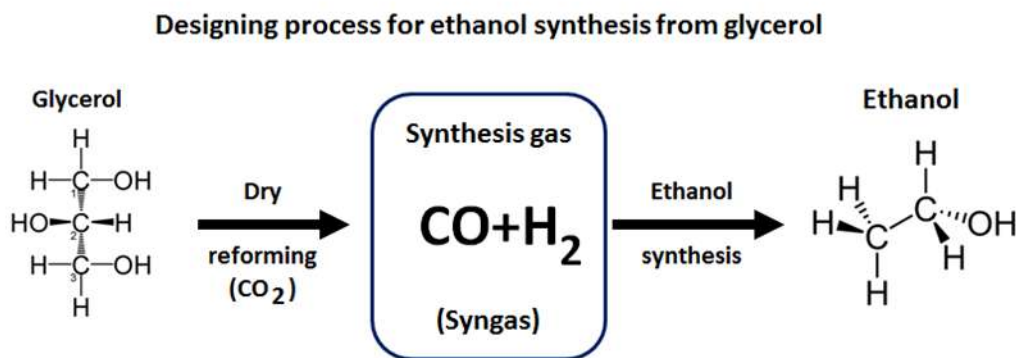
Alternatively, syngas can be obtained from glycerol reforming reactions, and later be converted into ethanol following catalytic reactions. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), which has been implicated as one of the major green house effect gases, and glycerol are two abundant and economic raw materials that can be used in these catalytic processes. Additionally, the synthesis of ethanol from syngas is a well-known process, and glycerol dry reforming is also well-known and environmentally friendly (Authayanun *et al*, 2013; Gong *et al*, 2012; Yue *et al*, 2014; Skidmore *et al*, 2013; Izumi, 1997; He and Zhang, 2008; Andersson *et al*, 2014).

Recently, the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2011) presented a summary of developing technologies and projected costs for the production of biofuels until 2030, based on the industrial development level of 2010. In this report, gasification of biomass to syngas followed by catalytic upgrading to either ethanol or butanol had an estimated production cost (\$12 per 20 GJ) comparable to biochemical processes (\$13 per 30 GJ) (Rostrup - Nielsen, 2004). Further reduction in production costs of fuels derived from gasification will depend on the development of integrated gasification combined cycles (IGCC), which are currently at demonstration phase of 5 MW – 10 MW, to obtain practical experience and reduce technical risks (Kirkels, and Verbong, 2011). A comparison of biochemical and thermochemical process for biofuels production, in terms of energy content and generation, is shown in Table 1.

**Table 1.** Comparative parameters of biochemical and thermochemical processes.

Process	Biofuel yield (Liters/dry wt ton)		Energy content (MJ/L)	Energy yield (GJ/ton)	
	Low	High	Low heat value	Low	High
<b>Biochemical</b>					
Enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol	110	300	21.1	2.3	6.3
<b>Thermochemical</b>					
Syngas to Fischer- Tropsch diesel	75	200	34.4	2.6	6.9
Syngas to ethanol	120	160	21.1	2.5	3.4

The purpose of this work is to determine feasibility of ethanol production using a two-step process (Fig. 1), considering thermodynamics' analysis. The first step consists of the conversion of glycerol to syngas by dry reforming with CO<sub>2</sub> as proposed in (Wang *et al*, 2009; Kale *et al*, 2010 a-b; Fernández *et al*; 2010), and the second step comprises ethanol synthesis using the syngas produced in step one (Zhu *et al*, 2012; Gupta *et al*, 2011; Fang *et al*, 2009). A comprehensive understanding of the proposed process at elementary reaction level is beyond the scope of this current work.



*Figure 1. Alternative approach for ethanol synthesis by glycerol dry reforming.*

## 2. Methodology

Equilibrium compositions, for the two steps, were calculated by the minimization of the Gibb's free energy; Aspen Plus 8.4 software was used for calculations. The RGibbs reactor subroutine and Peng–Robinson properties estimation method were selected for thermodynamic modeling. This reactor models phase chemical equilibrium, which depend on temperature, pressure and composition (reactants and products). The calculation of chemical equilibrium is useful because it allows determining the maximum degree of progress of a reaction, regardless the existence of catalyst nor reaction rate. It can be calculated experimentally, manual form or through a simulator such as Aspen Plus. Although most chemical industrial reactions not reach equilibrium, operating conditions of a reactor should be selected to maximize either conversion or profit, so the calculations presented are useful to study the technical feasibility of new processes, as well as to propose potential operating regions.

### 2.1. Reactor configuration and reaction scheme

Feedstock to reactor A consists of 1 mole/min of pure glycerol. Possible products of the reforming reaction are ethanol, water, hydrogen, carbon monoxide, carbon dioxide, methane, and solid carbon (graphite). Temperature ranges from 700 K to 1500 K for the reactor A, and from 400 K to 1000 K for reactor B; CGR ranges from 0 to 5 at 1 atm pressure. The main

reactions that may occur during glycerol dry reforming are expressed in Equations (1-9), and operating conditions for glycerol reforming in reactor A (RX-A) are shown in Table 2.

Reaction	$\Delta H^0$ , kJ mole <sup>-1</sup>	
$C_3H_8O_3 + 1.5O_2 \leftrightarrow 4H_2 + 3CO_2$	- 597.73	(1)
$CO + 3H_2 \leftrightarrow \text{methane} + H_2O$	-206.11	(2)
$CO_2 + 4H_2 \leftrightarrow \text{methane} + 2H_2O$	-164.94	(3)
$CO_2 + \text{methane} \leftrightarrow 2H_2 + 2CO$	247.28	(4)
$CO + H_2O \leftrightarrow H_2 + CO_2$	-41.17	(5)
$H_2 + CO \leftrightarrow C + H_2O$	-131.126	(6)
$\text{methane} \leftrightarrow 2H_2 + C$	74.85	(7)
$2CO \leftrightarrow CO_2 + C$	-172.43	(8)
$C + 2H_2O \leftrightarrow 2H_2 + CO_2$	90.09	(9)

**Table 2.** Operating conditions for reactors.

Operating Conditions	Reactor RX-A	Reactor RX-B
Temperatures (K)	700-1500	400-1000
Pressure (atm)	1	1
CGR	0-5	-
Feed (mole)	1	RX-A outlet stream
Objective	High yield of syngas	Higher yield of ethanol
	The lowest yield of methane	-

The reactions for synthesis of ethanol from syngas are the following: The general reaction, reported by Fang *et al.*, 2009, for the synthesis of alcohols from syngas is described by Eq. (10), while ethanol synthesis is described in Eqs. (11) to (15). These reactions are thermodynamically favorable and highly exothermic (Kale and Kulkarni, 2010 a-b; Chiang *et al.*, 2012). Reactions

(11-13) were reported by Chiang *et al.* (2012), and reactions (14-15) by He and Zhang (2008). Operating conditions for ethanol synthesis in reactor B (RX-B) are shown in Table 2.

Reaction	$\Delta H^0$ , kJ mole <sup>-1</sup>	
$n\text{CO} + 2n\text{H}_2 \leftrightarrow \text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH} + (n-1)\text{H}_2\text{O}$		(10)
$2\text{CO}_{(g)} + 4\text{H}_{2(g)} \leftrightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(g)}$	-253.6 kJ mole <sup>-1</sup>	(11)
$\text{CO}_{(g)} + 2\text{H}_{2(g)} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{OH}_{(g)}$	-90.5 kJ mole <sup>-1</sup>	(12)
$\text{CH}_3\text{OH}_{(g)} + \text{CO}_{(g)} + 2\text{H}_{2(g)} \leftrightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(g)}$	-165.1 kJ mole <sup>-1</sup>	(13)
$6\text{CO}_{(g)} + 3\text{H}_2\text{O}_{(g)} \leftrightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{(g)} + 4\text{CO}_{2(g)}$	-462.64 kJ mole <sup>-1</sup>	(14)
$6\text{H}_{2(g)} + 2\text{CO}_{2(g)} \leftrightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{(g)} + 3\text{H}_2\text{O}_{(g)}$	-788.084 kJ mole <sup>-1</sup>	(15)

The possible reactions occurring in this work were the dry reforming of glycerol, methanation reactions, and carbon formation reactions in reactor A (RX-A) Eqs. (1–9). It is important to note that reactions (7-9) are able to deactivate catalysts because of fouling by coke deposition (Jiménez-García *et al.*, 2013); therefore their minimization is a target during simulation of RX-A. Reactions describing transformation of syngas to ethanol (11–15), occur in reactor B (RX-B); in this case the target is maximization of ethanol production.

## 2.2. Thermodynamic equilibrium calculation

The Gibbs free energy is a thermodynamic variable used to identify chemical equilibrium in a multicomponent system, following its global minimization (Perry *et al.*, 1992); additionally it allows identifying the amount of substances present in a vessel, at thermodynamic equilibrium conditions (16). If a system contains  $n$  components and  $p$  phases, the change of Gibbs free energy of the whole system as function of changes in composition is defined as (17). In order to predict equilibrium composition, it is required to achieve condition (16) by minimizing Eq. (17) as function of mole fractions, which in general is a difficult and time demanding task.

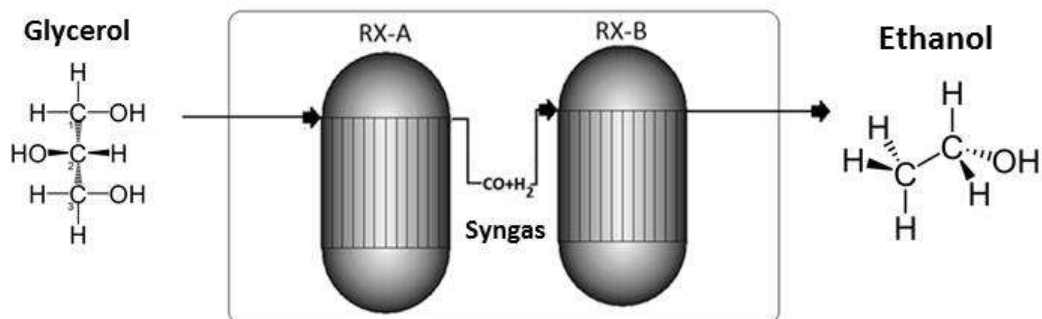
$$(dG_{sys})_{T,P} = 0 \quad (16)$$

$$(dG_{sys})_{T,P} = \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (\mu_i dn_i)_j \quad (17)$$

However, in the case of known stoichiometry, such as reactions taking place in RX-A and RX-B, the actual number of degrees of freedom diminishes; then it is possible to perform the evaluation of chemical composition by reaction equilibrium constants followed by minimization of free energy. Now, minimum free energy of any system is found when Equation (17) is equal to zero, and by solving the system derived from (17) plus mass balances it is possible to find the equilibrium composition (Schefflan, 2011). These steps are followed by procedure RGibbs in ASPEN 8.4, used in this work.

### 3. Results and Discussion

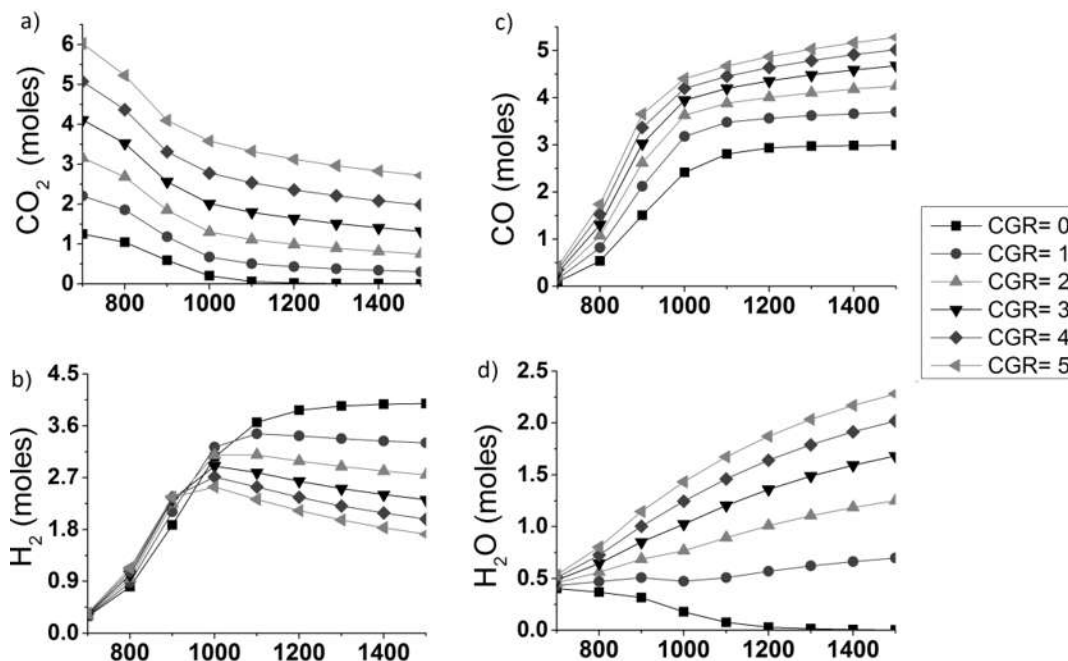
Pressure variable exhibit no significant effect on glycerol oxidation reaction; therefore it was kept constant at 1 atmosphere. Thermodynamic analysis of ethanol generation was performed to evaluate the effect of two process variables, temperature and CO<sub>2</sub>/glycerol ratio (CGR), while estimating a glycerol conversion of 100% in the process of dry reforming. The effect of each process variable on the products generated was analyzed in detail. The variables' effects on the amount of desired and undesired products obtained in the process were also determined; these products were hydrogen, carbon monoxide, water, carbon dioxide, graphite, and methane (Fig. 2).



**Figure 2.** Glycerol dry reforming (RX-A) and ethanol synthesis (RX-B).

### 3.1. Generation of hydrogen and syngas by glycerol dry reforming

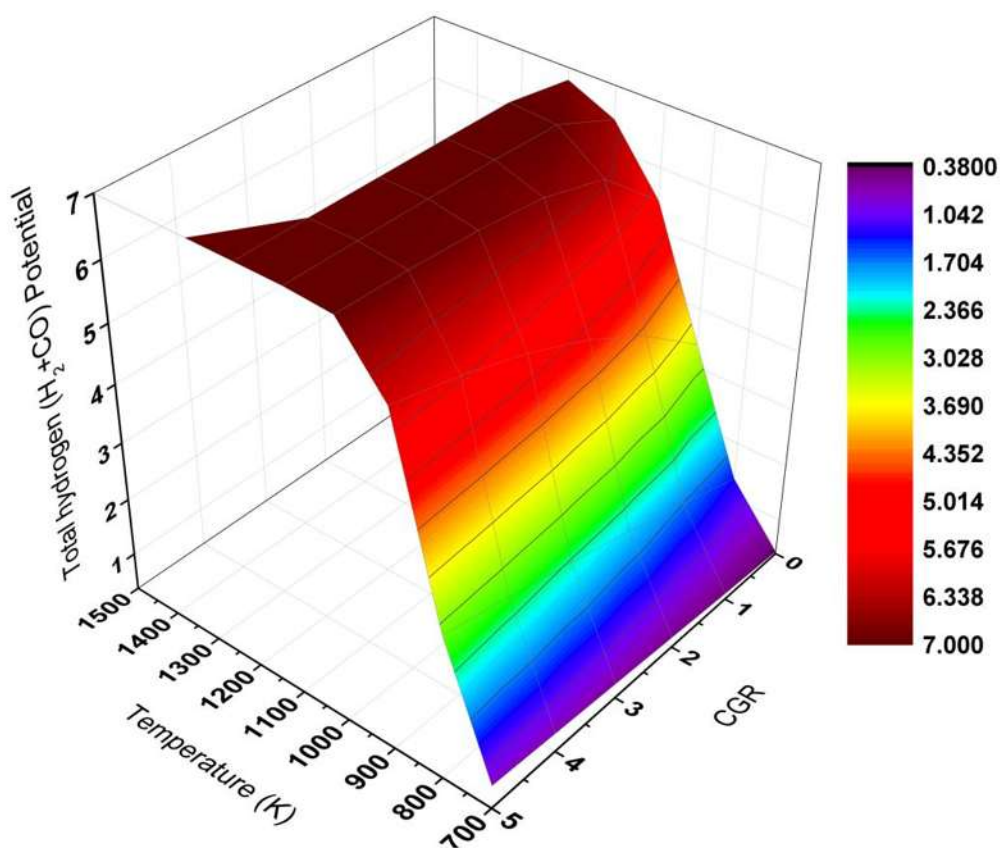
The total syngas potential generation of the processes was defined as the total moles of hydrogen and carbon monoxide produced per mole of raw material. The potential generation of syngas was determined for glycerol dry reforming calculating a glycerol conversion of 100% with H<sub>2</sub> and CO as the primary products in the RX-A reactor. Simulation results showed that the H<sub>2</sub> and CO content increased proportionally to temperature and CGR (Fig. 3). The maximum H<sub>2</sub> content was observed at CGR  $\leq 1$  in temperatures between 1000 K and 1100 K (Fig. 3a). Because of the stoichiometry of the glycerol oxidation reaction, this is favored at high concentrations of glycerol, which means low values of CGR. Furthermore, in the temperature range studied, this reaction reaches 100% of conversion of glycerol to produce hydrogen. The CO content also increased as a function of temperature with the maximum CO generation occurring between 1000 K and 1300 K (Fig. 3b). In contrast to yield to H<sub>2</sub>, yield to CO was improved at CGR  $\geq 1$ ; resulting in optimal production of syngas at CGR between 1 and 2 (Fig. 4); because high values CGR favor reactions 3 and 4, in which globally H<sub>2</sub> is consumed and CO produced.



**Figure 3.** Generation of products in the glycerol dry reforming system as a function of temperature and CGR in the reactor RX-A. (a) H<sub>2</sub>, (b) CO, (c) CO<sub>2</sub>, and (d) H<sub>2</sub>O. CGR values of zero correspond to 100% glycerol in the absence of CO<sub>2</sub>.

This situation generates competitive optimization of reactions taken place in reactor RX-A, because for  $\text{CGR} \leq 2$  the yield to CO<sub>2</sub> increases; however less CO<sub>2</sub> was generated in the temperature range that favored the generation of syngas (1000 K–1300 K) (Fig. 3c). Additionally, less water generation occurred at  $\text{CGR} \leq 1$ , at the optimal temperature range of the process (Fig. 3d). Based on these results, temperature, CGR, and pressure were found to be essential variables for a establishing a feasible process, suggesting that syngas can be efficiently generated by glycerol dry reforming at temperatures between 1000 K and 1300 K and  $\text{CGR} \leq 1$ .

As stated previously, efficiency of  $H_2$  production is known to be low at  $CGR \geq 2$  (Wang *et al.*, 2009). In agreement with this,  $H_2$  generation was significantly decreased at  $CGR \geq 2$ , indicating that high CGR values reduce process' capability of generating  $H_2$  at temperatures greater than 1000 K (Fig. 4). For example, at temperatures of 1100 K and CGR values between 0–1, about 3 to 3.5 mole of  $H_2$  (~75–87% of the theoretical limit) were generated, while only about 2.3 to 3.0 mole of  $H_2$  (~ 20-30% of the theoretical limit) were generated at CGR values between 4–5; therefore the reactor should be operated at high temperatures to maximize syngas production (Fig. 4).



**Figure 4.** Potential for syngas generation from glycerol dry reforming in reactor RX-A.

### 3.2. Water generation during glycerol reforming process

Water is also generally an undesirable by-product as it reduces the H<sub>2</sub> output from the process; however water generation takes place in almost all reforming processes. Water was generated at a much higher rate compared to other by-products such as methane. About 0.569–1.87 mole of water was generated at 1200 K and a CGR of 0–5 (Figure 3d). The maximum water generation at 1500 K was 2.28 mole at CGR = 5, while the minimum generation was 0.4315 mole at 700 K and CGR= 1. These results indicate that a CGR ≤ 1 is preferred, although a small amount of water will still be produced (Fig 3d).

### 3.3. CO<sub>2</sub> generation during glycerol dry reforming

For glycerol dry reforming in the RX-A reactor, CO<sub>2</sub> generation increased proportionally with CGR (Figure 3c) and as function of temperature. The amount of CO<sub>2</sub> produced at 1200 K and over the CGR range of 0 to 5 increased from 0.432 mole to 3.128 mole. The maximum amount of CO<sub>2</sub> achieved was 6.025 mole at 700 K and CGR = 5, while the minimum was 0.302 mole at 1500 K and CGR = 1. CO<sub>2</sub> generation increased proportionally to CGR values but inversely as a function of temperature, reaching its maximum, 6.025 mole, at 700 K and CGR = 5; meanwhile the minimum correspond to 0.302 mole at 1000 K and CGR = 1 (Fig. 3c). Therefore CO<sub>2</sub> generation depends on both, temperature and the CGR.

### 3.4. Methane generation by glycerol dry reforming

For this study methane as by-product is clearly not desirable, because its formation competes with H<sub>2</sub> generation (Skidmore *et al.*, 2013). Production of methane in RX-A reactor fluctuated between 0 and 1.65 moles per mole of glycerol, at temperatures between 700 K and 1500 K and CGR between 0 and 5 (Fig. 5). Methane generation was thermodynamically inhibited at the optimal conditions for H<sub>2</sub> production, temperatures above 900 K and CGR values between 0 and 1, indicating that methane generation diminished inversely to temperature (Fig. 5). Interestingly, methane generation decreased together with CO<sub>2</sub> generation at temperatures that maximized H<sub>2</sub> production, while CO content increased at process temperatures between 1000 K and 1500 K (Fig. 3). It is important to note that generation of solid graphite is not present at

the best operating conditions for syngas production, desired condition to avoid catalyst deactivation (Jiménez-García *et al.*, 2013); therefore optimization of RX-A is feasible for dry reforming of glycerol.

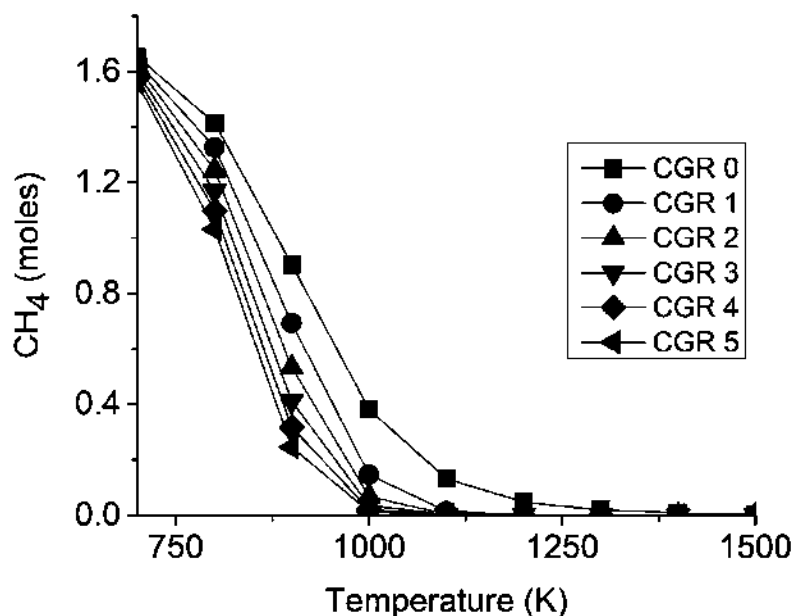


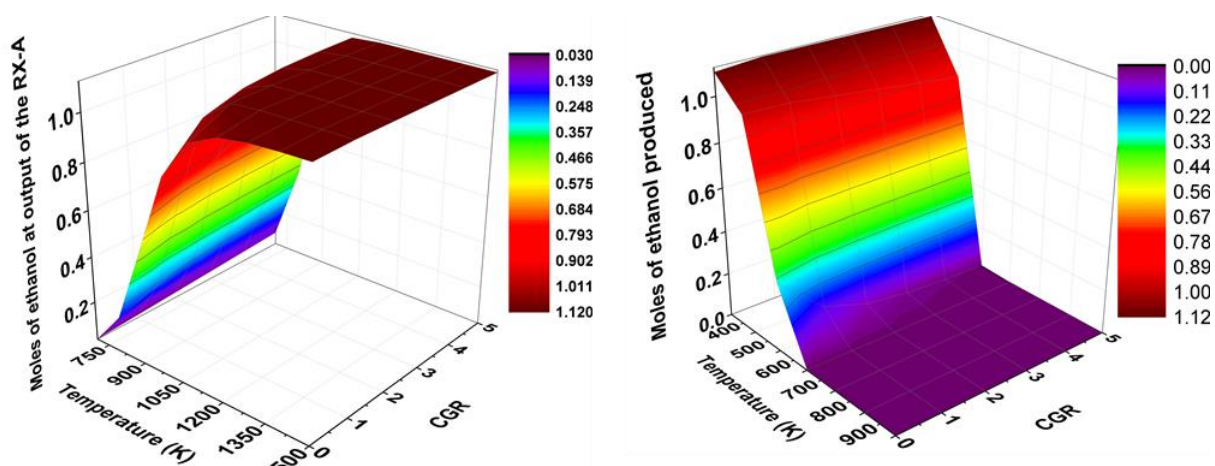
Figure 5. Generation of methane during glycerol dry reforming in reactor RX-A.

### 3.5. Ethanol production from syngas

The second step consists of ethanol synthesis from syngas. As expected, each step requires different operating conditions to improve the overall performance of the process. The target is to maximize the amount of ethanol produced; therefore selection of operating conditions for both reactors is done satisfying this target.

As shown in Figure 2, this is a sequential process: In the 1st stage (reactor A) the synthesis gas is produced by reformation of glycerol, for which high temperatures are required. In the 2nd stage ethanol it is produced from syngas (reactor B) obtained in the 1st stage, for which require low temperatures. These temperatures in each of the reactors improves the overall process efficiency. Ethanol produced increased proportionally with temperature under the RX-A operating conditions (Fig. 4) and inversely

with temperature for the RX-B conditions (Fig. 6). Feeding of CO<sub>2</sub> to RX-A favored ethanol production, reaching a maximum of production at CGR > 2 (Fig. 6a). In contrast, CGR had a less significant effect than temperature on ethanol generation in RX-B, revealing that optimal process temperature is 400 K (Fig. 6b) for the second step.



**Figure 6.** Ethanol generation from glycerol dry reforming as function of CGR. (a) ethanol synthesis by the glycerol reforming process using the RX-A reactor. (b) ethanol synthesis by syngas processing using the RX-B reactor.

#### 4. Conclusions

Thermodynamic equilibrium calculations performed using an Aspen Plus 8.4 model, following the method of minimization of total Gibbs free energy in RGibbs reactor, and estimating properties using Peng–Robinson relationships, were used to model the synthesis of ethanol from glycerol in two consecutive steps: glycerol reforming to obtain syngas and synthesis of ethanol from syngas. Although most chemical industrial reactions not reach equilibrium, operating conditions of a reactor should be selected to maximize either conversion or profit, so the calculations presented are useful to study the technical feasibility of new processes, as well as to propose potential operating regions. Two RGibbs reactors were simulated, one for glycerol dry reforming and another for ethanol synthesis. Glycerol reforming generated a mixture of products such as hydrogen, carbon monoxide, carbon dioxide, and methane even at low temperatures. After a subsequent reaction step these products were used for ethanol synthesis. High temperatures (> 1100 K), low pressures (1 atm), and  $CGR \leq 2$  enhanced ethanol generation. Optimum conditions, for ethanol generation were temperature between 1200 K and 1500 K

and CGR between 1 and 2 at 1 atm for reactor A, and 400 K at 1 atm for reactor B. Under these conditions no graphite was generated, and production of methane and water was minimized. The maximum amount of ethanol produced, which occurred at 1200 K, CGR = 1, and P = 1 atm, was 1.115 mole of ethanol per mole of glycerol. Furthermore, the present findings suggest new opportunities for the theoretical and experimental design of ethanol production processes by glycerol dry reforming, advancing the fuel reforming technology. Other desirable products such as H<sub>2</sub> can be used as fuel for electricity generation and for heating, without emitting carbon dioxide. The model proposed in this work suggests that glycerol wasted from biodiesel manufacturing can be used as a raw material for the production of syngas and ethanol.

### Acknowledgements

This study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), EAM-C and NEM-O thank grants 266629 and 266583 (CONACyT), respectively for postgraduate studies.

### 5. References

1. Agostinho F., Siche R., 2014. Hidden costs of a typical embodied energy analysis: Brazilian sugarcane ethanol as a case study. *Biomass and Bioenergy*, 71, 69-83.
2. Andersson, R., Boutonnet, M., Järås, S. 2014. Higher alcohols from syngas using a K/Ni/MoS<sub>2</sub> catalyst: Trace sulfur in the product and effect of H<sub>2</sub>S-containing feed. *Fuel*, 115, 544-550.
3. Authayanun, S., Wiyaratn, W., Assabumrungrat, S., Arpornwichanop, A. 2013. Theoretical analysis of a glycerol reforming and high-temperature PEMFC integrated system: Hydrogen production and system efficiency. *Fuel*, 105, 345-352.
4. Bion, N., Duprez, D., Epron, F. 2012. Design of nanocatalysts for green hydrogen production from bioethanol. *ChemSusChem*, 5, 76 – 84.
5. Chiang, S. W., Chang, C. C., Shie, J. L., Chang, C. Y., Ji, D. R., Tseng, J., Chen, Y. 2012. Synthesis of alcohols and alkanes from CO and H<sub>2</sub> over MoS<sub>2</sub>/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst in a packed bed with continuous flow. *Energies*, 5(10), 4147-4164.
6. Climent, M. J., Corma, A., De Frutos, P., Iborra, S., Noy, M., Velty, A., Concepción P. 2010. Chemicals from biomass: synthesis of glycerol carbonate by transesterification and carbonylation with urea with hydrotalcite catalysts. The role of acid–base pairs. *Journal of Catalysis*, 269(1), 140-149.

7. Fang, K., Li, D., Lin, M., Xiang, M., Wei, W., Sun, Y. 2009. A short review of heterogeneous catalytic process for mixed alcohols synthesis via syngas. *Catalysis Today*, 147(2), 133-138.
8. Fernández, Y., Arenillas, A., Bermúdez, J. M., Menéndez, J. A. 2010. Comparative study of conventional and microwave-assisted pyrolysis, steam and dry reforming of glycerol for syngas production, using a carbonaceous catalyst. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 88(2), 155-159.
9. Gong, J., Yue, H., Zhao, Y., Zhao, S., Zhao, L., Lv, J., Ma, X. 2012. Synthesis of ethanol via syngas on Cu/SiO<sub>2</sub> catalysts with balanced Cu<sup>0</sup>-Cu<sup>+</sup> sites. *Journal of the American Chemical Society*, 134(34), 13922-13925.
10. Gupta, M., Smith, M. L., Spivey, J. J. 2011. Heterogeneous catalytic conversion of dry syngas to ethanol and higher alcohols on Cu-based catalysts. *Acs Catalysis*, 1(6), 641-656.
11. He, J., Zhang, W. 2008. Personal review: Research on ethanol synthesis from syngas. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 9(5), 714-719.
12. IPCC. Summary for Policymakers. In: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation [O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2011.
13. Izumi, Y. 1997. Selective ethanol Synthesis from Carbon Dioxide. *Platinum Metals Review*, 41, 166-169.
14. Jiménez-García, G. de Lasa, H., Quintana-Solórzano, R., Maya-Yescas, R. 2013. Catalyst activity decay due to pore blockage during catalytic cracking of hydrocarbons. *FUEL*, 110, 89-98.
15. Kale, G. R., Kulkarni, B. D. 2010a. Thermodynamic analysis of dry autothermal reforming of glycerol. *Fuel Processing Technology*, 91, 520-530.
16. Kale, G. R., Kulkarni, B. D. 2010 b. Thermoneutral point analysis of ethanol dry autothermal reforming. *Chemical Engineering Journal*, 165, 864-873.
17. Kauffman N., Dumortier J., Hayes D. J., Brown R. C., Laird D. A. 2014. Producing energy while sequestering carbon? The relationship between biochar and agricultural productivity. *Biomass and Bioenergy*, 63, 167-176.
18. Khanna, S., Goyal, A., Moholkar, V. S. 2013. Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. *Fuel*, 112, 557-561.
19. Kirkels, A. F., Verbong, G. P. 2011. Biomass gasification: Still promising? A 30-year global overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 471-481.

20. Mohanty, P., Pant, K. K., Naik, S. N., Parikh, J., Hornung, A., Sahu, J. N. 2014. Synthesis of green fuels from biogenic waste through thermochemical route—The role of heterogeneous catalyst: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 131-153.
21. Nanda, M. R., Yuan, Z., Qin, W., Ghaziaskar, H. S., Poirier, M. A., Xu, C. C. 2014. Thermodynamic and kinetic studies of a catalytic process to convert glycerol into solketal as an oxygenated fuel additive. *Fuel*, 117, 470-477.
22. Perry, R.H., Green, D.W., Maloney, J.O. (eds.) 1992. *Perry's Handbook of Chemical Engineers*, 3<sup>rd</sup> ed. McGraw Hill B.C. México, 1996. Ch. 4.
23. Rostrup-Nielsen, J. R. Fuels and energy for the future: the role of catalysis. *Catalysis reviews* 2004, 46(3-4), 247-270.
24. Sarma, S J, Brar, S. K., Sydney, E. B. 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude. *International Journal of Hydrogen Energy*; 37, 6473-6490.
25. Schefflan, R., 2011. *Teach Yourself the Basic of Aspen Plus*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 123–144.
26. Skidmore B. E., Baker R. A., Banjade D. R., Bray J. M., Tree D. R., Lewis R. S., 2013. Syngas fermentation to biofuels: Effects of hydrogen partial pressure on hydrogenase efficiency, *Biomass and Bioenergy*, Volume 55, August, Pages 156-162.
27. Toscano, G., Riva, G., Pedretti, E., Duca, D., 2011. Determination of the renewable energy content of chemically modified biofuels, *Biomass and Bioenergy*, 35, 3139-3146.
28. Wang, H., Liu, J., Fu, J., Wan, H., Tsai, K. 1992. Study on the mechanism of ethanol synthesis from syngas by in-situ chemical trapping and isotopic exchange reactions. *Catalysis letters*, 2(1-3), 87-96.
29. Wang, X., Li, M., Wang, M., Wang, H. L., Wang, S., Ma, X. 2009. Thermodynamic analysis of glycerol dry reforming for hydrogen and synthesis gas production. *Fuel*, 88(11), 2148-2153.
30. Yue, H., Ma, X., Gong, J. 2014. An Alternative Synthetic Approach for Efficient Catalytic Conversion of Syngas to ethanol. *Accounts of chemical research*, 47 (5), 1483–1492.
31. Zheng, H., Kaliyan N., Morey, R. V., 2013. Aspen Plus simulation of biomass integrated gasification combined cycle systems at corn ethanol plants, *Biomass and Bioenergy*, 56, 197-210.
32. Zhu, L. J., Wang, S. R., Li, X. B., Yin, Q. Q., Luo, Z. Y. 2012. Thermodynamic Analysis of Indirect ethanol Synthesis from Syngas. *Advanced Materials Research*, 433, 457-462.

### 4.3.2 Simulation of Syngas Production from Lignin Using Guaiacol as a Model Compound

Se generó una colaboración académica con la Dra. Nancy Rodríguez-Olalde resultando un artículo publicado en la revista *ENERGIES*, a continuación se muestra la portada.

*Energies* **2015**, *8*, 6705-6714; doi:10.3390/en8076705

OPEN ACCESS

**energies**

ISSN 1996-1073

www.mdpi.com/journal/energies

Article

## Simulation of Syngas Production from Lignin Using Guaiacol as a Model Compound

Nancy Eloísa Rodríguez-Olalde <sup>1</sup>, Erick Alejandro Mendoza-Chávez <sup>1</sup>, Agustín Jaime Castro-Montoya <sup>1,\*</sup>, Jaime Saucedo-Luna <sup>1</sup>, Rafael Maya-Yescas <sup>1</sup>, José Guadalupe Rutiaga-Quiñones <sup>2</sup> and José María Ponce Ortega <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio “V1”, Ciudad Universitaria, 58060, Morelia, Michoacán, Mexico; E-Mails: neloisanancy@gmail.com (N.E.R.-O.); alejandhro@hotmail.com (E.A.M.-C.); saucedol@hotmail.com (J.S.-L.); rmayay@umich.mx (R.M.-Y.); jmponce@umich.mx (J.M.P.O.)

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio “D”, Ciudad Universitaria, 58060, Morelia, Michoacán, Mexico; E-Mail: jrutiaga@yahoo.com.mx

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ajcastro@umich.mx; Tel.: +52-443-327-3584; Fax: +52-443-316-7176.

Academic Editor: Mehrdad Massoudi

Received: 13 May 2015 / Accepted: 17 June 2015 / Published: 30 June 2015

**Abstract:** Lignin is an abundant component in biomass that can be used a feedstock for producing several value-added products, including biofuels. However, lignin is a complex molecule (involving in its structure three types of phenylpropane units: coumaryl, coniferyl and sinapyl), which is difficult to implement in any process simulation task. The lignin from softwood is formed mainly by coniferyl units; therefore, in this work the use of the guaiacol molecule to model softwood lignin in the simulation of the syngas process ( $H_2 + CO$ ) is proposed. A Gibbs reactor in ASPEN PLUS<sup>®</sup> was feed with ratios of water and guaiacol from 0.5 to 20. The pressure was varied from 0.05 to 1.01 MPa and the temperature in the range of 200–3200 °C.  $H_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $O_2$  and C as graphite were considered in the output stream. The pressure, temperature and ratio water/guaiacol conditions for syngas production for different  $H_2/CO$  ratio are discussed. The obtained results allow to determine the operating conditions to improve the syngas production and show that C as graphite and water decomposition can be avoided.

# CAPÍTULO V

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- La variabilidad metabólica y fisiológica de ocho cepas silvestres aisladas de lodos residuales de la planta productora de biodiesel, revela la biodiversidad existente en ecosistemas naturales que pueden ser utilizadas para la obtención de productos con valor agregado a partir de glicerol crudo.
- La cepa identificada como LRB3 presentó distintos grados de resistencia a condiciones de estrés, como pH básico, agente antisépticos y desinfectantes (metanol y jabón).
- Se desarrolló un bioproceso y se encontró que la producción microbiana de 2,3-BDO es posible, con la bacteria aislada del ambiente e identificada como *LRB3*, utilizando glicerol crudo como sustrato.
- La asimilación de glicerol crudo y la producción de 2,3-BDO están en relación directa con la concentración de glicerol crudo en la alimentación, la temperatura y el tiempo de operación de los bioreactores.
- Los resultados de este estudio demuestran que el glicerol crudo subproducto de la producción de biodiesel se puede añadir directamente en fermentaciones sin procesamientos adicionales y costosos.
- La concentración de 2,3-BDO final ( $3.2 \text{ g/l}_{\text{cultivo}}$ ) en medio con glicerol crudo al 7% v/v. Teniendo en cuenta la baja concentración de glicerol (38%) en la mezcla del glicerol crudo subproducto del proceso de biodiesel se obtuvo una productividad baja, lo que es un factor importante a considerar para la bioconversión del subproductos a compuestos con valor agregado.
- El glicerol crudo se puede utilizar como materia prima para la producción de diversos productos con valor agregado como el gas de síntesis y el etanol.

## REFERENCIAS GENERALES

- Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in energy and combustion science*, 33(3), 233-271.
- Almeida, J. R., Fávaro, L. C., & Quirino, B. F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1.
- Authayanun, S., Wiyaratn, W., Assabumrungrat, S., & Arpornwichanop, A. (2013). Theoretical analysis of a glycerol reforming and high-temperature PEMFC integrated system: Hydrogen production and system efficiency. *Fuel*, 105, 345-352.
- Biddy, M. J., Scarlata, C., & Kinchin, C. (2016). *Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential*. NREL (National Renewable Energy Laboratory (NREL). Golden, CO (United States).
- Chiang, S. W., Chang, C. C., Shie, J. L., Chang, C. Y., Ji, D. R., Tseng, J. Y., & Chen, Y. H. (2012). Synthesis of alcohols and alkanes from CO and H<sub>2</sub> over MoS<sub>2</sub>/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst in a packed bed with continuous flow. *Energies*, 5(10), 4147-4164.
- Ciriminna, R., Pina, C. D., Rossi, M., & Pagliaro, M. (2014). Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(10), 1432-1439.
- Creutzig, F., Ravindranath, N. H., Berndes, G., Bolwig, R., Bright, R., Cherubini, F., . . . Masera, O. (2014). Bioenergy and climate change mitigation: an assessment. *GCB Bioenergy*, 7(5), 916-944.

- Da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, 27(1), 30-39. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
- Gong, J., Yue, H., Zhao, S., Zhao, L., Lv, J., & Ma, X. (2012). Synthesis of ethanol via syngas on Cu/SiO<sub>2</sub> catalysts with balanced Cu<sup>0</sup>-Cu<sup>+</sup> sites. *Journal of the American Chemical Society*, 134(34), 13922-13925.
- Gupta, M., & Kumar, N. (2012). Scope and opportunities of using glycerol as an energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(7), 4551-4556. doi:10.1016/j.rser.2012.04.001
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., & Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(23), 5915-5921. doi: 10.1021/jf3008629
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press,.
- Ji, X. J., Nie, Z. K., Huang, H., Ren, L. J., Peng, C., & Ouyang, P. K. (2011). Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production from glucose-xylose mixtures. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 1119-1125. doi: 10.1007/s00253-010-2940-5
- Kale, G. R., & Kulkarni, B. D. (2010). Thermoneutral point analysis of ethanol dry autothermal reforming. *Chemical Engineering Journal*, 165(3), 864-873.
- Kauffman, N., Dumortier, J., Hayes, D. J., Brown, R. C., & Laird, D. A. (2014). Producing energy while sequestering carbon? The relationship between biochar and agricultural productivity. *Biomass and Bioenergy*, 63, 167-176.
- Khanna, S., Goyal, A., & Moholkar, V. S. (2013). Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. *Fuel*, 112, 557-561.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J., Ali, M., Conolly, J., . . . Simpson, S. (2011). 2,3-Butanediol Production by Acetogenic Bacteria, an Alternative Route to Chemical

- Synthesis, Using Industrial Waste Gas. *Applied and Environmental Mic*, 77(15): 5467–5475. doi: 10.1128/AEM.00355-11
- Kreft, S., Hagen, U., Eckstein, D., Junghans, L., & Kerestan, C. (2014). Global climate risk index 2015. Who suffers most from extreme weather events? Weather-related Loss Events in 2013 and 1994 to 2013. *Germanwatch*, 1-31.
- Lee, S., Kim, B., Park, K., Um, Y., & Lee, J. (2012). Synthesis of pure meso-2, 3-butanediol from crude glycerol using an engineered metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(7), 1801-1813.
- Li, L., Li, K., Wang., K., Chen, C., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. *Bioresource Technology*, 170, 256-261. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.101
- Li, Z. J., Jian, J., Wei , X. X., SheN, X. W., & Chen, Q. G. (2010). Microbial production of meso-2, 3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(6), 2001-2009. doi:10.1007/s00253-010-2676-2
- Ljutov, V. (1963). TECHNIQUE OF VOGES-PROSKAUER TEST. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 58: 325–335. doi:doi: 10.1111/j.1699-0463.1963.tb01578.x
- Loutherbourg, P. J. (s.f.). Coalbrookdale at night. *Coalbrookdale at night*. Science Museum, London.
- Mach, K. J., Mastrandrea, M. D., Bilir, T. E., & Field, C. B. (2016). Understanding and responding to danger from climate change: the role of key risks in the IPCC AR5. *Climatic Change*, 1-18. doi:10.1007/s10584-016-1645-x
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H. M., Martínez-Batallar , G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O., . . . Bolivar , F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial cell factories*, 11(1), 1. doi:10.1186/1475-2859-11-46

- Metsoviti, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E., Galiotou-Panayotou, M., Nychas, G. J., Zeng, A. P., & Papanikolaou, S. (2011). Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Engineering in Life Sciences*, 12(1), 57-68. doi:10.1002/elsc.201100058
- Moncada, J., El-Halwagi, M. M., & Cardona, C. A. (2013). Techno-economic analysis for a sugarcane biorefinery: Colombian case. *Bioresource technology*, 135, 533-543.
- Montero, G., Stoytcheva, M., Coronado, M., García, C., Cerezo, J., Toscano, L., & Leon, j. A. (2015). An overview of biodiesel production in Mexico. *Biofuels—Status and Perspective*, 19.
- O'Brien, K. L., & Leichenko, R. M. (2000). Double exposure: assessing the impacts of climate change within the context of economic globalization. *Global Environmental Change*, 221-232.
- Pagliari, M., & Rossi, M. (2010). Chapter 1:Glycerol: Properties and Production. En M. Pagliaro, & M. Rossi, *The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material* (2 ed., págs. 1-104). Royal Society of Chemical. doi:10.1039/9781849731089-00001
- Pandey, A., Bhaskar, T., Stöcker, M., & Sukumaran, R. (2015). *Recent advances in thermochemical conversion of biomass*. Waltham, Ma, USA: Elsevier.
- Petrov, K., & Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(4), 659-665. doi:10.1007/s00253-009-2004-x
- Petrov, K., & Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2, 3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 943-949. doi:10.1007/s00253-010-2545-z
- Posada, J. A., Ricón, L. E., & Cardona, C. A. (2012). Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: addressing the glycerol problem. *Bioresource technology*, 111, 282-293.

- Pott, R. W., Howe, C. J., & Dennis, J. S. (2013). Photofermentation of crude glycerol from biodiesel using *Rhodopseudomonas palustris*: comparison with organic acids and the identification of inhibitory compounds. *Bioresource technology*, 130, 725-730.
- Raheem, A., Hassan, M. Y., & Shakoor, R. (2016). Bioenergy from anaerobic digestion in Pakistan: Potential, development and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 59, 264-275.
- Sattayasamitsathit, S., Prasertsan, P., & Methacan, P. (2011). Statistical optimization for simultaneous production of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. *Process Biochemistry*, 46(2), 608-614. doi:10.1016/j.procbio.2010.10.009
- Skidmore, B. E., Baker, R. A., Banjade, D. R., Bray, J. M., Tree, D. R., & Lewis, R. S. (2013). Syngas fermentation to biofuels: Effects of hydrogen partial pressure on hydrogenase efficiency, . *Biomass and Bioenergy*, 55, 156-162.
- Tan, H. W., Aziz, A. A., & Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 118-127.
- Taylor, M. B., & Juni, E. (1960). Stereoisomeric specificities of 2,3-butanediol dehydrogenases. *BBA - Biochimica Et Biophysica Acta*, 39(3), 448-457. doi:doi:10.1016/0006-3002(60)90197-9
- Thompson, J. C., & He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(2), 261-265. doi:10.13031/2013.20272
- UNFCCC. (12 December 2015). *Conference of the Parties. Twenty-first session*. Paris. Recuperado el 18 de December de 2015, de <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/109r01.pdf>
- UNFCCC. (18 de December de 2015). *COP21*. Obtenido de Conferences of the Parties: <http://www.cop21.gouv.fr/en/>

- Yan, Y., Lee, C. C., & Liao, J. C. (2009). Enantioselective synthesis of pure (R, R)-2, 3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(19), 3914-3917. doi:10.1039/B913501D
- Yang, T. W., Rao, Z. M., Zhang, X., Xu, M. J., Xu, Z. H., & Yang, S. T. (2013). Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2, 3-butanediol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(17), 7651-7658.
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., & Yang, S. T. (2015). Enhanced 2, 3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial cell factories*, 14(1), 1. doi:DOI: 10.1186/s12934-015-0317-2
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Lin, Q., Xia, H., Xu, Z., & Yang, S. (2011). Production of 2, 3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of basic microbiology*, 51(6), 650-658. doi:10.1002/jobm.201100033
- Yue, H., Ma, X., & Gong, J. (2014). An Alternative Synthetic Approach for Efficient Catalytic Conversion of Syngas to Ethanol. *Accounts of chemical research*, 47(5), 1483-1492.
- Zhu, Y., Eiteman, M. A., Lee, S. A., & Altman, E. (2010). Conversion of glycerol to pyruvate by *Escherichia coli* using acetate-and acetate/glucose-limited fed-batch processes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(3), 307-312. doi:10.1007/s10295-009-0675-z