

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química



**Evaluación de la producción de ácido cítrico a partir de
glicerol crudo del proceso de producción de biodiésel**

Trabajo de graduación presentado por
Adriana Argeñal Aquino
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

Guatemala,

2022

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química



**Evaluación de la producción de ácido cítrico a partir de
glicerol crudo del proceso de producción de biodiésel**

Trabajo de graduación presentado por
Adriana Argeñal Aquino
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

Guatemala,

2022

Vo. Bo.:

(f) Carlo Martínez
Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin

Tribunal Examinador:

(f) MSc., Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f) Carlo Martínez
Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin

(f) MSc., Ing. Luis Ernesto Núñez González

Fecha de aprobación de examen de graduación:

Guatemala, 28 de octubre de 2022.

PREFACIO

Agradezco primeramente a Dios y a mis padres, Javier y Nora por darme la oportunidad de estudiar y aprender a lo largo de todos mis años de estudio. Agradezco a mis padres y a mi hermana por siempre apoyarme y aconsejarme en los buenos y malos momentos durante mi carrera y en mi vida. Agradezco a todos los catedráticos de los que tuve la oportunidad de aprender durante estos años en la Universidad, gracias por aportar su conocimiento, apoyo, orientación y por enseñarme todo lo necesario para lograr el desarrollo de este trabajo. Agradezco a mi director de carrera, el Ingeniero Gamaliel Zambrano y a mi asesor, el Licenciado Carlo Martínez, por sus enseñanzas y consejos. Agradezco a mis compañeros de carrera, sin los cuales no hubiera logrado muchas cosas en estos 5 años de estudio. Especialmente quiero agradecer a mis amigos, Ka-jon Leong, Samuel Cogoux y Laura Leiva por toda la paciencia, el apoyo, ánimos y consejos que siempre me dieron. Finalmente quiero agradecer al Licenciado Luis Emilio López, un gran amigo, quien siempre me enseñó a ser perseverante y luchar por mis metas; agradezco sus sabias palabras y consejos cuando más las necesité durante todos estos años.

ÍNDICE

Lista de cuadros	IX
Lista de figuras.....	XVI
Lista de ecuaciones	XXII
Resumen.....	XXIV
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	3
III. Justificación	6
IV. Objetivos.....	8
A. General	8
B. Específicos	8
V. Marco teórico	9
A. Producción de glicerol	9
B. Glicerol	11
C. Levaduras.....	14
D. <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
E. Metabolismo	15
F. Ácido cítrico.....	18
VI. Metodología.....	23
A. Purificación de glicerol	23

B. Caracterización del glicerol	25
C. Propagación de la levadura en caja Petri	27
D. Adaptación a medio de cultivo.....	29
E. Preparación de inóculo.....	32
F. Preparación de medios de cultivo	34
G. Fermentación para producción de ácido cítrico y toma de muestras	36
H. Conteo celular.....	37
I. Análisis de muestras por cromatografía líquida.....	38
J. Purificación de ácido cítrico	39
VII. Resultados	41
VIII. Análisis de resultados.....	52
IX. Conclusiones.....	68
X. Recomendaciones.....	69
XI. Bibliografía.....	71
XII. Anexos.....	74
A. Datos originales	74
B. Muestra de cálculos	93
C. Análisis de error	101
D. Datos calculados.....	103
E. Balances de masa.....	107
F. Gráficos adicionales para identificación de fases en curva de crecimiento	109
G. Datos de equipo	114
H. Curvas de calibración HPLC.....	118

I. Muestra de cromatogramas obtenidos por análisis HPLC.....	118
J. Espectros IR de las muestras analizadas.....	119
K. Ilustraciones.....	122

Lista de cuadros

Cuadro 1. Aplicaciones en diferentes industrias del ácido cítrico y sus funciones.	20
Cuadro 2. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para la adaptación de <i>Yarrowia lipolytica</i> al glicerol.	31
Cuadro 3. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para el inóculo de <i>Yarrowia lipolytica</i>	33
Cuadro 4. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para el crecimiento y producción de ácido cítrico empleando <i>Yarrowia lipolytica</i>	35
Cuadro 5. Comparación de propiedades de glicerina grado reactivo, glicerol crudo y glicerol purificado.....	42
Cuadro 6. Producción de biomasa, ácido cítrico y consumo de glicerol por <i>Y. lipolytica</i> en las fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.	47
Cuadro 7. Parámetros de crecimiento y rendimientos de conversión para las fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.	48
Cuadro 8. Rendimientos de las fermentaciones para la producción de ácido cítrico en diferentes etapas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.	50

Cuadro 9. Comparación de absorbancias de espectros IR para las muestras de ácido cítrico cristalizadas de las fermentaciones realizadas.	51
Cuadro 10. Peso de Beaker para la recolección y acidificación de glicerol crudo.	74
Cuadro 11. Acidificación del glicerol crudo con ácido sulfúrico 2M.	74
Cuadro 12. Pesos de material utilizado para la separación de sales de la purificación de glicerol.	75
Cuadro 13. Neutralización del glicerol con hidróxido de sodio 1M.	75
Cuadro 14. Pesos de material utilizado para la determinación de cantidad de agua y metanol separados por destilación simple en el proceso de purificación de glicerol.	75
Cuadro 15 Pesos de material utilizado para la decantación de la purificación de glicerol.	76
Cuadro 16. Datos para determinación de densidad de las muestras de glicerina utilizando un picnómetro.	76
Cuadro 17. Datos para determinación de viscosidad de las muestras de glicerina utilizando el viscosímetro.	77
Cuadro 18. Conteo de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol.	77
Cuadro 19. Conteo de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 70 g/L de glicerol.	78

Cuadro 20. Conteo de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 110 g/L de glicerol.	78
Cuadro 21. Conteo de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno.....	79
Cuadro 22. Conteo de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.	79
Cuadro 23. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	80
Cuadro 24. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	80
Cuadro 25. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	81
Cuadro 26. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.....	82
Cuadro 27. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.....	82

Cuadro 28. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.83

Cuadro 29. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.83

Cuadro 30. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L.85

Cuadro 31. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L.85

Cuadro 32. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L.87

Cuadro 33. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L.87

Cuadro 34. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.89

Cuadro 35. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.89

Cuadro 36. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.....	91
Cuadro 37. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.....	91
Cuadro 38. Datos calculados para el balance de masa del proceso de purificación de glicerol con su respectiva incertidumbre.	103
Cuadro 39. Triplicado de densidades de las muestras de glicerina con promedio y desviación estándar.	103
Cuadro 40. Triplicado de viscosidades de las muestras de glicerina con promedio y desviación estándar.	104
Cuadro 41. Triplicado de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.	104
Cuadro 42. Triplicado de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 70 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.	105
Cuadro 43. Triplicado de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 110 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.....	105

Cuadro 44. Triplicado de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.....	106
Cuadro 45. Triplicado de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.	106
Cuadro 46. Información de balanza analítica para pesaje de reactivos.....	114
Cuadro 47. Información de balanza para pesaje de materiales.....	114
Cuadro 48. Información de balanza móvil para pesaje de materiales.	115
Cuadro 49. Información de potenciómetro para determinación de pH.....	115
Cuadro 50. Información de baño térmico para determinación de viscosidad	115
Cuadro 51. Información de centrífuga para tubos Falcon de 50 mL para purificación de ácido cítrico.	115
Cuadro 52. Información de horno de convección para secado de materiales.	116
Cuadro 53. Información de incubadora con agitación para las fermentaciones.....	116
Cuadro 54. Información de incubadora para cultivo en cajas Petri de <i>Yarrowia lipolytica</i>	116
Cuadro 55. Información de estufa para preparación de medios.....	116
Cuadro 56. Información de microscopio para conteos celulares.	116

Cuadro 57. Información de viscosímetro Cannon-Fenske.....	117
Cuadro 58. Información de viscosímetro de Ubbelohde.....	117
Cuadro 59. Información de bomba de vacío para filtración de ácido cítrico.	117
Cuadro 60. Información de autoclave para esterilización de medios y materiales....	117

Lista de figuras

Figura 1. Reacción de transesterificación para la producción de biodiésel utilizando metanol.	10
Figura 2. Aplicaciones alternativas del glicerol crudo derivado de biodiésel.....	13
Figura 3. Representación gráfica del ciclo de Krebs.....	16
Figura 4. Ruta metabólica propuesta para la biosíntesis de ácido cítrico a partir de glicerol en <i>Y. lipolytica</i>	18
Figura 5. Estructura química del ácido cítrico.	19
Figura 6. Esquema del proceso de purificación de glicerol realizado en las pruebas de laboratorio.....	41
Figura 7. Comparación del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> en los medios de cultivo con concentraciones iniciales de glicerol de 35g/L, 70 g/L y 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	43
Figura 8. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.	43
Figura 9. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 70g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.	44

Figura 10. Consumo de glicerol y producción de ácido cítrico en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 110 g/L, 0.5 g/L de nitrógeno.	44
Figura 11. Comparación de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentraciones de nitrógeno de 0.2 g/L, 0.5 g/L y 1 g/L.	45
Figura 12. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 1 g/L de nitrógeno....	45
Figura 13. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.2 g/L de nitrógeno.	46
Figura 14. Esquema del proceso de purificación de ácido cítrico realizado en las pruebas de laboratorio.	49
Figura 15. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i>	107
Figura 16. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i>	107
Figura 17. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i>	108
Figura 18. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i>	108

Figura 19. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i> .	109
Figura 20. Logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.	109
Figura 21. Logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 70g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.	110
Figura 22. Logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 110g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.	110
Figura 23. Logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 1.0g/L.	111
Figura 24. Logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.2g/L.	111
Figura 25. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.	112
Figura 26. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 70g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.	112

Figura 27. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 110g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.....	113
Figura 28. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 1.0g/L.....	113
Figura 29. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.2g/L.....	114
Figura 30. Curva de calibración para la determinación de glicerol de HPLC.	118
Figura 31. Curva de calibración para la determinación de ácido cítrico de HPLC. ...	118
Figura 32. Ejemplo de cromatograma de la muestra a las 48 horas de fermentación con 35g/L de glicerol y 0.2 g/L de nitrógeno empleando <i>Y. lipolytica</i>	118
Figura 33. Ejemplo de cromatograma de la muestra a las 96 horas de fermentación con 35g/L de glicerol y 0.2 g/L de nitrógeno empleando <i>Y. lipolytica</i>	119
Figura 34. Espectro IR de ácido cítrico grado reactivo	119
Figura 35. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	120
Figura 36. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 70 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.....	120

Figura 37. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 110 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.	121
Figura 38. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno.	121
Figura 39. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.....	122
Figura 40. Glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel en el Laboratorio de Operaciones Unitarias.	122
Figura 41. Separación de sales del glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel.....	123
Figura 42. Sistema de destilación simple armado en el laboratorio para evaporación de metanol y agua.....	123
Figura 43. Separación de la fase de ácidos grasos y la fase acuosa con glicerina empleando una ampolla de decantación.....	123
Figura 44. Producto final obtenido del proceso de purificación de glicerol mostrado en la figura 5 en resultados.	124
Figura 45. Representación de la cuadrícula de la cámara de Neubauer empleada para los conteos celulares.	124
Figura 46. Muestras de conteo celular utilizando la cámara de Neubauer.....	124
Figura 47. Sistema armado en el laboratorio para filtraciones al vacío.....	125

Figura 48. Cristales recuperados del proceso de extracción y purificación de ácido cítrico a partir del medio post fermentativo.....125

Figura 49. Cristales recuperados de la filtración al vacío posterior al proceso de extracción y purificación.....125

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Reacción balanceada de precipitación de ácido cítrico en citrato de calcio empleando hidróxido de calcio.....	93
Ecuación 2. Reacción balanceada de precipitación de sulfato de calcio empleando ácido sulfúrico.	93
Ecuación 3. Determinación de densidad utilizando un picnómetro	94
Ecuación 4. Determinación de viscosidad cinemática utilizando un viscosímetro..	95
Ecuación 5. Determinación de la viscosidad dinámica.	96
Ecuación 6. Determinación del factor de dilución utilizado para el conteo celular..	97
Ecuación 7. Determinación de concentración celular a partir del conteo de células utilizando la cámara de Neubauer.	98
Ecuación 8. Rendimiento global de generación de biomasa en función del consumo de sustrato.....	99
Ecuación 9. Rendimiento global de generación de producto en función del consumo de sustrato.....	100
Ecuación 10. Media o promedio para una serie de datos.	101
Ecuación 11. Desviación estándar para una serie de valores.	101

Ecuación 12. Propagación de error de sumas y restas. 102

Ecuación 13. Propagación de error de multiplicaciones y divisiones 102

Resumen

El presente trabajo presenta como objetivo evaluar la producción de ácido cítrico utilizando glicerol purificado derivado de la producción de biodiésel como fuente de carbono empleando la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075. Para esto, se realizó un proceso de purificación del glicerol crudo para la eliminación de jabones, restos de catalizador y otros contaminantes para poder utilizarlo en las fermentaciones realizadas en matraces Erlenmeyer de 250mL con 150mL de medio de cultivo. Se evaluaron 3 diferentes concentraciones iniciales del glicerol en el medio de cultivo formulando cuantificando microorganismos por conteo celular, concentración de glicerol y ácido cítrico durante diferentes tiempos de fermentación por análisis HPLC. Luego se varió la concentración inicial de fuente de nitrógeno con la mejor concentración de glicerol determinada para evaluar su influencia en la producción de ácido cítrico. Adicional a esto, se evaluaron los rendimientos de extracción y purificación del ácido cítrico al aplicar el método de extracción cal – ácido sulfúrico.

Con el proceso de purificación realizado se obtuvo un glicerol final con una pureza de 84.19%, miscible en agua, con densidad de 1.1768 ± 0.0009 g/mL similar a la densidad de la glicerina grado reactivo de 1.2387 ± 0.0010 g/mL. Se determinó que la formulación de medio de cultivo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno presentó los mejores rendimientos de producción, al realizar la fermentación por una semana, al obtener 2.06 gramos de ácido cítrico en un volumen de 150 mL. En esta fermentación se obtuvieron rendimientos de biomasa con respecto al consumo de sustrato (Y_x/s) de 0.211 (m/m) y de concentración de producto con respecto al consumo de sustrato de (Y_p/s) de 0.415 (m/m). Finalmente, se determinó que empleando el método de extracción de ácido cítrico se recuperó un 68% del producto de la fermentación mencionada anteriormente, obteniendo un compuesto con bandas características de una molécula de ácido cítrico al analizar los espectros obtenidos por análisis FTIR.

I. Introducción

La glicerina, es un compuesto orgánico cuyas propiedades le permite ser ampliamente utilizado en industrias de alimentos, químicos o cosméticos. Este es generado principalmente del proceso de saponificación para producción de jabones y de la producción de biodiésel, donde recibe el nombre de glicerol. En el proceso de producción de 1 tonelada de biodiésel, aproximadamente se generan 100 kg de glicerol. Dado que la generación de glicerina continua en aumento, su valor en el mercado ha disminuido, por lo que es necesario buscar aplicaciones alternativas, como su conversión en productos de mayor valor e importancia. Sin embargo, el glicerol crudo generado de la producción de biodiésel presenta una concentración máxima del 60% y una alta cantidad de jabones, catalizador y metanol, entre otros contaminantes. Por esto, para su posible aprovechamiento debe ser purificada hasta alcanzar aproximadamente una concentración de hasta 85%. (Mora, 2015)

El glicerol presenta algunas aplicaciones en diversos procesos biotecnológicos, como impulsor de actividades microbianas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, en reformado con vapor para la producción de hidrógeno, entre otros (Abbaszaadeh, *et al.*, 2012). También se ha logrado utilizar como sustrato para fermentaciones con distintos microorganismos para obtener productos de mayor valor para diversas industrias. Entre algunos de estos productos se encuentran la producción de butanol, etanol, polihidroxicanoatos, polioles y ácidos orgánicos como ácido succínico, ácido cítrico y ácido oxálico. Entre estos productos, la demanda del ácido cítrico a nivel mundial ha incrementado dadas sus aplicaciones como acidulante, antioxidante y regulador de pH, en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética. Por lo que en este trabajo se propuso utilizar el subproducto glicerol para la producción de este compuesto.

El ácido cítrico se encuentra de manera natural en frutas con características ácidas. A nivel industrial se produce por técnicas biotecnológicas mayoritariamente por fermentación de azúcares con el hongo *Aspergillus niger*. Sin embargo, se ha comenzado el estudio de levaduras capaces de asimilar fuentes de carbono menos purificadas para la producción de este compuesto. Una de ellas es la levadura *Yarrowia lipolytica* capaz de utilizar glicerol crudo proveniente de la producción de biodiésel como única fuente de carbono y de producir ácido cítrico bajo determinadas condiciones. Esto presenta una gran ventaja, dado que el ácido cítrico puede ser recuperado del medio fermentativo por un proceso de precipitación utilizando cal y ácido sulfúrico para su posterior cristalización.

II. Antecedentes

Desde los inicios de operación de la planta piloto para la producción de biodiésel a base de aceite usado de cocina en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala, ha existido el interés de implementar el modelo de producción de economía circular, el cual busca maximizar el uso de todos los recursos y minimizar los desechos. Considerando que el mayor subproducto generado en la producción de biodiésel es el glicerol, siempre ha surgido el interés de aprovechar este residuo para generar nuevos productos.

Con el objetivo de utilizar el glicerol generado sin llevar a cabo un proceso de purificación costoso, en 2013 se llevó a cabo el proyecto FODECYT 053-2009 a cargo del investigador Ing. Oscar Maldonado con el apoyo del CONCYT, SENACYT, FONACYT y La Universidad del Valle de Guatemala, donde se optó por estudiar la producción microbiana de aceites por medio de fermentaciones para proporcionar una alternativa de la disposición final del glicerol. Los microorganismos utilizados para las fermentaciones donde el glicerol se empleó como principal fuente de carbono fueron *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis*; sin embargo, ninguna de las levaduras logró un adecuado crecimiento al utilizar el glicerol crudo debido al contenido de metanol y restos de hidróxido de sodio que esta contenía. El tratamiento sugerido para el glicerol crudo en este estudio fue la adición de ácido sulfúrico, esterilización, decantación y centrifugación donde se obtuvo un glicerol con una pureza de 50-65%.

Para obtener un glicerol derivado de biodiésel con una alta pureza se busca la aplicación de un proceso de purificación efectivo, pero menos costoso que el proceso de purificación para producir glicerina grado reactivo. En un estudio realizado en el año 2010 por Ferrero y colaboradores en el *Centro de Investigación en Tecnología Lactocárnica* de Argentina,

se reportó una pureza de glicerol final de 81.75% después de realizar un tratamiento de seis pasos. La purificación consistió en una acidificación con ácido para la eliminación de ácidos grasos por decantación. Seguidamente se realizó una filtración para la eliminación de impurezas (sales) y la neutralización con una base fuerte. Luego se llevó a cabo un calentamiento para alcanzar una mayor concentración de glicerina y una última filtración para eliminar las sales residuales. El producto obtenido después del tratamiento fue una glicerina con pureza de 81.75% con bajo contenido de sales, metanol, cenizas y agua demostrando que el tratamiento descrito fue eficiente para generar un glicerol de alta pureza aplicable a otros procesos.

Papanikolaou, *et al.*, 2020 aislaron una nueva cepa silvestre de *Yarrowia lipolytica*, codificada LMBF Y-46 capaz de producir polioles utilizando glicerol derivado de biodiésel. Evaluaron la producción de los polioles manitol, arabitol y eritritol con fermentaciones en matraces cuantificando adicionalmente la producción de ácido cítrico por análisis HPLC variando la concentración inicial de glicerol en el medio con 100 g/L, 120 g/L y 150 g/L. Con el estudio realizado en fermentaciones en un medio de cultivo con nitrógeno como reactivo limitante determinaron una producción significativa de polioles y una baja producción de ácido cítrico en las fermentaciones realizadas en matraces. En cambio, cuando realizaron la fermentación en un reactor fed-batch se obtuvo una producción significativa de ácido cítrico y una baja producción de polioles. En los experimentos que realizaron en un reactor fed-batch lograron cuantificar aproximadamente 102 g/L de ácido cítrico producido, una de las mayores producciones por una cepa silvestre al utilizar glicerol derivado de biodiésel (con una pureza de 81% p/p) a una concentración inicial de 150 g/L en el medio de cultivo.

En otro estudio realizado por Giacomobono *et al.* en 2022 se determinó la producción de ácido cítrico a partir de glicerol crudo utilizando la cepa silvestre *Yarrowia lipolytica* DMS8218 a partir de glicerol crudo de biodiésel. Esto con el objetivo de ensayar la producción de ácido cítrico utilizando esta cepa específica, así como estudiar su capacidad de crecimiento en glicerol crudo. Evaluaron la concentración de glicerol con una pureza de 90.5% en las fermentaciones y la razón de C/N, empleando dos diferentes fuentes de carbono (sulfato de amonio y extracto de levadura). Determinaron que la levadura creció

más rápido al utilizar glicerol crudo con una concentración de 33 g/L y una relación C/N de 141, que al utilizar glicerina pura. Adicionalmente, en las fermentaciones con estas condiciones observaron la producción de manitol, pero se sugieren más estudios para evaluar si su producción es competitiva en comparación con el ácido cítrico. En los experimentos realizados en un reactor de 2L, evaluaron el efecto de la aeración y agitación en la producción de metabolitos e identificaron que una agitación de 800 rpm y aeración controlada si favorece la acumulación de ácido cítrico.

III. Justificación

En los años 1850 surge la primera fuente de obtención de glicerol como subproducto con la producción industrial de jabón. Seguidamente en los años 1980 surge la principal fuente de obtención de glicerol como subproducto, la producción de biodiésel, producto que cobró interés por presentarse como una alternativa para el uso de los combustibles de origen fósil. Desde el año 2004, se ha observado un incremento en la producción mundial de glicerol, dado que la producción de biodiésel se ha convertido en la mayor fuente de obtención de este compuesto debido a que el consumo de estos combustibles se ha extendido a nivel mundial por el interés de muchos países en impulsar el desarrollo de fuentes de energía renovables. Para el año 2015, la producción global de glicerina fue de 4.3 megatoneladas, mientras que la demanda para ese mismo año presentó un valor de 2.0 megatoneladas (Usme, 2020). Además, con la amplia expansión de la industria del biodiésel, se predice que el glicerol crudo alcance una producción global de hasta 6 millones para el año 2025. Esto lo puede llegar a catalogar como un producto excesivo de poco valor por lo que su precio puede llegar a caer drásticamente mientras la producción de biodiésel aumente (Zakaria, *et al.*, 2021). La disminución del precio del glicerol se ve afectada por la falta de aplicaciones novedosas que puedan agregarle valor dado que actualmente menos de la mitad de la producción mundial es aprovechada. (Usme, 2020)

Desafortunadamente, el glicerol crudo obtenido requiere de un proceso de purificación riguroso para lograr obtener una glicerina de alta pureza que pueda ser utilizada en las industrias química, alimenticia o cosmética. Por ello, surge el interés de encontrar nuevas aplicaciones de este producto que requieran un glicerol de baja pureza con un proceso de purificación menos costoso. En estas aplicaciones se busca transformar el glicerol en productos de mayor valor para diferentes industrias. Una de las soluciones más estudiadas después de la producción de jabón de glicerol, es utilizando técnicas

biotecnológicas para producir compuestos como aceites, polihidroxicanoatos, polioles o ácidos orgánicos como el ácido succínico o el ácido cítrico.

El mercado global del ácido cítrico reportado en el año 2020 fue de aproximadamente 2.39 millones de toneladas y se espera que incremente hasta 2.91 millones de toneladas para el año 2026. Este mercado se encuentra en aumento por las diversas aplicaciones de este ácido orgánico en diferentes industrias donde se utiliza como controlador de crecimiento de microorganismos, ajustador de pH y potenciador de sabor (EMR, 2021). De la producción total aproximadamente el 70% se destina a la industria de alimentos, el 12% para la industria farmacéutica y el 18% para la industria química como la fabricación de detergentes y tratamiento de textiles (Alcoser, *et. al.*, 2021; Reyes, *et. al.*, 2013). Actualmente la producción industrial de ácido cítrico se encuentra gobernada por la fermentación de glucosa o sacarosa de melaza con el hongo *Aspergillus niger*. Pero la creciente demanda de este compuesto presenta la oportunidad de implementar nuevas alternativas de fermentación para su producción, como el uso de levaduras que presentan las ventajas de poder utilizar diversas fuentes de carbono de sustratos menos purificados, una mayor tolerancia a diferentes medios y condiciones y su versatilidad metabólica. (Börekcü, Kaban & Kaya, 2021)

En Guatemala, la producción de biodiésel no ha alcanzado niveles industriales, pero para los pequeños productores la cantidad de glicerol crudo generado sobrepasa la demanda. Para diversificar las aplicaciones de este glicerol crudo en otras industrias, se propone la producción de otros compuestos por técnicas biotecnológicas. La alternativa planteada en este trabajo de graduación es la producción de ácido cítrico por fermentaciones en un medio de cultivo utilizando glicerol parcialmente purificado como única fuente de carbono para la levadura *Yarrowia lipolytica*. Este estudio es necesario para lograr analizar a pequeña escala los factores que más influyen en el proceso, principalmente la evaluación de diferentes formulaciones del medio de cultivo, en base a los rendimientos de producción. Esta es una alternativa cuyo principal objetivo es aprovechar el mayor subproducto generado en la producción de biodiésel y evaluar una nueva ruta de producción de ácido cítrico aplicable a nivel industrial.

IV. Objetivos

A. General

Producción a nivel laboratorio de ácido cítrico a partir de una fermentación con *Yarrowia lipolytica* empleando el glicerol obtenido de la producción de biodiésel como fuente de carbono.

B. Específicos

1. Realizar una purificación parcial del glicerol crudo a escala laboratorio para evaluar su uso como sustrato en una fermentación con *Yarrowia lipolytica*.
2. Evaluar diferentes concentraciones de glicerol como fuente de carbono para la producción de ácido cítrico a nivel laboratorio con base en rendimientos.
3. Purificar y cuantificar el ácido cítrico obtenido de la fermentación con *Yarrowia lipolytica* para determinar el rendimiento global del proceso de producción de este compuesto.

V. Marco teórico

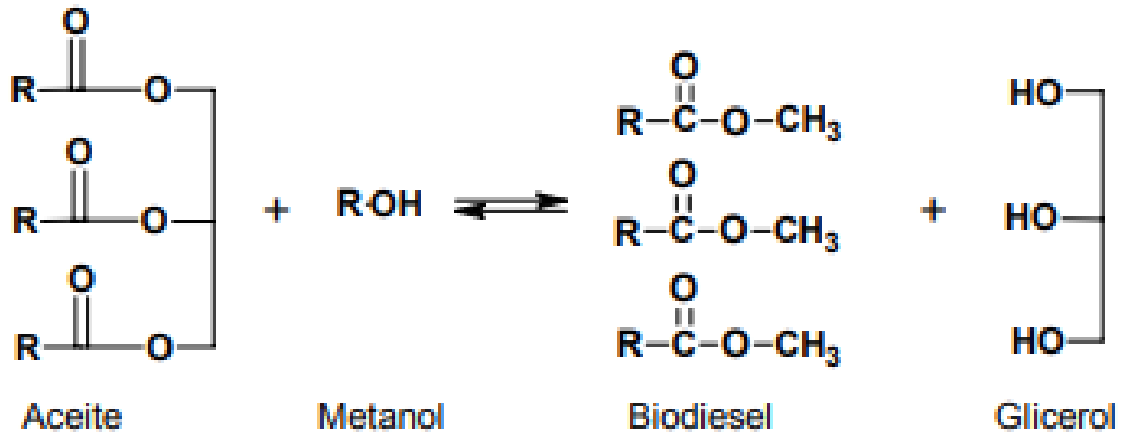
A. Producción de glicerol

El biodiésel es un combustible producido a partir de aceites vegetales usados, grasas animales y aceite de microalgas con la capacidad de presentar una alternativa al uso de combustibles fósiles, los cuales presentan un gran impacto ambiental por las misiones de gases contaminantes como CO, CO₂, SO_x y NO_x. Entre las principales ventajas que presenta el biodiésel se encuentra que es biodegradable, no tóxico, no contribuye al aumento de los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera y en su producción se utilizan recursos renovables. Sin embargo, el principal inconveniente es que presenta un mayor costo de producción que el diésel a base de petróleo (Abbaszaadeh, *et al.*, 2012; Cardeño, Gallego & Rios, 2011). Las características básicas del biodiésel son muy similares al diésel a base de petróleo, por lo que se pueden generar mezclas de ambos con distintas proporciones. Estas mezclas permiten una reducción en el precio del combustible y en los gases de escape de los motores. (Abbaszaadeh, *et al.*, 2012)

El proceso más común para la producción de biodiésel es la transesterificación, la cual consiste en reaccionar un triglicérido de un aceite vegetal o animal con un alcohol, como metanol, etanol o butanol, en una proporción 1:3 para formar alquil ésteres y glicerol en presencia de un catalizador, como se muestra en la Figura 1. Esta reacción se presenta como una simplificación de tres reacciones reversibles y consecutivas donde se forman monoglicéridos y diglicéridos como productos intermedios (Cardeño, Gallego & Rios, 2011). El alcohol utilizado con mayor frecuencia es el metanol, dado su menor costo, su polaridad, porque es un alcohol de cadena más corta y reacciona más rápidamente con los triglicéridos. En este proceso es común el uso de un catalizador que permita mejorar la superficie de contacto, la velocidad de reacción y el rendimiento, dado que sin el uso de un

catalizador la reacción es lenta y los rendimientos obtenidos son bajos. Los catalizadores más utilizados son los sólidos básicos como el hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. (Abbaszaadeh, *et al.*, 2012)

Figura 1. Reacción de transesterificación para la producción de biodiésel utilizando metanol.



Fuente: Cardeño, Gallego & Rios, 2011.

En la producción de biodiésel generalmente se obtienen subproductos no deseados en pequeñas cantidades como jabones, debido a la reacción de saponificación que puede llegar a ocurrir. Además de este se obtiene como principal subproducto el glicerol, donde de la producción de 1 kilogramo de biodiésel se obtienen aproximadamente 0.1 kg de glicerol (Mora, *et al.*, 2015; Cardeño, Gallego & Rios, 2011). Con la amplia expansión de la industria del biodiésel, se predice que glicerol crudo alcance una producción global de hasta 6 millones para el año 2025. Esto lo puede llegar a catalogar como un producto excesivo de poco valor por lo que su precio puede llegar a caer drásticamente mientras la producción de biodiésel aumente (Zakaria, *et al.*, 2021). Debido a esto, el estudio de diferentes aprovechamientos de la glicerina es de gran importancia porque permitirá mejorar la economía global del proceso de producción de biodiésel. (Cardeño, Gallego & Rios, 2011)

B. Glicerol

El glicerol, también conocido como glicerina presenta la fórmula molecular $C_3H_8O_3$ y tiene una masa molecular de 92.09g/mol. En su estado purificado presenta las siguientes características: es un líquido incoloro, viscoso e higroscópico, soluble mayormente en agua. Presenta una densidad de 1.26 g/mL y un punto de fusión de 18-20°C, mientras que su punto de ebullición y descomposición es de 290°C. Su descomposición se da cuando entra en contacto con superficies calientes u oxidantes fuertes generando el compuesto acroleína. (Ferrero, Rosa & Veneciano, 2010)

El glicerol es un alcohol y químico oxigenado que puede obtenerse de la producción de biodiésel llegando a presentar una concentración máxima de 60%, dado que contiene una alta cantidad de otros compuestos generados durante el proceso, como jabones y trazas de los compuestos iniciales como el catalizador o metanol, por lo que se le denomina glicerol crudo. Por ello, para poder utilizar este glicerol en diferentes procesos es necesario purificarlo hasta una concentración mínima de 85% p/p. El glicerol obtenido con esta pureza puede ser utilizado para múltiples procesos industriales entre los cuales destacan: combustión directa, pirólisis, producción de bioetanol, biogás e hidrógeno, producción de explosivos, cosméticos, medicamentos y tintas, aditivo de combustibles o como insumo para la industria química y de fertilizantes. Debido a que presenta propiedades edulcorantes y no es tóxica puede aplicarse como suplemento alimenticio en comidas y bebidas, como humectante, suavizante, solvente, edulcorante y conservante en caramelos, productos cárnicos y lácteos (Mora, *et al.*, 2015; Ferrero, Rosa & Veneciano, 2010). También puede ser utilizado en una variedad de aplicaciones industriales y su forma de monómero es encontrada en la mayoría de polioles naturales (Zakaria, *et al.*, 2021). También ha sido utilizado para la síntesis de monoglicéridos y diglicéridos, así como aditivo para combustibles, y su transformación a otros compuestos de mayor valor como propanodiol y acroleína, así como su uso como reactivo para gasificación y producción de gas de síntesis. (Cardeño, Gallego & Rios, 2011)

Sin embargo, la creciente producción de glicerol ha ocasionado una disminución considerable en su precio de venta, debido a que es el subproducto de mayor importancia en este proceso. Sin embargo, el glicerol crudo se encuentra compuesto por agua, metanol, restos de catalizador, sales inorgánicas, otros materiales orgánicos, jabones, ácidos grasos libres, residuos de materias primas y metilésteres (Ferrero, Rosa & Veneciano, 2010). Por esto, el principal desafío se encuentra en lograr una adecuada purificación y adecuación de la glicerina para otras aplicaciones mediante un proceso que resulte económico, técnico y ambientalmente viable. El proceso de purificación más común es con una destilación de alto vacío donde se obtiene una glicerina de alta pureza (USP) pero con la desventaja que presenta una alta demanda energética y para algunas aplicaciones industriales no es necesaria una alta pureza. (Cardeño, Gallego & Rios, 2011)

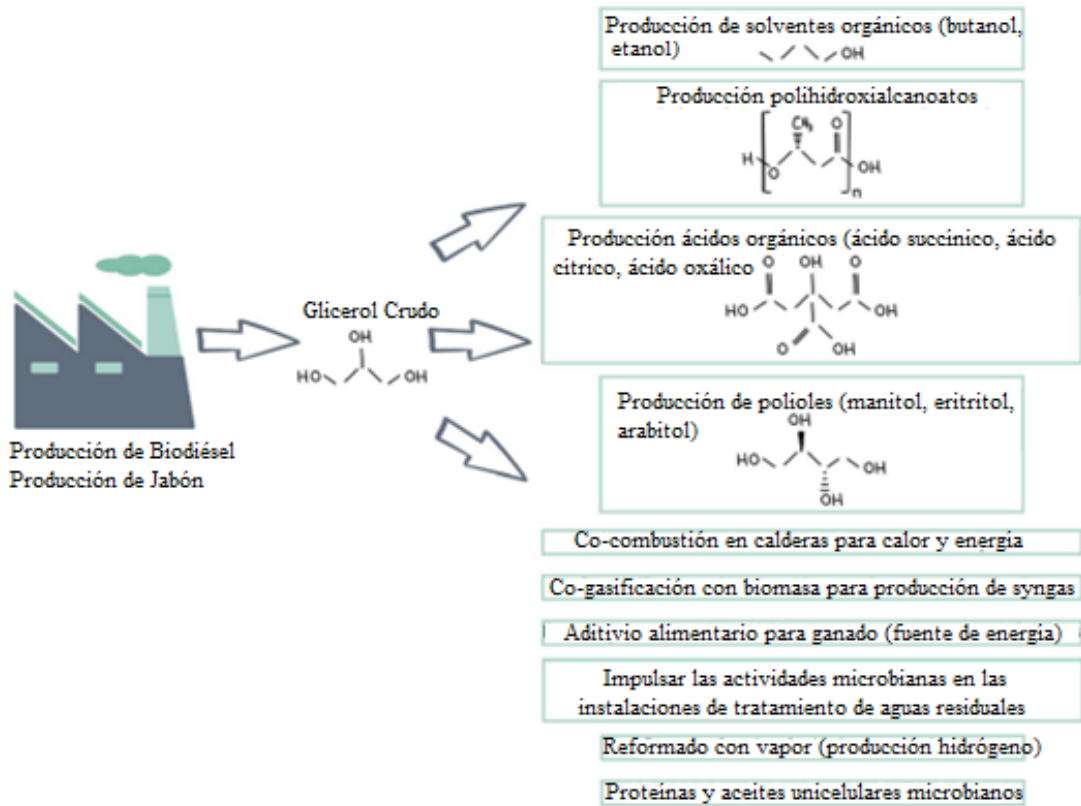
Un proceso de purificación simple para obtener una pureza mayor al 80% consiste en una acidificación y posterior neutralización para lograr la separación de ácidos grasos que pueden ser retornados a la producción de biodiésel y la precipitación de sales. Luego se debe eliminar el metanol y una porción de agua mediante evaporación. El ácido y la base seleccionados para este proceso de purificación genera diferentes tipos de sales que pueden presentar otras aplicaciones como el fosfato de potasio que se puede utilizar como fertilizantes y el cloruro de sodio como suplemento alimenticio. La selección de diferentes equipos para este proceso de purificación depende de la rentabilidad económica que el proceso presente en el mercado donde se plantea insertar, así como de la calidad del producto final que se desea obtener y de su aplicación final. (Ferrero, Rosa & Veneciano, 2010)

Se debe considerar la conversión del glicerol en químicos de alto valor agregado, para elevar la demanda en el mercado de este compuesto. Una de las aplicaciones de este compuesto es su conversión catalítica, que puede ser rentable dada su abundante disponibilidad en el mercado. Entre algunos químicos que se han logrado producir con el glicerol donde se encuentran involucradas transformaciones catalíticas se encuentran el hidrógeno, acroleína, propilenglicol, dihidroxiacetona, glicerol carbonato, glicerol éter, olefinas, entre otros (Zakaria, *et al.*, 2021). La fracción de ácidos grasos retornada a la

producción de biodiésel, permite incrementar su rendimiento, además de darle mayor valor agregado al proceso de purificación de la glicerina. (Ferrero, Rosa & Veneciano, 2010)

El glicerol crudo de la producción de biodiésel también puede ser transformado a otros productos útiles por medio de procesos biotecnológicos. Uno de los métodos para convertirlo en productos de valor agregado son las bioconversiones microbianas, donde se utiliza como un sustrato para diferentes microorganismos. Entre otras posibles aplicaciones se encuentra la producción de polihidroxicanoatos, polioles, ácidos orgánicos, entre otros; como se muestra en la Figura 2. (Rakicka, *et al.*, 2021; Zakaria, *et al.*, 2021)

Figura 2. Aplicaciones alternativas del glicerol crudo derivado de biodiésel.



Fuente: Zakaria, *et al.*, 2021.

C. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que pueden ser encontrados en una diversidad de ambientes. Existen más de 1000 especies, algunas presentan usos beneficiosos en la industria de alimentos y otras pueden llegar a provocar el pudrimiento de comidas. Otras son capaces de causar graves enfermedades a otros seres vivos (Parker *et al.*, 2018). La primera aplicación de una levadura fue su rol en fermentación de vino y pan, el nutriente más importante para ellas son los carbohidratos ya que son utilizados como fuente de carbono y energía. Entre otras fuentes de carbono que las levaduras pueden utilizar en un ambiente aeróbico se encuentran hexosas, pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, entre otros compuestos carbonados. (Türker, 2014)

D. *Yarrowia lipolytica*

Es una levadura ascomiceta con características fisiológicas y bioquímicas distintivas, de la que se tiene conocimiento sobre su potencial en la industria biotecnológica. Su importancia en esta industria se encuentra en la enorme cantidad de metabolitos que puede producir, así como el resto de las especies de su mismo género. Es capaz de descomponer hidrocarburos aromáticos y alifáticos, algunas especies pueden degradar compuestos nitro aromáticos, halogenados y organofosfatos. Además, puede utilizar diferentes desechos como aceites y producir productos de valor agregado como ácido cítrico, surfactantes, enzimas y aceites (Türker, 2014)

Las levaduras pertenecientes al género *Yarrowia* han sido estudiadas para la asimilación de diferentes azúcares, ácidos grasos y triacilgliceroles, así como para la producción de lípidos, polioles y ácido cítrico (Rakicka, *et al.*, 2021). *Yarrowia lipolytica* es de las especies más estudiadas de este género dado que presenta la habilidad natural para producir ácido cítrico, eritritol o biosurfactantes de diferentes fuentes de carbono, a diferencia de otras especies que requieren de modificación genética para lograrlo. (Rakicka, *et al.*, 2016)

E. Metabolismo

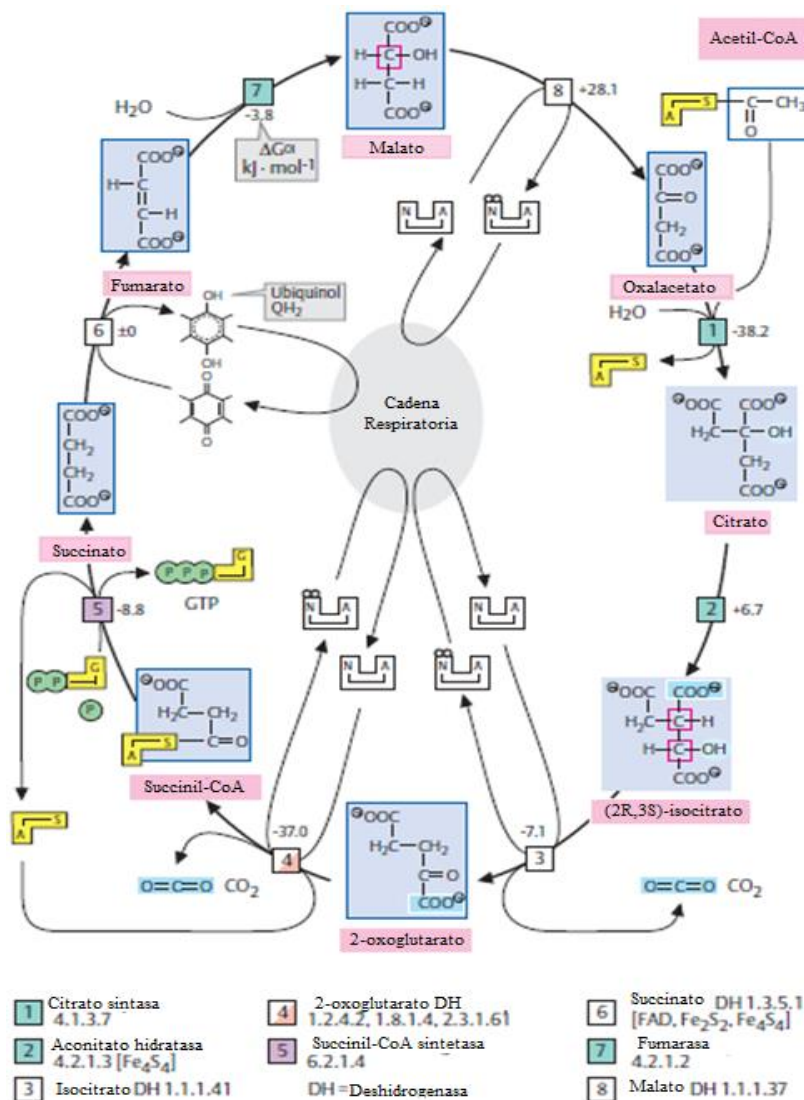
El metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que ocurren de manera continua y simultánea dentro de cada célula. Los compuestos involucrados en cada una de estas reacciones reciben el nombre de metabolitos. Las rutas metabólicas son secuencias específicas y organizadas de reacciones químicas donde los metabolitos son transformados por la acción de diferentes enzimas. Las rutas metabólicas comunes entre la mayoría de las células y organismos sirven para la síntesis, degradación e interconversión de metabolitos para la conservación de energía. (Koolman & Roehm, 2005)

Las proteínas, carbohidratos y lípidos son sustancias poliméricas que deben ser descompuestas en monómeros para poder ser procesados. Esto se lleva a cabo por procesos digestivos denominadas vías catabólicas, los fragmentos generados en estas vías son utilizados para la obtención de energía o para la formación de otras moléculas complejas en rutas denominadas vías anabólicas. Una ruta metabólica que incluye tanto vías anabólicas como catabólicas, es decir una vía anfibólica, es el Ciclo del Ácido Tricarboxílico o Ciclo de Krebs. (Koolman & Roehm, 2005)

El ciclo de Krebs, también conocido como el ciclo del ácido tricarbóxico o el ciclo del ácido cítrico es una vía metabólica circular llevada a cabo en la matriz mitocondrial. Consiste en 8 pasos, una serie de reacciones químicas, que oxida residuos acetil a dióxido de carbono, como se muestra en la Figura 3. El primer paso es la transferencia de un residuo de acetil-CoA a la molécula acarreadora oxalacetato para producir ácido tricarbóxico (ácido cítrico o citrato) por la enzima citrato sintasa. Seguidamente se da la isomerización del ácido a isocitrato por acción de la enzima aconitasa. El isocitrato es oxidado a alfa-cetoglutarato (o 2-oxoglutarato) liberando un grupo carboxilo como CO₂ y NADH+H. El siguiente paso es una segunda oxidación donde se forma el succinil-CoA catalizado por la 2-oxoglutarato deshidrogenasa liberando CO₂ y NADH+H de nuevo. Luego se da la división del succinil -CoA en succinato y coenzima A mientras se produce una molécula de GTP. (Koolman & Roehm, 2005; Parker *et al.*, 2018)

En las reacciones restantes del ciclo, se da la regeneración de la molécula de oxalacetato, primero con la oxidación del succinato en fumarato con la enzima succinato deshidrogenasa. Después se añade agua al fumarato con la enzima fumarato hidratasa (o fumarasa) para producir malato, el cual es oxidado en el paso final por la enzima malato deshidrogenasa en oxalacetato produciendo una última molécula de NADH+H para iniciar de nuevo el ciclo con una nueva molécula de acetil-CoA. (Koolman & Roehm, 2005; Parker *et al.*, 2018)

Figura 3. Representación gráfica del ciclo de Krebs.



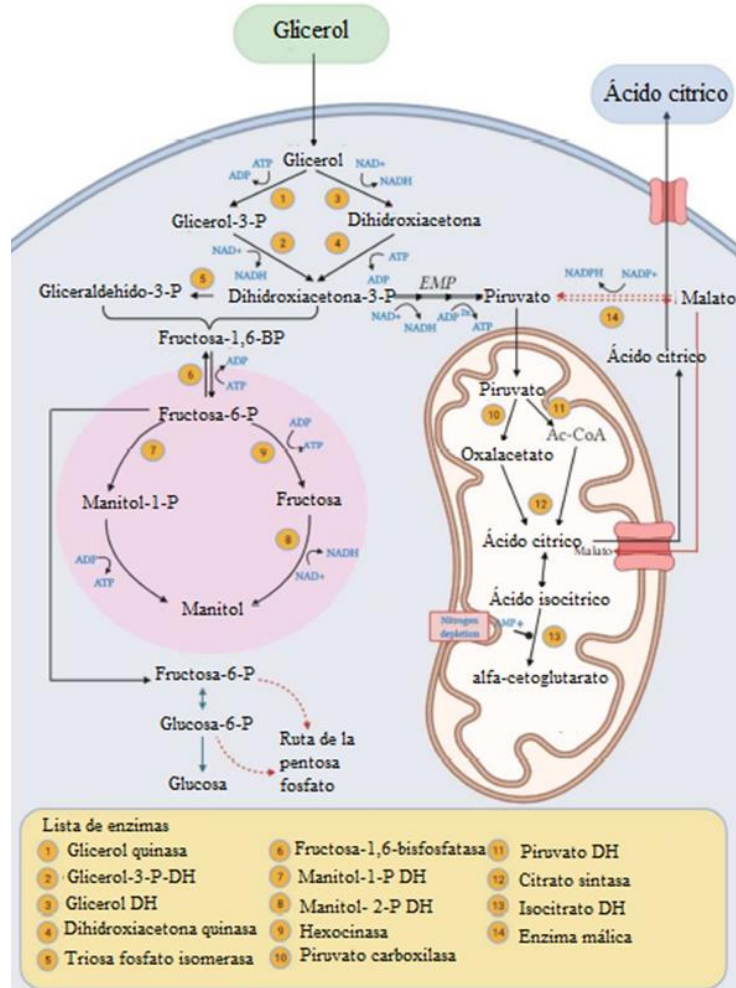
Fuente: Koolman & Roehm, 2005.

La regulación del ciclo de Krebs se da principalmente por la razón de NADH/NAD⁺. Un exceso de NADH+H, o una escasez de NAD⁺, inhibe las enzimas piruvato deshidrogenasa, oxoglutarato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa (Koolman & Roehm, 2005). Por ejemplo, la enzima isocitrato deshidrogenasa que se encuentra en la mitocondria y el citoplasma es activada en la presencia de magnesio y manganeso, y su inhibición se da por la alta presencia de alfa-cetoglutarato y citrato, lo que favorece la acumulación de ácido cítrico. Así mismo, una deficiencia de manganeso o fosfato, y una limitación de nitrógeno conlleva un aumento de la concentración de amonio intracelular. Este aumento inhibe la enzima PFK, que utiliza magnesio como cofactor y se encarga de la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato en glucólisis, identificada con el número 6 en la Figura 4. La inhibición de esta enzima también influye en la acumulación de ácido cítrico. (Behera, *et al.*, 2021)

En la Figura 4, se muestra la vía metabólica de asimilación del glicerol por la levadura *Y. lipolytica*, este compuesto puede integrarse al metabolismo por dos vías. La conversión de dihidroxiacetona seguido por una fosforilación o primero una fosforilación para generar glicerol-3-fosfato seguido de una oxidación, ambos para obtener dihidroxiacetona-3-fosfato, el cual es convertido a piruvato por la segunda fase de la glucólisis. (Giacomobono, *et al.*, 2022)

La mayoría de los intermediarios o metabolitos como piruvato o acetil-CoA generados por otras rutas catabólicas llegan al ciclo de Krebs, para oxidar los átomos de carbono a CO₂. Asimismo, algunos intermediarios generados dentro del Ciclo de Krebs son precursores de otras vías anabólicas para su conversión a compuestos como glucosa, aminoácidos o ácidos grasos. Una de las moléculas capaces de pasar por la membrana de la mitocondria es el citrato por medio del mecanismo de transporte, lanzadera malato-citrato, la cual permite un intercambio de estos dos compuestos fuera y dentro de la mitocondria para generar otros compuestos en el citoplasma celular. Con este sistema de transporte se infiere que no todo el ácido cítrico acumulado es secretado de manera extracelular, dado que se encuentra influenciado por diversos factores como saturación de aire, pH, temperatura o composición del medio. (Koolman & Roehm, 2005; Giacomobono, *et al.*, 2022)

Figura 4. Ruta metabólica propuesta para la biosíntesis de ácido cítrico a partir de glicerol en *Y. lipolytica*.



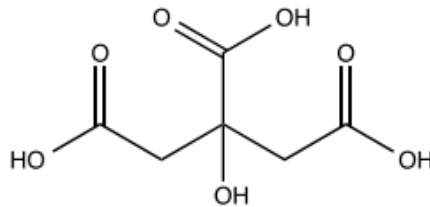
Fuente: Giacomobono, *et al.*, 2022.

F. Ácido cítrico

Es un ácido orgánico con estructura química simple (Figura 5), es dulce y con sabor agradable. Es parte de casi todos los tejidos animales y vegetales, se presenta en forma de ácido de frutas en limón, mandarina, lima, toronja, naranja, piña, ciruela, guisantes, melocotón, así como en huesos, músculos y sangre de animales. Es un ácido carboxílico versátil y se utiliza en industria de alimentos como acidulante, antioxidante y emulsificador, también presenta aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética. Puede ser sintetizado en laboratorio como un producto intermediario incoloro e inodoro.

De la producción total aproximadamente el 70% se destina a la industria de alimentos, el 12% para farmacéutica y el 18% para la industria química como agente de formación de espuma para ablandamiento y tratamiento de textiles (Alcoser, *et al.*, 2021; Reyes, *et al.*, 2013). Es un producto soluble en agua y alcohol, con una temperatura de fusión de 153°C y peso molecular de 192.12 g/mol. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

Figura 5. Estructura química del ácido cítrico.



El ácido cítrico es comúnmente producido por medio de fermentación de azúcares, principalmente sacarosa y melazas utilizando el hongo *Aspergillus niger* y diferentes levaduras, por fermentación sólida o sumergida (Reyes, *et al.*, 2013). Su producción se lleva a cabo en el ciclo de Krebs cuando los carbohidratos se oxidan a dióxido de carbono, siendo el principal producto metabólico formado y utilizado por todos los organismos aeróbicos. Su producción es un proceso complejo afectado por cambios metabólicos y morfológicos; dado que a pesar de que todas las levaduras, mohos y bacterias lleven a cabo el ciclo de Krebs, solamente algunos pueden incrementar la producción de ácido cítrico. Más del 90% del ácido cítrico producido en el mundo se obtiene por medio de fermentaciones. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

Presenta aplicaciones en la industria de medicina, agricultura e industria química. También se utiliza para ajustar el pH, como quelante, estabilizante de emulsiones y otros sistemas multifásicos o para formación de complejos estables con iones metálicos multivalentes, así como para la elaboración de bebidas carbonatas y no carbonatadas a bajas concentraciones. Su alta solubilidad es importante para la elaboración de jarabes y se puede utilizar en combinación con sales de citrato en bebidas de bajas calorías para otorgar sabor y propiedades buffer así como incrementar la actividad microbiana (Reyes, *et al.*, 2013). Alrededor del 99% de la producción mundial de ácido cítrico se obtiene por procesos microbianos. (Alcoser, *et al.*, 2021)

Cuadro 1. Aplicaciones en diferentes industrias del ácido cítrico y sus funciones.

Industria	Funciones
Vinos y cidras	<ul style="list-style-type: none"> - Prevención de pardeamiento en algunos vinos blancos. - Prevención de turbidez en vinos y sidras. - Ajuste de pH
Bebidas y jarabes	<ul style="list-style-type: none"> - Proporciona acidez. - Realza el sabor natural de la fruta. - Regulador de acidez en bebidas carbonatadas y a base de sacarosa.
Jaleas, mermeladas y conservante	<ul style="list-style-type: none"> - Ajuste de pH. - Regulador de acidez. - Proporciona sabor y acidez. - Aumento de la eficacia de los conservantes antimicrobianos.
Alimentación animal Postres gelatinosos Grasas y aceites animales	<ul style="list-style-type: none"> - Complementación de piensos. - Ajuste de pH. - Presenta efectos sinérgicos con otros antioxidantes.
Frutas congeladas	<ul style="list-style-type: none"> - Inactivación de enzimas oxidativas. - Reduce el pH - Protección del ácido ascórbico.
Productos cárnicos	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxidante. - Prevención de la coagulación de sangre fresca en mataderos.
Mariscos	<ul style="list-style-type: none"> - Prevención de la decoloración y el desarrollo de malos olores y sabores mediante la quelación de metales traza. - Mantener la estabilidad y el sabor al inactivar enzimas endógenas. - Mejorar la acción de antioxidantes.
Dulces	<ul style="list-style-type: none"> - Proveer acidez. - Reducción de la inversión de sacarosa. - Producción de color oscuro en caramelos duros. - Regulación de ácido.
Productos lácteos	<ul style="list-style-type: none"> - Emulsionante en helados y quesos procesados. - Agente acidificante en productos de queso. - Antioxidante

Fuente: Börekci, Kaban & Kaya, 2021.

El proceso de fermentación sumergida se lleva a cabo por lotes y puede durar entre 5 a 12 días, dependiendo de las condiciones de fermentación, este presenta mejores controles, menor riesgo de contaminación, bajo costo en mano de obra, alta productividad y rendimientos. Pero con las desventajas de presentar un medio de cultivo caro, sensible a la inhibición por trazas de metales y grandes cantidades de desecho (Reyes, *et al.*, 2013). La aplicación de levaduras en la producción de este compuesto tiene algunas ventajas como el uso de diversas fuentes de carbono dada su versatilidad metabólica y crecimiento.

Además de su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono, presentan tolerancia a diversas condiciones como alta concentración de sustrato, iones metálicos y bajos niveles de oxígeno, así como presentan menos riesgos, tienen la capacidad de utilizar sustratos menos purificados, una reducción en el tratamiento de desechos, menor costo en el proceso de recuperación de producto y presenta mayor facilidad para modificación genética mediante técnicas moleculares. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

La producción de ácido cítrico se lleva a cabo en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, existen diversos factores que pueden afectar su producción. La mejor temperatura para esta producción se encuentra en el rango de 26°C a 35°C, pero depende de acuerdo con el microorganismo utilizado. Otro factor importante es el tipo y la concentración de fuente de carbono. Las levaduras son capaces de metabolizar hidrocarburos, melazas, etanol, aceites vegetales, glicerol, galactosa y glucosa. La concentración y naturaleza de la fuente de nitrógeno también influye, algunos compuestos que pueden utilizarse como fuente de nitrógeno para aumentar la producción de ácido cítrico son sulfato de amonio, extracto de levadura y urea. Otros compuestos como el nitrato de amonio pueden ocasionar una acumulación de ácido oxálico. Sin embargo, se ha determinado que la producción de ácido cítrico comienza al agotarse la fuente de nitrógeno, por lo que una restricción de nitrógeno puede mejorar la producción de este compuesto. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

El ácido cítrico es liberado por un sistema de transporte dependiente de energía inducido por la restricción intracelular de nitrógeno dado que la enzima citrato sintasa se ve afectada negativamente por la presencia de iones de amonio. La relación de carbono/nitrógeno en el medio juega un rol importante en la biosíntesis de ácido cítrico, debido a que una deficiencia de nitrógeno lleva a un decremento de AMP intracelular, lo que conlleva a una reducción de este en las células ocasionando una baja actividad en la enzima isocitrato deshidrogenasa que convierte el ácido isocítrico en ácido alfa-cetoglutarico; lo que lleva a una acumulación de grandes cantidades de isocitrato. Bajas concentraciones de fosfato también presentan un efecto positivo en la producción de ácido cítrico lo que presenta un efecto en la actividad enzimática. Sin embargo, un exceso de

fosfato conlleva a un incremento en la fijación de dióxido de carbono lo que causa la estimulación de crecimiento. Los compuestos comúnmente usados como fuentes de nitrógeno y fósforo son sulfato de amonio, cloruro de amonio, extracto de levadura, dihidrogenofosfato de potasio y fosfato de dipotasio. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

El pH inicial en el medio debe ser ajustado de acuerdo con el microorganismo, sustrato y técnica de producción. La producción de ácido cítrico con *Y. lipolytica* se encuentra favorecida con valores de pH neutros. La aireación es otro de los factores que influye en la producción de metabolitos, con *Y. lipolytica* la producción de ácidos orgánicos aumenta con una elevada aireación y el requerimiento de una alta concentración de oxígeno se debe a el equilibrio metabólico de la formación de citrato y la alta concentración de azúcar utilizada. La presencia de alcoholes como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y acetato de metilo inhiben la producción de ácido cítrico al utilizarse en su forma pura, pero al utilizarse como carbohidratos crudos permiten un incremento en la producción. (Börekci, Kaban & Kaya, 2021)

La extracción de dicho ácido de estas fermentaciones puede realizarse por cristalización, precipitación, extracción y absorción (Reyes, *et al.*, 2013). La precipitación es uno de los métodos convencionales y más utilizados en procesos industriales para extraer el ácido cítrico de una fermentación sumergida, en el cual el caldo de fermentación se calienta a 50°C por minutos y se precipita como citrato de calcio usando carbonato de calcio. Este precipitado es filtrado y lavado con agua para luego llevarlo a acidificar tratándolo con ácido sulfúrico. Finalmente se filtra la solución nuevamente para remover el sulfato de calcio. Este proceso presenta la ventaja de ser simple, pero con la desventaja de llegar a la formación de productos indeseables. (Reyes, *et al.*, 2013)

Otro método es la separación por solventes, donde se utilizan aminas alifáticas de alto peso molecular para extraer el ácido cítrico, alcanzando hasta un 90% de recuperación. Este método es favorecido a pH bajo y entre sus ventajas se encuentra que presenta un consumo mínimo de ácidos y bases minerales con una menor generación de otros productos y no se evaporan grandes cantidades de agua. (Reyes, *et al.*, 2013)

VI. Metodología

Datos de placa de los equipos y especificaciones de los reactivos en la sección de anexos.

A. Purificación de glicerol

Materiales y equipo

- Beaker
- Balanza móvil modelo T31P
- Balanza modelo V31XH2
- Balanza analítica modelo PA114
- Espátula
- Papel encerado
- Guantes
- Varilla de vidrio
- Balón aforado
- Pipeta
- Pipeteador
- Ampolla de decantación
- Soporte metálico
- Aro metálico
- Kit de destilación simple
- Potenciómetro modelo PTTestr35
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de sodio

Procedimiento

1. Tomar con una pipeta graduada 5.36 mL de ácido sulfúrico utilizando guantes y agregarlo a un beaker con agua destilada.
2. Esperar unos minutos para que la solución regrese a temperatura ambiente y agregar a un balón aforado de 50 mL.
3. Terminar de aforar el balón con agua destilada para obtener una solución de ácido sulfúrico 2 M.
4. Pesar en una balanza analítica 2.0 gramos de hidróxido de sodio colocándolo en un trozo de papel encerado previamente tarado.
5. Agregar el hidróxido de sodio a un beaker con agua destilada y esperar unos minutos a que la solución regrese a temperatura ambiente.
6. Agregar la solución a un balón aforado de 50 mL y terminar de aforar con agua destilada para obtener una solución de hidróxido de sodio 1 M.
7. Tomar con un beaker una muestra de glicerol de 1 Litro aproximadamente de la planta piloto de producción de biodiésel del Laboratorio de Operaciones Unitarias.
8. Acidificar la muestra con ácido sulfúrico 2 M poco a poco realizando mediciones de pH con un potenciómetro por intervalos hasta alcanzar un pH de 6.
9. Esperar unos días hasta poder diferenciar diferentes fases en la muestra.
10. Descartar las sales suspendidas de la fase acuosa separándola, utilizando otro beaker.
11. Neutralizar la fase acuosa con hidróxido de sodio 2 M poco a poco realizando mediciones de pH con un potenciómetro por intervalos hasta alcanzar un pH 7.
12. Esperar unos días y descartar las sales suspendidas.
13. Preparar un sistema de destilación simple colocando vaselina entre todas las uniones de las piezas y mangueras para el paso de agua fría por el condensador.
14. Verter en el balón 40 mL de la solución de glicerol obtenida.
15. Unir el balón al sistema de destilación y colocarlo dentro de una manta térmica para calentarlo.
16. Comenzar el proceso de destilación controlando que la temperatura se encuentre entre un rango de 60°C a 100°C para eliminar metanol residual y la mayor cantidad de agua posible.
17. Recolectar el destilado en un beaker y cuantificarlo al terminar la destilación.

18. Repetir los pasos 14 a 17 hasta destilar toda la solución de glicerol.
19. Recolectar toda la solución remanente de glicerol y ajustar el pH a 7 utilizando ácido sulfúrico o hidróxido de sodio.
20. Preparar un sistema utilizando un soporte metálico, un aro metálico, la ampolla de decantación y un beaker.
21. Colocar la solución de glicerol en la ampolla de decantación y esperar unos minutos hasta observar dos fases. Una fase de color café oscuro constituida en su mayoría por ácidos grasos (fase superior) y una fase de color café claro donde se encuentra el glicerol (fase inferior).
22. Girar la llave que se encuentra en la parte inferior de la ampolla para comenzar a verter la fase inferior en un beaker hasta alcanzar la interfase y descartar la fase superior que permaneció en la ampolla.
23. Almacenar el glicerol purificado en un erlenmeyer tapado con papel aluminio.

B. Caracterización del glicerol

Materiales y equipo

- Beaker
- Viscosímetro de Cannon-Fenske
- Viscosímetro de Ubbelohde
- Baño térmico modelo MX17VB6G-A11B
- Cronómetro
- Pipeteador
- Picnómetro
- Potenciómetro
- Balanza analítica modelo PA114
- Tubos de ensayo con tapadera

Procedimiento

1. Tomar en 3 beakers distintos una muestra de glicerol crudo, glicerol previamente purificado y glicerina grado reactivo.
2. Tomar el picnómetro y anotar el volumen que indica el mismo.
3. Pesarse el picnómetro completamente seco en una balanza analítica.
4. Verter la muestra de glicerol crudo en el picnómetro casi llenándolo por completo.
5. Colocar el termómetro en el picnómetro y luego la tapadera en la otra salida y limpiar los remanentes de líquido de las paredes exteriores del picnómetro.
6. Pesarse el picnómetro con el glicerol crudo.
7. Determinar la densidad con la diferencia de pesos del picnómetro lleno y vacío dividiéndolo en el volumen previamente anotado.
8. Determinar la densidad del glicerol purificado y la glicerina grado reactivo de la misma manera.
9. Repetir los pasos 3 a 7 tres veces por muestra.
10. Conectar el baño térmico y ajustarlo a una temperatura de 50°C.
11. Esperar que la temperatura se estabilice y colocar el viscosímetro de Cannon-Fenske dentro del baño térmico por 10 minutos sujetándolo con un soporte metálico y una pinza de tres dedos.
12. Verter la muestra de glicerol crudo en el orificio ancho del viscosímetro hasta llenar la mitad del balón.
13. Dejar dentro del baño térmico por 10 minutos para que la muestra alcance la temperatura deseada.
14. Con un pipeteador aplicar succión en el tubo angosto del viscosímetro hasta que la muestra alcance el balón superior.
15. Tomar el tiempo que tarda la muestra en recorrer de la marca superior del balón inferior indicada en el viscosímetro hasta la marca inferior.
16. Determinar la viscosidad (cSt) multiplicando el tiempo en segundos por la constante del viscosímetro indicada en el manual de uso.
17. Repetir los pasos 14 a 16 dos veces más.
18. Repetir los pasos 11 a 17 para las muestras de glicerol purificado y glicerina grado reactivo.

19. Tomar en 3 beakers distintos una muestra de glicerol crudo, glicerol previamente purificado y glicerina grado reactivo.
20. Con un potenciómetro previamente calibrado, determinar el pH de cada una de las muestras.
21. Realizar una dilución 1:10 de cada una de las muestras en un tubo de ensayo para análisis en HPLC.

C. Propagación de la levadura en caja Petri

Materiales y equipo

- Caja Petri con *Yarrowia lipolytica*
- Agar YPD
- Agua destilada
- Probeta
- Estufa
- Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Espátula
- Balanza analítica modelo PA114
- Papel encerado
- Papel aluminio
- Cinta testigo
- Autoclave
- Guantes térmicos
- Plancha de asbesto
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Mechero
- Encendedor
- Cajas Petri
- Asa bacteriológica

- Tijeras
- Papel parafilm
- Incubadora

Procedimiento

1. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica la cantidad de agar YPD necesario de acuerdo con las especificaciones indicadas en el envase para preparar 100 mL de agar YPD con la espátula.
2. Medir con una probeta 100mL de agua destilada y verterla en un Erlenmeyer de 150mL.
3. Agregar los gramos de agar YPD previamente pesados en el Erlenmeyer y colocar un agitador magnético.
4. Colocar el Erlenmeyer en la estufa a una temperatura aproximada de 60°C y agitar hasta que el agar se disuelva y se torne traslúcido.
5. Retirar el erlenmeyer de la estufa y sacar el agitador magnético.
6. Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio y colocar un pequeño trozo de cinta testigo.
7. Abrir la puerta de la autoclave y colocar el erlenmeyer dentro de la canasta, revisando que el nivel de agua del equipo sea el adecuado.
8. Seleccionar el programa de esterilización de medios en la autoclave y cerrar la puerta.
9. Presionar el botón de “Start” para que la autoclave comience el proceso de esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos.
10. Terminado el ciclo de esterilización, presionar el botón de “Stop” y abrir la puerta de la autoclave con guantes térmicos para sacar la cristalería y colocarla en la plancha de asbesto.
11. Limpiar la superficie de la mesa con cloro al 10% y luego con etanol al 70%.
12. Encender el mechero con el encendedor.
13. Destapar las cajas Petri en el área estéril alrededor del mechero y verter aproximadamente 20 mL de agar YPD utilizando guantes térmicos.
14. Esperar unos minutos hasta que el agar se solidifique, tapar las cajas Petri e invertirlas.
15. Esterilizar el asa bacteriológica en el mechero.
16. Abrir la caja Petri con el cultivo original de *Yarrowia lipolytica* y tomar una colonia con el asa estéril.

17. Estriar la colonia tomada en una de las nuevas cajas Petri preparadas con el agar YPD y taparla.
18. Repetir los pasos 16 y 17 con las otras cajas Petri preparadas con agar YPD.
19. Sellar las cajas Petri con un trozo de papel Parafilm y colocar en la incubadora a 30°C por 2 días.

D. Adaptación a medio de cultivo

Materiales y equipo

- Erlenmeyer
- Medio YPD
- Glicerol purificado
- Sulfato de amonio
- Cloruro de magnesio
- Fosfato monopotásico
- Cloruro de calcio
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Sulfato de manganeso hidratado
- Agua destilada
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Probeta
- Asa bacteriológica
- Encendedor
- Mechero
- Cajas Petri cultivadas
- Balanza analítica modelo PA114
- Espátula
- Papel encerado
- Estufa
- Agitador magnético

- Cinta testigo
- Autoclave
- Guantes térmicos
- Plancha de asbesto
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Incubadora con agitación

Procedimiento

1. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica la cantidad de medio YPD necesario de acuerdo con las especificaciones indicadas en el envase para preparar 50 mL de medio YPD con la espátula.
2. Medir con una probeta 50mL de agua destilada y verterla en un Erlenmeyer de 125mL.
3. Agregar los gramos de medio YPD previamente pesados en el Erlenmeyer y colocar un agitador magnético.
4. Colocar el Erlenmeyer en la estufa y agitar hasta que el medio se disuelva y se torne traslúcido.
5. Retirar el Erlenmeyer de la estufa y sacar el agitador magnético.
6. Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio y colocar un pequeño trozo de cinta testigo.
7. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica la cantidad de medio YPD necesario para preparar 25 mL de medio YPD con la espátula.
8. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica las cantidades necesarias de los siguientes reactivos (exceptuando el glicerol) para preparar 25mL de medio de cultivo.

Cuadro 2. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para la adaptación de *Yarrowia lipolytica* al glicerol.

Glicerol (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	Cloruro de magnesio (g/L)	Fosfato monopotásico (g/L)	Cloruro de calcio (g/L)	Sulfato de zinc heptahidratado (g/L)	Sulfato de manganeso hidratado (g/L)
5	0.5	1.5	5	0.15	0.02	0.06

9. Medir con una probeta los mililitros de agua destilada necesarios para completar un volumen de 50 mL tomando en cuenta la cantidad de mililitros de glicerol purificado necesarios para una concentración de 5 g/L de glicerol en el medio de cultivo.
10. Agregar los gramos de medio YPD y los otros reactivos previamente pesados en el Erlenmeyer y colocar un agitador magnético.
11. Agregar con una pipeta graduada 0.1 mL de glicerol purificado en el Erlenmeyer.
12. Repetir los pasos 4 a 6 con este medio de cultivo.
13. Abrir la puerta de la autoclave y colocar los erlenmeyers dentro de la canasta, revisando que el nivel de agua del equipo sea el adecuado.
14. Seleccionar el programa de esterilización de medios en la autoclave y cerrar la puerta.
15. Presionar el botón de “Start” para que la autoclave comience el proceso de esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos.
16. Terminado el ciclo de esterilización, presionar el botón de “Stop” y abrir la puerta de la autoclave con guantes térmicos para sacar la cristalería y colocarla en la plancha de asbesto.
17. Esperar unos minutos hasta que los medios de cultivo alcancen la temperatura ambiente.
18. Limpiar la superficie de la mesa con cloro al 10% y luego con etanol al 70%.
19. Encender el mechero con el encendedor.
20. Esterilizar el asa bacteriológica en el mechero.
21. Abrir una caja Petri con el cultivo de *Yarrowia lipolytica* alrededor del área estéril del mechero y tomar una colonia con el asa estéril.
22. Inocular el Erlenmeyer de medio YPD con la colonia tomada.
23. Incubar el Erlenmeyer a 28°C y 180 rpm por 24 horas.

24. Limpiar la superficie de la mesa con cloro al 10% y luego con etanol al 70%.
25. Encender el mechero con el encendedor y sacar de la incubadora el Erlenmeyer de medio YPD.
26. Con una macropipeta de 5mL y puntas para macropipeta estériles, tomar 5mL del cultivo en medio YPD y agregar al Erlenmeyer con medio YPD y glicerol.
27. Incubar el Erlenmeyer a 28°C y 180 rpm por 24 horas.

E. Preparación de inóculo

Materiales y equipo

- Erlenmeyer
- Glicerol purificado
- Sulfato de amonio
- Cloruro de magnesio
- Fosfato monopotásico
- Cloruro de calcio
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Sulfato de manganeso hidratado
- Agua destilada
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Probeta
- Encendedor
- Mechero
- Balanza analítica modelo PA114
- Espátula
- Papel encerado
- Estufa
- Agitador magnético
- Cinta testigo
- Autoclave
- Guantes térmicos

- Plancha de asbesto
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Incubadora con agitación

Procedimiento

1. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica las cantidades necesarias de los siguientes reactivos (exceptuando el glicerol) para preparar 50mL de medio de cultivo.

Cuadro 3. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para el inóculo de *Yarrowia lipolytica*.

Glicerol (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	Cloruro de magnesio (g/L)	Fosfato monopotásico (g/L)	Cloruro de calcio (g/L)	Sulfato de zinc heptahidratado (g/L)	Sulfato de manganeso hidratado (g/L)
20	0.5	1.5	5	0.15	0.02	0.06

2. Medir con una probeta los mililitros de agua destilada necesarios para completar un volumen de 50 mL tomando en cuenta la cantidad de mililitros de glicerol purificado necesarios para una concentración de 20 g/L de glicerol en el medio de cultivo.
3. Agregar los gramos de los reactivos previamente pesados en el Erlenmeyer y colocar un agitador magnético.
4. Agregar con una pipeta graduada 1.12 mL de glicerol purificado en el Erlenmeyer.
5. Colocar el Erlenmeyer en la estufa y agitar hasta que el medio se disuelva y se torne traslúcido.
6. Retirar el Erlenmeyer de la estufa y sacar el agitador magnético.
7. Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio y colocar un pequeño trozo de cinta testigo.
8. Repetir los pasos 12 a 16 del procedimiento anterior.
9. Limpiar la superficie de la mesa con cloro al 10% y luego con etanol al 70%.
10. Encender el mechero con el encendedor.
11. Tomar el Erlenmeyer con medio YPD y glicerol.

12. Con una macropipeta de 5mL y puntas para macropipeta estériles, tomar 5mL del cultivo en medio YPD y glicerol y agregar al Erlenmeyer con el nuevo medio formulado.
13. Incubar el Erlenmeyer a 28°C y 180 rpm por 24 horas.

F. Preparación de medios de cultivo

Materiales y equipo

- Glicerol purificado
- Sulfato de amonio
- Cloruro de magnesio
- Fosfato monopotásico
- Cloruro de calcio
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Sulfato de manganeso hidratado
- Erlenmeyer
- Balanza analítica modelo PA114
- Espátula
- Papel encerado
- Papel aluminio
- Agua destilada
- Probeta
- Agitador magnético
- Estufa
- Cinta testigo
- Guantes térmicos
- Autoclave
- Plancha de asbesto
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Mechero
- Encendedor

Procedimiento

1. Pesar en papel encerado previamente tarado en la balanza analítica las cantidades necesarias de los siguientes reactivos (exceptuando el glicerol) para preparar 450mL de cada uno de los medios de cultivo listados donde se varía la concentración de fuente de carbono y posteriormente la concentración de fuente de nitrógeno.

Cuadro 4. Concentraciones en medio de cultivo desarrollado para el crecimiento y producción de ácido cítrico empleando *Yarrowia lipolytica*.

Medio de Cultivo	Glicerol (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	Cloruro de magnesio (g/L)	Fosfato mono-potásico (g/L)	Cloruro de calcio (g/L)	Sulfato de zinc hepta-hidratado (g/L)	Sulfato de manganeso hidratado (g/L)
1	35	0.5	0.5	5	0.15	0.02	0.06
2	70	0.5	0.5	5	0.15	0.02	0.06
3	110	0.5	0.5	5	0.15	0.02	0.06
4	35	1	0.5	5	0.15	0.02	0.06
5	35	0.2	0.5	5	0.15	0.02	0.06

2. Medir con una probeta 450 mL de agua destilada y verterla en un Erlenmeyer de 500mL
3. Agregar los gramos de los reactivos previamente pesados en el Erlenmeyer y colocar un agitador magnético.
4. Colocar el Erlenmeyer en la estufa a una temperatura aproximada de 60°C y agitar hasta que los componentes se disuelvan.
5. Retirar el Erlenmeyer de la estufa y sacar el agitador magnético.
6. Tomar con una pipeta graduada los mililitros necesarios para alcanzar las concentraciones indicadas en el Cuadro 4 de glicerol previamente purificado para cada uno de los medios de cultivo formulados.
7. Tomar 3 Erlenmeyers de 250mL y verter en cada uno 150 mL del primer medio de cultivo formulado utilizando una probeta para realizar un triplicado por medio de cultivo formulado.
8. Repetir el paso anterior con cada uno de los medios de cultivo restantes.

9. Tapar los Erlenmeyers con papel aluminio y colocarles un pequeño trozo de cinta testigo.
10. Abrir la puerta de la autoclave y colocar los erlenmeyers dentro de la canasta, revisando que el nivel de agua del equipo sea el adecuado.
11. Seleccionar el programa de esterilización de medios en la autoclave y cerrar la puerta.
12. Presionar el botón de “Start” para que la autoclave comience el proceso de esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos.
13. Terminado el ciclo de esterilización, presionar el botón de “Stop” y abrir la puerta de la autoclave con guantes térmicos para sacar la cristalería y colocarla en la plancha de asbesto hasta que alcancen una temperatura adecuada para su uso.

G. Fermentación para producción de ácido cítrico y toma de muestras

Materiales y equipo

- Erlenmeyers con medio de cultivo formulados
- Inóculo previamente preparado
- Papel aluminio
- Incubadora con agitación
- Macropipeta de 5mL
- Puntas para macropipeta
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Mechero
- Encendedor
- Tubos de ensayo con tapadera
- Tubos Falcon 15 mL
- Centrífuga
- Tubos eppendorf

Procedimiento

1. Limpiar la superficie de la mesa con cloro al 10% y luego con etanol al 70%.
2. Encender el mechero con el encendedor.

3. Tomar el Erlenmeyer con medio de concentración 20 g/L de glicerol (inóculo).
4. Tomar una muestra de 0.5mL del inóculo con la macropipeta para conteo posterior utilizando la Cámara de Neubauer.
5. Con una macropipeta de 5mL y puntas para macropipeta estériles, tomar 4.5 mL del inóculo e inocular los 3 Erlenmeyer con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L (triplicado).
6. Tomar una muestra de 2.5mL del medio de cultivo en un tubo falcon de 15mL rotulado y una muestra de 0.5 para conteo celular trabajando alrededor del área estéril del mechero.
7. Colocar de nuevo el papel aluminio a los 3 Erlenmeyers y colocar en la incubadora con agitación a 180 rpm y 28°C por una semana.
8. Repetir el paso 6 todos los días para cada una de las fermentaciones realizadas.
9. Repetir el paso 5 a 8 para el triplicado de cada uno de los medios de cultivo formulados.
10. Colocar los tubos falcon recolectados en una centrífuga y centrifugar por 15 minutos a máxima velocidad.
11. Tomar 2 mL del sobrenadante obtenido y colocarlo en un tubo de ensayo rotulado con tapadera para enviar a análisis de HPLC para determinación de la concentración de glicerol y ácido cítrico.

H. Conteo celular

Materiales y equipo

- Cámara de Neubauer
- Azul de metileno
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Microscopio
- Tubos Eppendorf
- Agua destilada
- Kimwipes

Procedimiento

1. Tomar las muestras recolectadas de las fermentaciones y realizar las diluciones 1:10, 1:100 o 1:1000 según lo requiera cada una de las muestras utilizando agua destilada y la micropipeta de 10uL.
2. Tomar en un tubo Eppendorf 11uL de la dilución adecuada (según cada muestra) y agregar 11uL de azul de metileno.
3. Homogeneizar la solución y esperar 2 minutos.
4. Preparar la cámara de Neubauer limpiando cuidadosamente con Kimwipes la cámara y el cubreobjetos correspondiente.
5. Verter en cada uno de los pozos de la cámara de Neubauer 11uL de la solución preparada en el paso 3 utilizando la micropipeta.
6. Colocar la cámara en el microscopio y enfocar utilizando el objetivo 10x.
7. Contar las células encontradas en las 4 esquinas de cuadros 4 x 4.
8. Realizar los cálculos necesarios para determinar la concentración de células por mililitro en cada muestra como se muestra en la sección de datos calculados en anexos.

I. Análisis de muestras por cromatografía líquida

Materiales y equipo

- HPLC
- Columna HyPlex H
- Agua
- Viales
- Muestras
- Jeringa
- Filtros 0.22 μm

Procedimiento

1. Filtrar hacia un vial, con la ayuda de una jeringa, cada una de las muestras.
2. Colocar las muestras en la bandeja para el equipo de cromatografía líquida.
3. Encender el equipo y programar los pozos en donde se encuentran las muestras.

4. Verificar que el nivel del agua que se utilizará para la fase móvil alcance para las muestras a analizar.
5. Abrir la llave de purga y esperar hasta que ya no se encuentren burbujas en la manguera.
6. Comenzar a correr las muestras.
7. Exportar los cromatogramas obtenidos y analizar las muestras en base a las curvas de calibración.

J. Purificación de ácido cítrico

Materiales y equipo

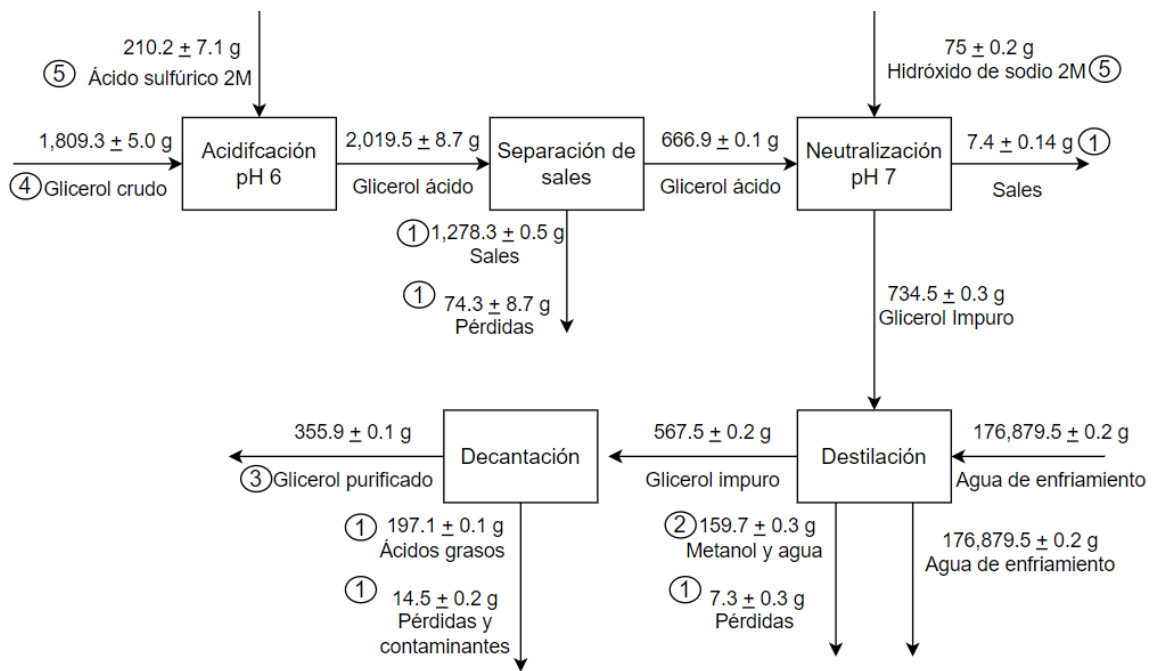
- Tubos Falcon 50mL
- Centrífuga
- Balanza analítica modelo PA114
- Balanza
- Beaker
- Horno secador a 60°C
- Agitador magnético
- Estufa
- Lechada de cal
- Ácido sulfúrico 2M
- Probeta
- Kitasato
- Filtro Buchner
- Bomba de vacío
- Papel filtro
- Varilla de vidrio
- Tubos Eppendorf

Procedimiento

1. Después de la fermentación, verter el medio en tubos Falcon de 50mL.
2. Centrifugar a 5000 rpm por 30 minutos.
3. Recolectar el sobrenadante obtenido en un beaker y el tubo Falcon con el pellet colocarlo en el horno secador a 60°C hasta alcanzar peso constante.
4. Colocar un agitador magnético en el beaker y colocarlo en la estufa con agitación.
5. Agregar aproximadamente 0.5 gramos de cal por cada gramo de ácido cítrico producido gota por gota para propiciar la precipitación de citrato de calcio.
6. Conectar la manguera de la bomba de vacío al Kitasato y preparar el sistema con el filtro buchner y papel filtro.
7. Filtrar la solución obtenida y colocar el filtro con el citrato de calcio obtenido en el horno secador a 60°C desechando el líquido.
8. Recolectar el citrato de calcio seco en un beaker y verter ácido sulfúrico mezclando la solución utilizando una varilla de vidrio para precipitar sulfato de calcio y obtener ácido cítrico en solución.
9. Filtrar la solución obtenida y colocar el filtro con el sulfato de calcio obtenido en el horno secador a 60°C.
10. Reservar el líquido obtenido en un beaker y calentarlo en la estufa para evaporar la mayor cantidad de líquido.
11. Al observar pequeños cristales en el líquido, retirar de la estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de colocarlo en el refrigerador por unos minutos.
12. Tomar el beaker y filtrar al vacío los cristales de ácido cítrico obtenidos realizando lavados con agua destilada fría.
13. Colocar el filtro con el ácido cítrico obtenido en el horno secado a 60°C.
14. Recolectar el ácido cítrico en un tubo eppendorf por cada fermentación realizada para análisis IR.

VII. Resultados

Figura 6. Esquema del proceso de purificación de glicerol realizado en las pruebas de laboratorio.



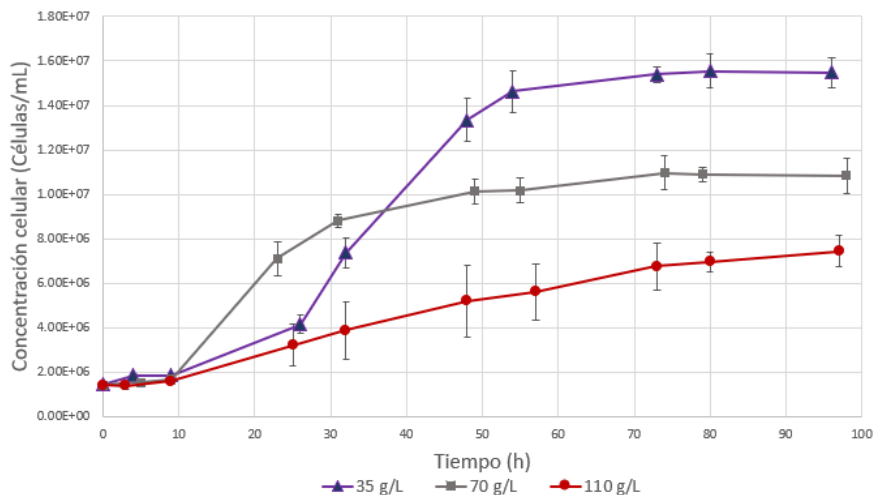
Balances de masa realizados con los datos mostrados en la sección de datos originales con su respectiva propagación de error en el apartado de anexos. Notación de entradas y salidas: (1) Tratamientos posteriores para descarte. (2) Tratamientos posteriores para almacenamiento (3) Almacenamiento para formulación de medios de cultivo. (4) Subproducto de producción de biodiésel. (5) Soluciones preparadas en el laboratorio.

Cuadro 5. Comparación de propiedades de glicerina grado reactivo, glicerol crudo y glicerol purificado

Propiedad	Glicerol crudo	Glicerina grado reactivo	Glicerol purificado
Densidad (g/mL)	0.9996 ± 0.0012	1.2387 ± 0.0010	1.1768 ± 0.0009
Viscosidad (cP)	24.16 ± 1.35	122.72 ± 1.10	12.14 ± 0.26
pH	10.79 ± 0.01	6.95 ± 0.01	4.12 ± 0.01
Solubilidad en agua	No	Miscible	Miscible
Pureza (p/v)	N.D.	89.27%	84.19%
Características físicas	Líquido café oscuro con olor característico	Líquido incoloro transparente.	Líquido café claro con tonos amarillentos con olor leve.

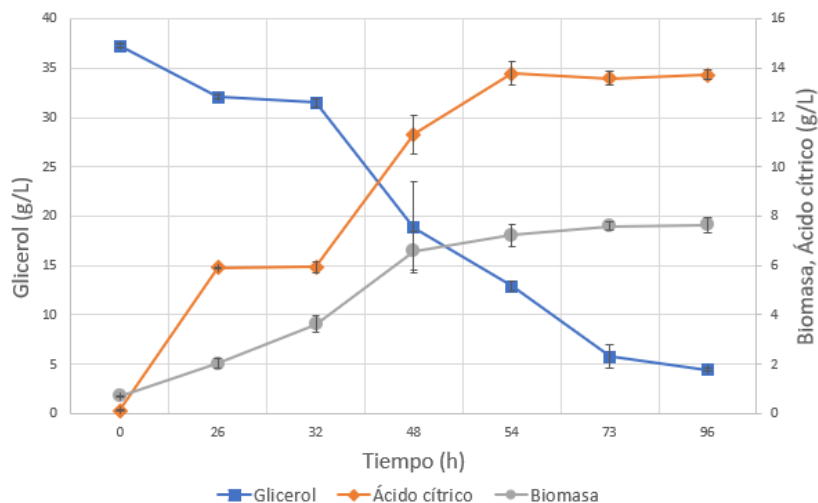
Datos de densidad obtenidos a 23°C con un picnómetro, datos de viscosidad obtenidos a 50°C con viscosímetro, datos de pH obtenidos con potenciómetro a 23°C y datos de pureza obtenidos mediante análisis por cromatografía líquida. Glicerol purificado con un rendimiento de 19.67%. Notación: N.D. Los datos no están disponibles. Ver datos de equipos en el apartado de anexos.

Figura 7. Comparación del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en los medios de cultivo con concentraciones iniciales de glicerol de 35g/L, 70 g/L y 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.



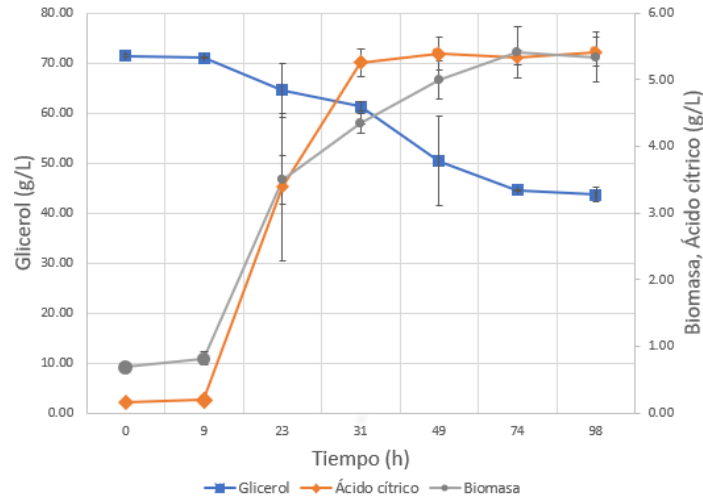
Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 41, 42 y 43 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana. Las líneas muestran una tendencia suavizada para mejor comprensión de los datos con la representación de la desviación estándar en cada dato.

Figura 8. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.



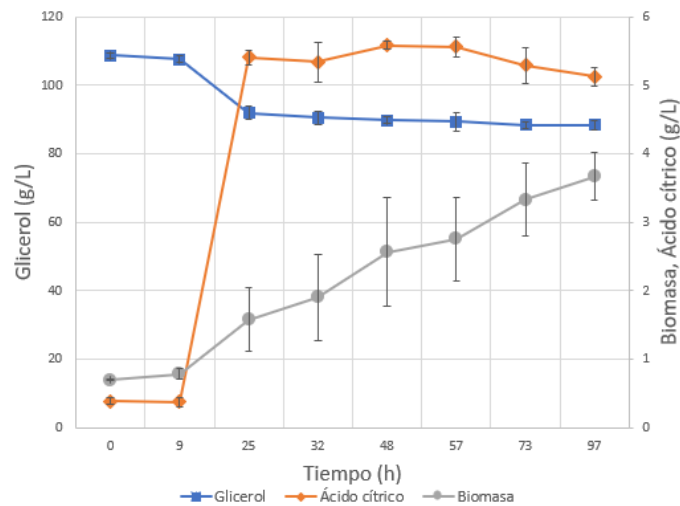
Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 23 y 41 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana.

Figura 9. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 70g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.



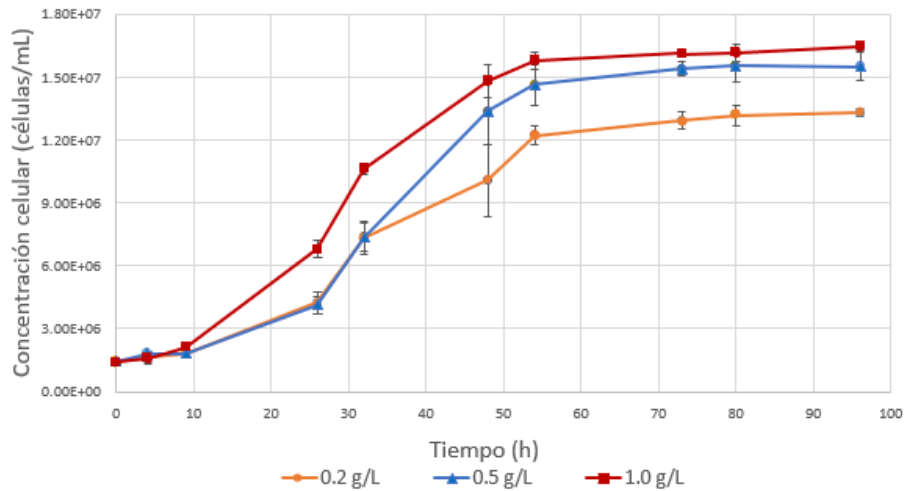
Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 24 y 42 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana.

Figura 10. Consumo de glicerol y producción de ácido cítrico en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 110 g/L, 0.5 g/L de nitrógeno.



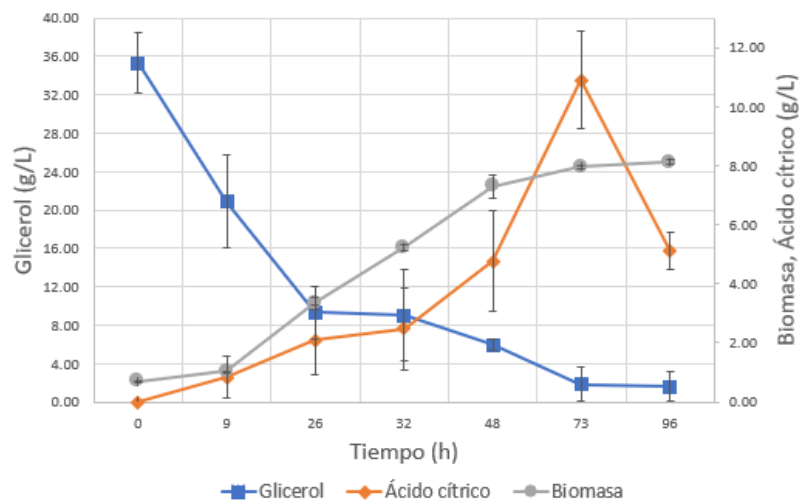
Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 25 y 43 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana.

Figura 11. Comparación de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentraciones de nitrógeno de 0.2 g/L, 0.5 g/L y 1 g/L.



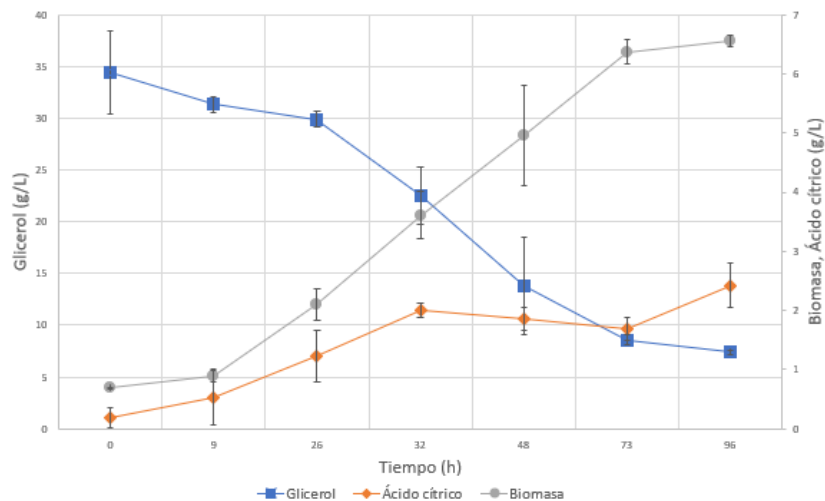
Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en el Cuadro 41, 44 y 45 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana. Las líneas muestran una tendencia suavizada para mejor comprensión de los datos con la representación de la desviación estándar en cada dato.

Figura 12. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 1 g/L de nitrógeno.



Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 26 y 44 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana.

Figura 13. Consumo de glicerol, producción de ácido cítrico y biomasa en la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.2 g/L de nitrógeno.



Los datos utilizados para construir el gráfico se encuentran en los Cuadros 27 y 45 en el apartado anexos, la fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm durante una semana.

Cuadro 6. Producción de biomasa, ácido cítrico y consumo de glicerol por *Y. lipolytica* en las fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.

Concentración	Fermentación				
	1	2	3	4	5
Glicerol inicial (g/L)	37.26 ±0.23	71.48 ±0.21	108.70 ±0.22	35.28 ±4.74	34.41 ±4.07
Glicerol final (g/L)	4.47 ±0.13	43.63 ±1.44	88.40 ±0.31	1.62 ±0.81	7.38 ±0.20
Glicerol consumido (g/L)	32.79 ±0.26	27.84 ±1.46	20.30 ±0.38	33.65 ±4.81	27.03 ±4.08
Biomasa inicial (g/L)	0.70 ±0.02	0.69 ±0.01	0.70 ±0.02	0.69 ±0.01	0.69 ±0.01
Biomasa final (g/L)	7.64 ±0.07	5.34 ±0.08	3.67 ±0.70	8.12 ±0.08	6.56 ±0.10
Ácido cítrico máxima (g/L)	13.79 ±0.10	5.42 ±0.22	5.58 ±0.03	10.90 ±2.45	2.43 ±0.10
Ácido cítrico final (g/L)	13.73 ±0.17	5.42 ±0.22	5.13 ±0.07	5.10 ±0.04	2.43 ±0.10
Subproductos y mantenimiento celular (g/L)	12.26±0.33	17.95 ±1.47	12.59 ±0.80	21.13 ±4.54	18.91 ±4.08

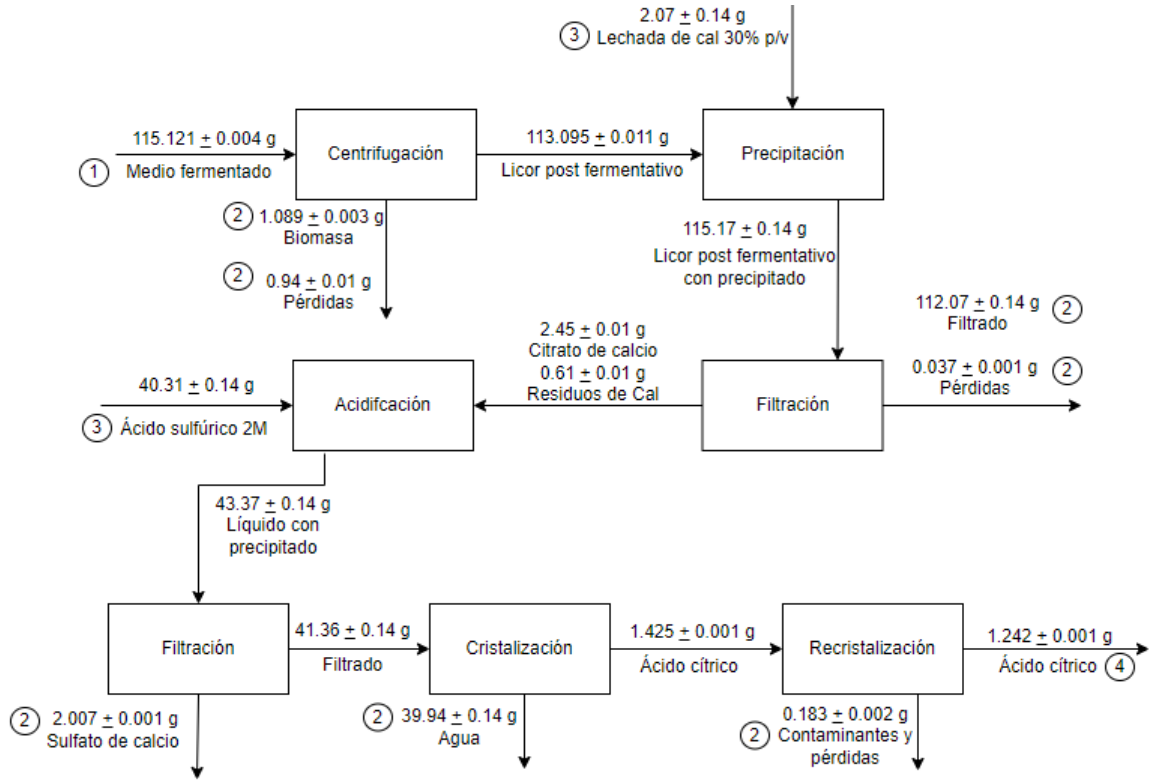
Datos obtenidos de las fermentaciones realizadas a 28°C y 180 rpm por una semana. La fuente de nitrógeno fue sulfato de amonio. (1) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (2) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (3) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (4) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno. (5) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

Cuadro 7. Parámetros de crecimiento y rendimientos de conversión para las fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.

Parámetro	Concentración inicial de glicerol (g/L)			**Concentración inicial de fuente de nitrógeno (g/L)	
	*35	70	110	0.2	1
td (hora)	14.4	14.6	20.2	12.8	12.0
μ ($hora^{-1}$)	0.048	0.047	0.034	0.054	0.058
Y _{x/s} (g biomasa/ g glicerol)	0.211	0.165	0.146	0.217	0.221
Y _{p/s} (g ácido cítrico/ g glicerol)	0.415	0.188	0.233	0.083	0.152

Datos obtenidos de las fermentaciones realizadas a 28°C y 180 rpm por una semana. La fuente de nitrógeno fue sulfato de amonio. *Representa los datos para la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de nitrógeno. ** Fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L. td, es el tiempo de generación de *Y. lipolytica* en fase exponencial. μ , es la velocidad específica media de crecimiento. Y_{x/s} es el rendimiento global de generación de biomasa en función del consumo de sustrato. Y_{p/s} es el rendimiento global de generación de producto en función del consumo de sustrato

Figura 14. Esquema del proceso de purificación de ácido cítrico realizado en las pruebas de laboratorio.



Balances de masa realizados con los datos mostrados en el Cuadro 29 en la sección de datos originales con su respectiva propagación de error en el apartado de anexos para la fermentación con mayor producción de ácido cítrico correspondiente a la fermentación 3 con una concentración inicial de 35g/L de glicerol y 0.5g/L de fuente de nitrógeno. Notación de entradas y salidas: (1) Medio final después de la fermentación a 28°C y 180 rpm por una semana. (2) Tratamientos posteriores para descarte. (3) Soluciones preparadas en el laboratorio. (4) Producto final.

Cuadro 8. Rendimientos de las fermentaciones para la producción de ácido cítrico en diferentes etapas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol y diferentes concentraciones iniciales de fuente de nitrógeno.

Rendimiento	Concentración inicial glicerol (g/L)			**Concentración inicial de fuente de nitrógeno (g/L)	
	*35	70	110	0.2	1
Fermentación, Yp/s (g ácido cítrico/ g glicerol)	0.415	0.188	0.233	0.083	0.152
⁽¹⁾ Cristalización (%)	78	90	83	81	86
⁽²⁾ Recristalización (%)	87	74	80	87	83
⁽³⁾ Recuperación global de ácido cítrico (%)	68	67	66	70	71

Rendimientos para la corrida con mayor producción de ácido cítrico en cada una de las formulaciones indicadas. Yp/s es el rendimiento global de generación de producto en función del consumo de sustrato *Representa los datos para la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de nitrógeno. **Fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L. (1) Rendimiento del proceso de cristalización representado en porcentaje. (2) Rendimiento del proceso de recristalización representado en porcentaje. (3) Rendimiento del proceso global de recuperación de ácido cítrico mostrado en la Figura 13 representado en porcentaje.

Cuadro 9. Comparación de absorbancias de espectros IR para las muestras de ácido cítrico cristalizadas de las fermentaciones realizadas.

Grupo funcional	Alcohol terciario			Ácido carboxílico		
	3500 a 3100	1400 a 1300	1200 a 1100	3300 a 2900	1750 a 1650	1300 a 1200
Rango de longitud de onda de la frecuencia (cm^{-1})						
Reactivo ácido cítrico	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1	✓	×	✓	×	✓	×
2	✓	×	✓	×	✓	×
3	✓	×	✓	×	✓	×
4	✓	×	✓	×	✓	×
5	✓	×	✓	×	✓	×

Los espectros IR obtenidos se encuentran en el apartado anexos sección J. Notación de presencia: ✓ (si se determinó la presencia de la frecuencia indicada), × (no se determinó la presencia de la frecuencia indicada). (1) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (2) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (3) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. (4) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno. (5) Fermentación realizada con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

VIII. Análisis de resultados

El estudio de la aplicación de una fuente de carbono de baja pureza en una fermentación para la generación de un producto de interés conlleva un análisis básico de las variables que puedan afectar dicho proceso. Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la variación de concentración inicial de glicerol purificado, proveniente de la planta de biodiésel de la Universidad del Valle de Guatemala, como fuente de carbono para la producción de ácido cítrico empleando la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075. La aplicación efectiva del glicerol derivado de la producción de biodiésel depende del tratamiento de purificación previo al que se someta.

La purificación parcial del glicerol crudo se llevó a cabo a escala laboratorio donde se realizó un proceso para la separación de sales, eliminación de residuos de catalizador, agua, metanol y separación de jabones, ácidos grasos y otros contaminantes; considerando que la aplicación del glicerol purificado para este trabajo es una fermentación. El tratamiento del glicerol crudo inició con la adición de ácido sulfúrico 2M para neutralizar restos del catalizador de la transesterificación (NaOH) y lograr una separación de jabones, ácidos grasos libres y sales. Las sales hacen referencia a los componentes pesados o material orgánico contenido en el aceite usado que se utiliza como materia prima para la producción de biodiésel (Cardeño, Gallego & Rios, 2011). Estas fueron eliminadas luego de reposar la muestra por varios días, donde se observó la separación de tres fases. En la Figura 41 (Ver Anexos) se muestran estas sales, con una coloración amarillenta; cabe destacar que estas sales no precipitaron por completo, sino que quedaron en suspensión entre dos fases líquidas, debido a la densidad de cada una de ellas. Esto dificultó su separación y por ello se presentó un factor de pérdidas de 74.3 ± 8.7 gramos que hace referencia a una porción líquida que no fue posible separar.

En esta etapa se obtuvo una gran cantidad de sales (1278.3 ± 5.0 g) proveniente de una muestra inicial de glicerol de 1809.3 ± 5.0 g, como puede observarse en la Figura 6 (Ver Resultados). En este caso, se recomienda realizar un proceso posterior de filtración o centrifugación de la fase de sales para poder extraer la mayor cantidad de glicerol posible que pueda quedar remanente entre estos sólidos y así maximizar el rendimiento de purificación. Dado que el objeto principal del trabajo y su alcance no se enfoca únicamente en la purificación del glicerol no se profundizó en las características e identidad de estos contaminantes denominados como sales. La separación de ácidos grasos de la fase acuosa de glicerol no se identificó en esta etapa de purificación, por lo que esta separación se realizó hasta finalizar la eliminación de otros componentes.

Con el fin de separar la mayor cantidad posible de sales presentes en el glicerol ácido, este se neutralizó con hidróxido de sodio 2M dado que por el cambio pH se presenta la precipitación de otras sales en menor cantidad, 7.4 ± 0.14 gramos como se muestra en la Figura 6. En el caso de la etapa de destilación se logró la separación de una porción de metanol y agua por un sistema de destilación simple armado en el laboratorio. La presencia de burbujas en la muestra de glicerol impuro y el reflujo en la columna comenzó a observarse a una temperatura de 50°C . En el momento de recolección de las primeras gotas de destilado se mostró en el termómetro una temperatura de 53°C , indicando la evaporación de una mezcla de metanol con otras impurezas presentes en la mezcla, dado que la temperatura de ebullición del metanol puro es a 65°C . La presencia de gotas de destilado continuas fue en un rango de temperatura de 59°C a 70°C , este goteo constante indica la evaporación de la mayor cantidad de metanol de alta pureza (Zubrick, 2014). Cabe destacar que en un sistema de destilación simple se presentan pérdidas considerables de condensado al permanecer gotas adheridas a las paredes de las piezas del kit de destilación.

Para lograr obtener un glicerol de mayor pureza, el proceso de destilación simple continuó hasta alcanzar una temperatura de 95°C en el sistema con el fin de evaporar una porción de agua. La evaporación de una cantidad de agua a esta temperatura fue posible por la presión atmosférica presentada en el laboratorio, menor a 1 atm, como se conoce que a esta presión el punto de ebullición del agua es de 100°C . En el rango de temperatura de

70°C hasta alcanzar los 90°C se presentó un goteo discontinuo de destilado indicando la eliminación de otros contaminantes que ebulen en este rango de temperaturas. Ahora bien, como lo indica la Figura 6, las pérdidas representadas en esta etapa (7.3 ± 0.3 gramos) hacen referencia al líquido remanente en las paredes de las piezas del kit de destilación y una porción del glicerol remanente en el balón que se desechó debido a la presencia de sales y cenizas.

El glicerol obtenido de la destilación simple presentó una separación de fases más definida, por lo que se procedió con una decantación empleando una ampolla de decantación. La fase inferior en la ampolla representó la fase acuosa, con presencia de glicerina, con una coloración café claro y tonos amarillentos. La fase superior que correspondió a la fase de ácidos grasos presentó una coloración café oscura como se muestra en la Figura 43 (Ver Anexos). Las pérdidas presentadas en esta etapa (14.5 ± 0.2 gramos) corresponden a la interfase entre las dos fases anteriores donde se observó la presencia de una pequeña cantidad de cenizas.

La comparación de las propiedades del glicerol purificado con el glicerol crudo y glicerina grado reactivo se muestran el Cuadro 5. Se tomaron las características de la glicerina grado reactivo como parámetro de comparación entre el glicerol crudo y el glicerol purificado. El glicerol crudo presentó la menor densidad de las tres muestras (0.9996 ± 0.0012 g/mL) dado que este se encuentra constituido en su mayoría por ácidos grasos los cuales son menos densos que el agua y por lo tanto que la glicerina. La densidad obtenida del glicerol purificado de 1.1768 ± 0.0009 g/mL presenta una densidad similar a la glicerina grado reactivo (1.2387 ± 0.0010 g/mL) indicando que la muestra de glicerol purificado contiene una baja presencia de agua, es decir, una alta pureza. En cuanto a la viscosidad, se presentó un valor de 24.16 ± 1.35 cP para la muestra de glicerol crudo, mostrando una característica más viscosa que el glicerol purificado (12.14 ± 0.26 cP), lo que podría sugerir una mayor similitud entre el glicerol crudo y la glicerina grado reactivo que presenta una viscosidad de 122.72 ± 1.10 cP. A pesar de esto, se identificó que la presencia de grasas en el glicerol crudo le provee un determinado espesor a la muestra lo cual provoca que presente una alta viscosidad. Mientras que la baja viscosidad del glicerol purificado se debe a la presencia de una pequeña cantidad de agua y otros contaminantes.

De acuerdo con la solubilidad en agua, el glicerol crudo no fue miscible, dada la alta presencia de ácidos grasos, al mezclarse con el agua se observaba claramente la separación de las fases correspondientes. A diferencia de la glicerina grado reactivo y el glicerol purificado que, si son miscibles en agua, indicando que se logró la separación completa de ácidos grasos y la eliminación de la mayor cantidad de contaminantes del glicerol. Estos resultados se confirman con la pureza alcanzada de 84.19% del glicerol final determinada por análisis HPLC.

La evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de glicerol como fuente de carbono para las fermentaciones se logró por el primer estudio del comportamiento del crecimiento celular de la levadura *Yarrowia lipolytica* CBS 2075 en los medios de cultivo. Considerando que a pesar de que esta cepa pertenece al género *Yarrowia*, no se han realizado estudios sobre la capacidad de esta cepa específica identificada como CBS2075 para crecer en un medio con glicerol crudo, y tampoco ha sido evaluada para la producción de ácido cítrico. Con los resultados de esta variación de concentración de glicerol, se eligió la formulación con la mayor producción de ácido cítrico para después poder evaluar la influencia de diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno, el cual es uno de los compuestos más importantes para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, además de compuestos como el fósforo y el magnesio. (Behera, *et al.*, 2021)

La composición completa de las formulaciones del medio de cultivo evaluado se detalla en el Cuadro 4 (Ver Metodología), donde se incluyen los componentes esenciales para el desarrollo de la levadura. En la Figura 7, se observa el comportamiento de la levadura en las 3 formulaciones con diferente concentración de glicerol, evaluadas en una fermentación por aproximadamente 100 horas, donde se identifican las fases de latencia, exponencial y estacionaria de las curvas de crecimiento, las cuales se señalan a más detalle en el apartado anexos. La fase de latencia para las tres formulaciones tomó un período aproximado de 10 horas, indicando la dificultad de la levadura para adecuarse a la composición de los tres medios de cultivo, a pesar de que se llevó a cabo una adaptación previa de la levadura de medio YPD a medio con glicerol (Ver en Metodología). Las curvas de crecimiento mostradas representan el promedio de un triplicado realizado para cada una de las formulaciones, utilizado para identificar errores en las experimentaciones realizadas bajo

las mismas condiciones de temperatura a 28°C y agitación a 180 rpm. Se realizó en triplicado dado que el interés del trabajo fue realizar una exploración sobre la influencia de las variables de concentración de sustrato y fuente de nitrógeno en la producción de ácido cítrico, por lo que al ser una fase de evaluación el objetivo era obtener un error asociado. Por ello, se muestran las barras de error asociadas que muestran la desviación estándar de cada dato en el triplicado; al no presentar una alta desviación se muestra la reproducibilidad de la experimentación por lo que no fue necesario aumentar el número de pruebas, pero se recomienda realizar más réplicas previo a evaluar un aumento en la escala de fermentación.

La fase estacionaria se alcanzó después de 30 horas con la concentración inicial de glicerol de 70g/L pero únicamente se alcanzó una concentración celular de 8.0×10^6 células/mL comenzando la fase estacionaria. Caso contrario con el crecimiento presentado en la concentración de 35 g/L donde la levadura llegó a su fase estacionaria después de las 50 horas de fermentación, pero con una concentración celular de 1.4×10^7 células/mL. Esto indica que *Y. lipolytica* logró adecuarse de mejor manera a esta última formulación. Considerando el crecimiento en el medio de cultivo con concentración inicial de 110 g/L de glicerol, se observa que la levadura no logró alcanzar por completo su fase estacionaria durante la semana en que transcurrió la fermentación. Entre las posibles causas de este comportamiento se identifica la alta concentración de fuente de carbono que pudo ocasionar un envenenamiento de una gran cantidad de las células inoculadas lo que provocó que el resto de las células que si lograron consumir adecuadamente el glicerol se multiplicarán, pero en menor cantidad alcanzando únicamente una concentración de 7.8×10^6 células/mL al final de la semana de fermentación. Estos resultados indican que la levadura logra una mejor adaptación al medio de cultivo con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L pero se logra un mayor período de la levadura en fase estacionaria con una concentración de 70 g/L. Esto es de interés dado que en estudios anteriores se ha identificado que el ácido cítrico es un metabolito que se produce en su mayoría durante esta fase en el ciclo de Krebs, la cual es una de las rutas metabólicas más importantes de todos los organismos aeróbicos para producción de energía. Sin embargo, la producción y expulsión del ácido cítrico son mecanismos separados cuyo proceso es complicado dado que varía dependiendo de los cambios metabólicos y morfológicos del microorganismo utilizado (Börekci, Kaban & Kaya, 2021).

Adicionalmente, para cada una de las evaluaciones de la producción de biomasa con diferentes concentraciones de glicerol, se evaluó la producción de ácido cítrico y el consumo de glicerol que *Y. lipolytica* presentó a diferentes tiempos de fermentación por una semana. La Figura 8, muestra el comportamiento de la levadura con una concentración inicial de glicerol de 35g/L, con ella se determinó que después de 96 horas de fermentación se logró un consumo casi total del glicerol presente en el medio alcanzando una concentración final de 4.47 ± 0.13 g/L (Ver Cuadro 6 en Resultados), indicando una adecuada asimilación de este compuesto por la levadura. Se determinó, además, que la producción de ácido cítrico alcanzó una concentración de 13.79 ± 0.10 g/L, donde se observa que su producción aumentó drásticamente cuando la levadura alcanzó su fase estacionaria después de las 48 horas de fermentación. Estos datos se representan también en el balance de masa mostrado en la Figura 15 (Ver Anexos), en ella se observa como la cantidad de glicerol disminuyó de 5.59 gramos a 0.67 gramos en un volumen de fermentación de 150 mL. Así mismo, se determinó que el consumo de 1.84 gramos de glicerol fue utilizado por la levadura para su mantenimiento celular y la generación de otros subproductos no identificados (Parker *et al.*, 2018). La generación de otros subproductos en las fermentaciones puede observarse en los ejemplos de los cromatogramas generados por el análisis HPLC en las Figuras 32 y 33 (Ver Anexos) donde puede observarse que entre los tiempos de retención de 7 a 20 minutos hay presencia de otros compuestos, que no fueron identificados en este estudio, además del ácido cítrico y del glicerol, cuyos tiempos de retención son aproximadamente en los minutos 11 y 15 respectivamente. Sin embargo, es de importancia lograr identificar cuáles son estos otros compuestos para evaluar si existe la producción de otro compuesto en mayores cantidades que el ácido cítrico.

De la misma manera, se muestra en la Figura 9, el consumo de glicerol y producción de biomasa y ácido cítrico por *Y. lipolytica* al emplearse una concentración inicial de glicerol de 70g/L. A diferencia del comportamiento de la producción de ácido cítrico en relación con la generación de biomasa con la concentración de glicerol de 35g/L, en esta fermentación se observa que la producción de ácido cítrico logró un aumento considerable cuando la levadura se encontró en su fase exponencial y se mantuvo durante la fase estacionaria. Esto pudo deberse a que después de alcanzar la fase estacionaria de

crecimiento, el metabolismo de la levadura se enfocó más en el consumo de sustrato para el mantenimiento celular y no para la producción del compuesto de interés. Sin embargo, en este caso, la concentración de ácido cítrico únicamente llegó a 5.42 ± 0.22 g/L (Ver Cuadro 6 en Resultados) y el consumo de glicerol no presentó mayores cambios, consumiéndose únicamente hasta una concentración final de 43.63 ± 1.44 g/L después de 98 horas de fermentación. La baja concentración de ácido cítrico alcanzada se debió principalmente a que el consumo de glicerol se destinó en su mayoría hacia el mantenimiento celular y la generación de subproductos como se muestra en el balance de masa de la Figura 16 con un valor de 2.69 gramos.

Por otra parte, el consumo de glicerol en la fermentación con una concentración inicial de 110 g/L (Figura 10 en Resultados) fue aún menor alcanzando una concentración final de 88.40 ± 0.31 g/L es decir un consumo de 20.30 ± 0.38 g/L (Ver Cuadro 6 en Resultados) después de la semana de fermentación. De la misma manera que el caso anterior, el bajo consumo de glicerol se debe principalmente a que la levadura no logró adaptarse a una concentración tan alta de sustrato, lo que se confirma con la concentración celular final alcanzada de aproximadamente 3.67 ± 0.70 g/L, la menor concentración celular alcanzada de todas las fermentaciones realizadas. Adicional a esto, una característica única de esta fermentación fue que la concentración de ácido cítrico tuvo un aumento rápido antes de 25 horas de fermentación y después de este tiempo la concentración se mantuvo constante en 5 g/L. En este caso en particular, la producción de ácido cítrico no estuvo relacionada con el crecimiento de la levadura y no se logró diferenciar la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento de *Y. lipolytica*. No obstante, la fermentación no se prolongó por mayor tiempo porque se observó que no hubo ninguna variación de consumo de glicerol y producción de ácido cítrico entre la hora 25 y 97 de fermentación, lo que sugiere que estos no cambiarían con mayor tiempo de fermentación.

Estos resultados demuestran que con la concentración inicial de glicerol de 35 g/L se logra la mayor producción de ácido cítrico, contrario a lo indicado en otros estudios donde se emplea levaduras de este mismo género, pero diferente cepa. En el estudio realizado por Papanikolaou y colaboradores en 2020 se identificó que el mayor consumo de glicerol se obtuvo al utilizar una concentración inicial de 100 g/L, utilizando la cepa de *Yarrowia*

lipolytica LMBF Y-46 en fermentaciones realizadas a escala laboratorio en 250mL. Sin embargo, la levadura fue capaz de asimilar adecuadamente el glicerol al utilizar una concentración de hasta 150 g/L. Adicionalmente determinaron que al pasar de experimentación en frascos Erlenmeyer a un biorreactor escala laboratorio se presentó un mayor consumo de glicerol y con esto también un cambio en el metabolismo de la levadura al producir mayores cantidades de ácido cítrico (102 g/L) que de polioles. Con estos resultados identificaron que el factor que más influye en el aumento de producción de ácido cítrico es el nivel de oxigenación, que se logra con diferentes combinaciones de aireación y agitación (Papanikolaou, 2020). De igual manera, en otro estudio llevado a cabo por Giacomobono y colaboradores en 2022, evaluaron una fermentación en biorreactor de 2 litros para determinar el efecto de la oxigenación en la producción de metabolitos. Ellos identificaron que al aumentar la agitación para lograr una mayor transferencia de masa del oxígeno disuelto se logra una mayor conversión del glicerol presente en el medio. Empleando la levadura *Yarrowia lipolytica* DSM8218 lograron un aumento en la producción de ácido cítrico alcanzando un rendimiento de hasta 0.53 g ácido cítrico/ g glicerol (Giacomobono, 2022). Esto debido a que el oxígeno es indispensable para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos, ya que con una alta tasa de aireación se incrementa la producción de ácidos orgánicos (Börekci, Kaban & Kaya, 2021). La producción de ácido cítrico es un proceso aeróbico por lo que la presencia de oxígeno es de suma importancia y se recomienda realizar estudios variando este parámetro para determinar bajo qué tasa de aireación es posible incrementar el rendimiento de producción del ácido cítrico al emplear glicerol derivado de biodiésel con la cepa de *Yarrowia lipolytica* CBS2075.

Determinando con los resultados anteriores que utilizando una concentración inicial de glicerol de 35 g/L se obtiene una mayor producción de ácido cítrico y un mejor crecimiento de la levadura, se procedió a evaluar el efecto de la variación de concentración de fuente de nitrógeno en el medio. Como puede observarse en la Figura 11, las curvas de crecimiento al variar la fuente de nitrógeno no presentan una mayor diferencia de comportamiento al mostrarse claramente las fases de latencia, exponencial y estacionaria. Si logró observarse claramente la fase de latencia durante las primeras 10 horas, indicando aún la dificultad de la levadura para adecuarse a los medios de cultivo; luego la fase

exponencial entre la hora 10 y 50 de fermentación y el comienzo de la fase estacionaria después de las 50 horas de fermentación para las tres formulaciones por igual. La diferencia que presentaron las curvas de crecimiento fue la concentración final de células alcanzada, para la formulación con una concentración inicial de fuente de nitrógeno de 1.0 g/L se alcanzó una concentración celular de 1.6×10^7 células/mL, para la concentración inicial de 0.5 g/L, 1.5×10^7 células/mL y para la concentración inicial de 0.2 g/L, 1.30×10^7 células/mL. La similitud presentada entre las curvas de crecimiento implica que la variación de nitrógeno en el medio no afecta en mayor medida al crecimiento de *Y. lipolytica*. Sin embargo, la evaluación de diferentes concentraciones de nitrógeno se realizó porque en estudios anteriores se ha determinado que la producción de ácido cítrico comienza al agotarse la fuente de nitrógeno. Esto debido a que con una deficiencia de nitrógeno en el medio, se ha observado una baja actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa, una enzima que actúa en el ciclo de Krebs convirtiendo el ácido isocítrico en alfa-cetoglutarato (Börekci, Kaban & Kaya, 2021). Si la enzima mencionada presenta baja actividad, esto conlleva a una acumulación de isocitrato dentro de la célula, por lo que se favorecerá la reacción reversible de isomerización realizada por la enzima aconitasa, transformando el isocitrato en ácido cítrico. (Koolman & Roehm, 2005)

De igual manera que se estudió la producción de ácido cítrico y el consumo de glicerol en diferentes tiempos de fermentación para las variaciones de concentración de glicerol, en las Figuras 12 y 13 se muestra el comportamiento de estas dos variables en los medios de cultivo con una concentración de fuente de nitrógeno de 1.0 g/L y 0.2 g/L respectivamente, manteniendo en ambos una concentración inicial de glicerol de 35 g/L. El comportamiento de mayor interés identificado en la Figura 12 y en el Cuadro 6 es la concentración máxima de ácido cítrico (10.90 ± 2.45 g/L) que logró alcanzarse en la hora 73 de fermentación, que se presentó al momento de agotarse casi por completo el glicerol presente en el medio y que además se presentó durante la fase estacionaria de crecimiento de la levadura en esta fermentación, confirmando de acuerdo con lo establecido en la literatura, que la mayor producción de ácido se observa durante esta fase de crecimiento. Sin embargo, la fermentación se llevó a cabo por 96 horas y debido a que la fuente de carbono en el medio estaba agotada, la levadura optó por consumir el ácido cítrico presente en el medio para su

mantenimiento celular, por lo que la concentración final de ácido cítrico en esta fermentación presentó un valor de 5.10 ± 0.04 g/L.

Al comparar la diferencia de comportamiento de la levadura en las Figuras 8 y 12, se determinó que un aumento en la concentración de nitrógeno en el medio favorece un mayor consumo de glicerol y una producción más acelerada de ácido cítrico. Por lo tanto, se determina que, si se requiere una alta producción de ácido cítrico con menor tiempo de fermentación, la formulación del medio de cultivo a utilizar debe ser de 35g/L de glicerol y 1.0 g/L de fuente de nitrógeno. Sin embargo, dado que el estudio se realizó por una semana por igual para todas las fermentaciones y la mayor concentración de ácido cítrico obtenida después de esta semana fue de 13.73 g/L (Ver Cuadro 6), se determina que la mejor formulación fue de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno. El balance de masa de esta fermentación presentado en la Figura 18, muestra que se obtuvieron 0.765 gramos de ácido cítrico y 3.17 gramos para la generación de subproductos y mantenimiento celular en un volumen de fermentación de 150 mL que, como se indicó anteriormente, provienen de consumo total del glicerol y el consumo secundario del ácido cítrico que había en el medio.

Adicionalmente, para una mejor comparación del crecimiento de la levadura en las diferentes formulaciones se estudiaron los parámetros de crecimiento de tiempo de generación y velocidad específica de crecimiento; así como los rendimientos de producción de biomasa y ácido cítrico en relación con el consumo de glicerol para cada una de las fermentaciones mostradas en el Cuadro 7. El estudio del tiempo de generación y velocidad de crecimiento es importante para realizar estudios más detallados del crecimiento de la levadura bajo diferentes formulaciones en el medio de cultivo. Además, la velocidad específica de crecimiento es un indicador de la afinidad que el microorganismo presenta hacia el sustrato, es decir entre mayor sea la velocidad de crecimiento, mayor será el consumo de sustrato. (Lee, 2009)

En el Cuadro 7, se muestra la comparación de estos parámetros para las fermentaciones realizadas, se determinó que para la fermentación con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1.0 g/L de fuente de nitrógeno, se obtuvo la mayor velocidad específica media de crecimiento. Esto indica que la levadura presentó una mejor asimilación del sustrato en

su fase exponencial, lo que se confirma con el tiempo de generación obtenido de 12.0 horas, el menor de todas las fermentaciones realizadas. Asimismo, se puede observar que se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento para la fermentación con 0.2g/L de nitrógeno de 0.054 hora^{-1} que la fermentación con 0.5 g/L de nitrógeno de 0.048 hora^{-1} . Esto se debe a que, como se muestra en la Figura 11, el comportamiento del crecimiento de la levadura con estas concentraciones de nitrógeno en las primeras 25 horas presentó altas similitudes, indicando que la levadura se adecuó de igual manera a ambos medios en este período de tiempo. Luego de 35 horas de fermentación, se observa en el medio con 0.2 g/L de nitrógeno que la levadura comenzó su fase estacionaria con una menor concentración celular. Esta similitud de las curvas de crecimiento en la fase exponencial, pero alcanzando una diferente concentración celular al comenzar la fase estacionaria ocasiona que en la formulación con 0.2 g/L se obtenga una mayor tasa de crecimiento que en la formulación con 0.5 g/L de nitrógeno.

Considerando estos parámetros para las otras formulaciones con variación de concentración de glicerol, se observa que para la formulación con 110g/L, se obtuvo la menor velocidad de crecimiento y el mayor tiempo de generación, indicando que la levadura presentó una baja afinidad por el sustrato en su fase exponencial. Para este caso, como se muestra en la Figura 7, no se observa de manera definida en qué momento la levadura alcanza su fase estacionaria, confirmando la baja afinidad al glicerol que se menciona. Sin embargo, se observa que el crecimiento de la levadura en las formulaciones con 35 g/L y 70 g/L de glicerol tuvo una similar velocidad de crecimiento y tiempo de generación indicando que logró adecuarse correctamente a ambos medios en su fase exponencial. La diferencia se observa con el rendimiento global de gramos de biomasa producidos por gramos de glicerol consumido (Y_x/s), utilizando 35g/L este rendimiento presentó un valor de 0.211 (m/m), mientras que para las fermentaciones de 70g/L y 110g/L, se obtuvieron valores menores de 0.165 (m/m) y 0.146 (m/m) respectivamente, indicando que la mayor concentración celular se alcanzó con la formulación de 35 g/L.

De igual manera, se observa con el rendimiento de gramos de ácido cítrico producidos por gramos de glicerol consumido (Y_p/s), donde se obtuvo un valor de 0.415 (m/m) para la fermentación de 35 g/L, el mayor rendimiento obtenido para todas las fermentaciones

realizadas donde se evaluaron diferentes concentraciones de glicerol y fuente de nitrógeno. Cabe mencionar, que el sistema de transporte activo malato-ácido cítrico representado en la Figura 4 (Ver Marco Teórico) encargado de la secreción del ácido cítrico al exterior de la célula es influenciado por factores como saturación de oxígeno, pH, temperatura y composición del medio del cultivo (Giacomobono *et al.*, 2022). Por lo tanto, se puede considerar que bajo las condiciones establecidas en este estudio no todo el ácido cítrico producido fue secretado extracelularmente, por lo que habría de considerar un método de lisis celular previo a la purificación de este compuesto o bien, un cambio en las condiciones de fermentación que favorezcan la actividad de este sistema de transporte. Es importante destacar que este es el primer estudio de producción de ácido cítrico para la cepa *Yarrowia lipolytica* CBS2075, por lo que se considera que el rendimiento de 0.415 (m/m) es un resultado prometedor para el estudio de variación en la formulación del medio de cultivo o variación de condiciones (pH, temperatura u oxígeno) para la generación de este compuesto.

Con estos estudios a escala laboratorio se llega a establecer la fase experimental inicial de producción de ácido cítrico donde se puede determinar el pH, la temperatura y la agitación que maximicen su producción. Los resultados obtenidos de estas variaciones se pueden utilizar para realizar un estudio más detallado de esta producción con el objetivo de alcanzar una escala industrial. Para ello, primero se deben realizar estudios cinéticos en un reactor a pequeña escala que provean información sobre el comportamiento de la levadura evaluando principalmente variaciones de saturación de oxígeno y así determinar las condiciones que generen el mejor rendimiento. Con estos parámetros estudiados es posible obtener información más detallada y concreta que puede ser utilizada para la predicción de la producción de ácido cítrico en un reactor a una mayor escala. Esto debido a que para poder llevar a cabo un proceso a escala industrial es necesario ir aumentando la escala de la fermentación progresivamente. En estos estudios cinéticos se debe identificar claramente el modelo que más se ajuste al comportamiento observado en las fermentaciones, analizando los parámetros de interés. Un estudio más detallado se puede realizar utilizando un software como Berkeley Madonna, el cual permite ajustar las curvas y evaluar otros escenarios al aplicar controles deslizantes de distintos parámetros para evaluar la influencia de su variación más fácilmente.

El proceso de extracción del ácido cítrico realizado conlleva el uso de una solución concentrada de óxido de calcio o cal y un tratamiento posterior con ácido sulfúrico. Para realizar la purificación aplicando este método primero se debía separar la biomasa generada en la fermentación por centrifugación. Cabe destacar que el sedimento obtenido de la centrifugación se encontraba constituido por células vivas y muertas de levadura. En la Figura 14 se muestra el esquema del proceso de extracción de ácido cítrico realizado, se observa que en el proceso de centrifugación se identificó un valor de pérdidas, las cuales hacen referencia al líquido remanente en las paredes de los tubos para la centrífuga y la humedad contenida en el sedimento posterior a la centrifugación.

El líquido post fermentativo recuperado de la centrifugación fue tratado con una solución de cal al 30% (p/v), también denominada lechada de cal. Esto con el objetivo de precipitar el ácido cítrico presente en el líquido en forma de citrato de calcio. Para asegurar que la mayor parte del ácido cítrico pueda ser extraído, la adición de cal debía ser de una forma lenta y bajo agitación constante para promover la formación del precipitado, dado que de agregarse rápidamente el óxido de calcio no reaccionaría adecuadamente con el ácido cítrico como se muestra en la ecuación 1 en anexos (Rivada, 2008). Este proceso de precipitación seguido por una filtración utilizando un Kitasato y un embudo büchner presentó también un factor de pérdidas con un valor de 0.037 gramos, estas hacen referencia a una pequeña cantidad de óxido de calcio que no pudo ser retenido por los poros del papel filtro utilizado. La cantidad de citrato de calcio y residuos de cal sin reaccionar al final de la filtración representan valores estimados en la Figura 14 (Ver Resultados) determinados a partir de las relaciones molares presentadas en la ecuación 1.

El sólido de citrato de calcio recuperado fue tratado con una solución de ácido sulfúrico 2M llevando a cabo la reacción representada en la ecuación 2 mostrada en anexos. De esta manera, el citrato de calcio generado anteriormente reaccionó con el ácido sulfúrico para generar un nuevo precipitado de sulfato de calcio dejando libre en solución el ácido cítrico para poder realizar su posterior cristalización (Rivada, 2008). Durante la acidificación se aseguró que la mayor cantidad del sólido compuesto de citrato de calcio y cal entrara en contacto con el ácido, dado que después del secado de este sólido se presentaron sólidos de gran tamaño que se disolvieron con la ayuda de una varilla de vidrio. En este paso

también fue necesario agregar lentamente y bajo agitación el ácido sulfúrico para asegurar una buena formación del nuevo precipitado y dilución del sólido previamente mencionado.

La cristalización del ácido cítrico consistió en evaporar la mayor cantidad de agua presente en el líquido filtrado para concentrar el ácido cítrico en la solución y poder realizar su posterior filtración. Se observó que conforme se evaporó la mayor cantidad de agua, se observaban pequeños cristales en la solución como se muestra en la Figura 49 (Ver Anexos), esta se dejó enfriar a temperatura ambiente para fomentar la generación de cristales, los cuales se separaron del líquido restante por una filtración. Sin embargo, los cristales obtenidos de esta filtración, representados únicamente como ácido cítrico en el esquema de la Figura 14, se encontraban constituidos además por restos de óxido de calcio, sulfato de calcio y otros contaminantes presentes durante el proceso de purificación. Por ello, se realizó una recrystalización utilizando agua como solvente para eliminar la mayor cantidad de estos componentes. Con la recrystalización se logró eliminar una pequeña cantidad de los contaminantes, pero se aseguró que los cristales filtrados eran en su mayoría ácido cítrico de mayor pureza.

Los rendimientos obtenidos de este último proceso de purificación del ácido cítrico para la mejor fermentación de los triplicados realizados por cada formulación de medio de cultivo se muestran en el Cuadro 8. Se determinó con el rendimiento de generación de producto con relación al consumo de sustrato (Y_p/s), que la mayor producción de ácido cítrico se logró con la formulación de 35g/L de glicerol y 0.5 g/L de nitrógeno presentando un valor de 0.415 (m/m). Además, se determinó que los rendimientos globales para el proceso de extracción y purificación del ácido cítrico se encuentran en un rango de 66% a 71%, indicando que si hay pérdidas significativas de producto durante este proceso empleando el método cal – ácido sulfúrico. Por ello, es importante considerar otro método de purificación de ácido cítrico a partir de un medio líquido como una extracción con solventes o un un tratamiento para remoción de impurezas como el uso de carbón activado o columnas de intercambio iónico (Behera, *et al.*, 2021). Además, se muestra que el rendimiento del proceso de cristalización se encuentra en un rango de 78% a 90% y para el proceso de recrystalización se encuentra en un rango de 74% a 87%, indicando las pérdidas del producto durante estos proceso.

La identificación del ácido cítrico recuperado por el método cal – ácido sulfúrico se realizó empleando el análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR) comparándolo con el espectro de ácido cítrico grado reactivo, un resumen del análisis de los espectros obtenidos se muestran en el Cuadro 9. El principal constituyente de una molécula de ácido cítrico es la presencia de tres grupos carboxilo (Figura 5 en Marco Teórico), este grupo funcional presenta picos de frecuencia por análisis FTIR en los rangos de longitud de onda de 3300 a 2900 cm^{-1} (con intensidad media), de 1750 a 1650 cm^{-1} y de 1300 a 1200 cm^{-1} , estos últimos rangos con alta intensidad. Adicional a las muestras analizadas de las fermentaciones realizadas, se analizó una muestra de ácido cítrico grado reactivo. La muestra analizada del reactivo (Figura 34 en Anexos) presentó el pico característico del grupo carboxilo en la región de 1750 a 1650 cm^{-1} con alta intensidad y en las regiones de 1300 a 1200 cm^{-1} y de 3300 a 2900 cm^{-1} con intensidad media, lo que indica la presencia de grupos carboxilo en la molécula. Ahora bien, los productos obtenidos para las fermentaciones identificadas como 1, 2, 3, 4 y 5 en el Cuadro 9, presentaron únicamente una frecuencia de intensidad baja en la región de 1750 a 1650 cm^{-1} (Ver Figuras 35 a 39 en Anexos), indicando una presencia débil de grupos carboxilo en las muestras analizadas. Al no presentarse la presencia de este grupo funcional más importante de una molécula de ácido cítrico en las muestras recuperadas, se infiere que el proceso de purificación empleado puede presentar inconvenientes, como el aumento de temperatura para la evaporación del agua, alterando la lectura adecuada de los grupos funcionales por FTIR.

El otro grupo funcional de interés que puede identificarse por FTIR es la presencia de un alcohol terciario, el cual se presenta cuando un grupo hidroxilo está enlazado con un carbono terciario, es decir un carbono unido a tres grupos alquilo (Figura 5 en Marco Teórico). Las frecuencias características de un alcohol terciario se encuentran en los rangos de longitud de onda siguientes: de 3500 a 3100 cm^{-1} , de 1400 a 1300 cm^{-1} y de 1200 a 1100 cm^{-1} . El ácido cítrico grado reactivo presentó una frecuencia baja, media y alta en los rangos anteriormente mencionados respectivamente (Ver Figura 34 en anexos). Por ello, el rango de mayor interés a analizar en las muestras recuperadas de las fermentaciones fue el rango de 1200 a 1100 cm^{-1} . Para este grupo funcional, las muestras de las fermentaciones identificadas como 1, 2, 3, 4 y 5 si presentaron una frecuencia de intensidad

alta (Ver Figuras 35 a 39 en Anexos), indicando la presencia de un alcohol terciario en el sólido purificado de las fermentaciones.

La presencia de las frecuencias en uno de los rangos para el grupo funcional de alcohol terciario y ácido carboxílico en las muestras analizadas, confirman que el producto purificado si presenta los grupos funcionales de una molécula de ácido cítrico. Pero la intensidad de estas frecuencias indica que el producto no se encuentra a una alta pureza como el ácido cítrico grado reactivo. Esto se puede deber a la sensibilidad del equipo FTIR, por lo que se recomienda realizar la identificación del producto final por medio de otros análisis.

Otra de las fuentes de error en esta purificación se debe a la naturaleza del material utilizado inicialmente para las fermentaciones, es decir, el glicerol derivado del proceso de biodiésel. Dado que este compuesto presenta diferentes contaminantes que, si bien, se logró una purificación parcial, aún se presentaban contaminantes en pequeñas cantidades que interfirieron en la pureza final del ácido cítrico generado en las fermentaciones. Por ello, se puede optar por eliminar estas impurezas residuales utilizando carbón activado o columnas de intercambio iónico previo a las fermentaciones o previo al proceso de cristalización. (Rivada, 2008)

Se debe considerar también, el proceso de purificación del ácido cítrico realizado, el cual presenta diferentes limitantes (como el control de la temperatura), por lo que se debe considerar ejecutar y evaluar otro proceso de extracción y purificación de ácido cítrico proveniente de una fermentación como la extracción con solventes. Entre los solventes que pueden utilizarse se encuentran diferentes cetonas, ésteres, éteres o compuestos organofosforados (Behera, *et al.*, 2021). También se pueden evaluar diferentes técnicas de lisis celular previo a la purificación para determinar si todo el ácido cítrico producido por la levadura es excretado o se almacena una cantidad intracelular. Con estas recomendaciones se espera que en estudios posteriores se logre identificar adecuadamente un ácido cítrico de mayor pureza.

IX. Conclusiones

1. Se obtuvo glicerol con una pureza de 84.19%, miscible en agua con una densidad de 1.1768 ± 0.0009 g/mL y una viscosidad de 12.14 ± 0.26 cP, al lograr una separación completa de los ácidos grasos y otros contaminantes, del glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel del Laboratorio de Operaciones Unitarias
2. La formulación de medio de cultivo con la que se presentó la mayor producción de ácido cítrico (13.73 ± 0.17 g/L) realizando la fermentación por una semana, fue utilizando una concentración inicial de glicerol de 35g/L y una concentración inicial de fuente de nitrógeno de 0.5 g/L; presentando rendimientos de biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) de 0.211 (m/m) y de producto con respecto a sustrato ($Y_{p/s}$) de 0.415 (m/m) consumiendo casi por completo todo el glicerol presente en el medio.
3. El análisis de los espectros obtenidos por FTIR del producto cristalizado obtenido a partir de las fermentaciones realizadas muestran frecuencias en el rango de longitud de onda de 1200 a 1100 cm^{-1} para un alcohol terciario y en el rango de 1750 a 1650 cm^{-1} para un ácido carboxílico. Esto demuestra que el producto obtenido si contiene los grupos funcionales característicos del ácido cítrico; sin embargo, el análisis de las bandas obtenidas muestra que el producto obtenido de las fermentaciones presenta diferencias respecto al ácido cítrico grado reactivo dadas las limitaciones del proceso de extracción y purificación realizado.

X. Recomendaciones

1. Evaluar llevar a cabo una filtración o centrifugación a la fase de sales extraída posterior a la adición de ácido sulfúrico en el proceso de purificación del glicerol crudo para maximizar la recuperación de la fase líquida de glicerol.
2. Delimitar las características finales del glicerol purificado para poder realizar una comparación de su empleo como fuente de carbono en el estudio de variación de condiciones en las fermentaciones, con el objeto de utilizar glicerol purificado con mínimas variaciones en su composición.
3. Evaluar el efecto de diferentes flujos de aire, regulación de pH y agitación durante las fermentaciones para observar su efecto en los rendimientos de producción de ácido cítrico, así como su influencia en el aumento o disminución de la concentración celular.
4. Evaluar diferentes concentraciones de magnesio y fósforo en el medio de fermentación para la producción de ácido cítrico. Con el fin de determinar si una variación de estos componentes puede incrementar los rendimientos de producción de ácido cítrico y sus efectos en el crecimiento de la levadura.
5. Estudiar la producción de otros compuestos de valor agregado, como eritritol, arabitol, manitol o ácido succínico utilizando glicerol como principal fuente de carbono y empleando *Yarrowia lipolytica*; evaluando diferentes concentraciones de sustrato con el objetivo de analizar los rendimientos de producción.

6. Emplear una cepa de *Yarrowia lipolytica* con modificaciones genéticas en su metabolismo por técnicas empleando mutágenos físicos, químicos o el sistema CRISPR/Cas9 para la delección o regulación de genes codificantes para las enzimas involucradas en la producción de ácido cítrico.

7. Realizar un estudio cinético de la levadura con el medio de cultivo establecido para escalar el proceso de producción de ácido cítrico manteniendo la formulación y las condiciones de pH, oxígeno, agitación y temperatura que garanticen maximizar el rendimiento de producción.

8. Investigar diferentes metodologías de extracción y purificación de ácido cítrico a partir de un medio líquido, como la extracción con solventes, para determinar los rendimientos de purificación. Evaluar dicha purificación aplicando técnicas de lisis celular para determinar si todo el ácido cítrico producido por la levadura es excretado o se almacena una cantidad intracelular.

XI. Bibliografía

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R., & Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, 63, 138-148.
- Alcoser, M. A., Salazar, K.G., Rdríguez, A.A. & Brito H.L. (2021). Evaluación del proceso de producción de ácido cítrico por fermentación con el uso de *Aspergillus niger*. *Dominio de las Ciencias*. 7(3). 1136-1158.
- Behera, B. C., Mishra, R., & Mohapatra, S. (2021). Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1), 62-76.
- Börekçi, B. S., Kaban, G., & Kaya, M. (2021). Citric acid production of yeasts: an overview. *The EuroBiotech Journal*, 5(2), 79-91.
- Cardeño, F., Gallego, L. J., & Rios, L. A. (2011). Refinación de la fase glicerina del biodiésel de aceite de palma empleando ácidos minerales. *Información tecnológica*, 22(6), 15-24.
- EMR (2021). Recuperado el 12 de agosto de 2022, de EMR: <https://www.expertmarketresearch.com/reports/citric-acid-market>
- Ferrero, A. J., Rosa, I. M., & Veneciano, E. (2010). Proceso de purificación de la glicerina obtenida del biodiésel a pequeña escala. *Centro de Investigación en Tecnología Lactocárnica*. Universidad Tecnológica Nacional/ Facultad Regional Villa Maria, Argentina.

- Giacomobono, R., Albergo, R., Valerio, V., Caporusso, A., & De Bari, I. (2022). Modelling of the Citric Acid Production from Crude Glycerol by Wild-Type *Yarrowia lipolytica* DSM 8218 Using Response Surface Methodology (RSM). *Life*, 12(5), 621.
- Guadalupe-Alcoser, M. A., Salazar-Llangarí, K. G., Rodríguez-Pinos, A. A., & Brito-Moína, H. L. (2021). Evaluación del proceso de producción de ácido cítrico por fermentación con el uso de *Aspergillus niger*. *Dominio de las Ciencias*, 7(3), 1136-1158.
- Koolman, J., Roehm, K.H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. 2da. Edición. Alemania. Georg Thieme Verlag.
- Lee, J. (2009). *Biochemical Engineering*. (1era. ed.). Washington State University.
- Maldonado, O.A., Zambrano, G., de León, L.R., Hernández & J.A., Rólz, C. (2013). *Evaluación de la producción microbiana de aceites a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiésel*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Mora, J. A. H., Páez, J. C. A., Rentería, C. F. V., & Rivera, F. R. P. (2015). Evaluación de rutas alternativas de aprovechamiento de la glicerina obtenida en la producción de biodiésel: una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 33(1), 126-148.
- Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Blanchard, F., Lambrinea, E., Chevalot, I., Stoforos, N. G., & Rondags, E. (2020). Physiological characterization of a novel wild-type *Yarrowia lipolytica* strain grown on glycerol: effects of cultivation conditions and mode on polyols and citric acid production. *Applied Sciences*, 10(20), 7373.
- Parker, N., Schneegurt, M., Thi Tu, A., Forster, B., y Lister, P. (2018). *Microbiology*. USA: OpenStax.
- Rakicka, M., Kieroń, A., Hapeta, P., Neuvéglise, C., & Lazar, Z. (2016). Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass and Bioenergy*, 92, 48-54.

- Rakicka-Pustułka, M., Miedzianka, J., Jama, D., Kawalec, S., Liman, K., Janek, T., ... & Lazar, Z. (2021). High value-added products derived from crude glycerol via microbial fermentation using *Yarrowia* clade yeast. *Microbial cell factories*, 20(1), 1-18.
- Reyes, C., López, L., Rubí, H., & Ramírez, O. (2013). Desarrollo de un bioproceso industrial de la producción de ácido cítrico por *aspergillus niger*. *Cuerpos Académicos*.
- Rivada Nuñez, J. (2008). *Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha*. Universidad de Cádiz.
- Türker, M. (2014). Yeast biotechnology: Diversity and applications. In *Proceedings of 27th VH Yeast Conference* (pp. 1-26).
- Usme, J.D. (2020). *Alternativas de aprovechamiento del glicerol*. Universidad Nacional de Colombia.
- Zakaria, Z. Y., Jusoh, M., Kader, S. S., & Idris, S. S. (2021). Challenges & Opportunities on Catalytic Conversion of Glycerol to Value Added Chemicals. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 16(3), 525-547.
- Zubrick, J. (2014). *The organic Chem Lab Survival Manual*. Hudson Valley Community College. John Wiley & Sons.

XII. Anexos

A. Datos originales

Cuadro 10. Peso de Beaker para la recolección y acidificación de glicerol crudo.

Material	Peso
Beaker 2L (± 0.1 g)	470.7
Beaker 2L con glicerol crudo (± 5 g)	2280
Beaker 2L con glicerol y ácido sulfúrico (± 5 g)	2460

La muestra de glicerol crudo se obtuvo en abril de la planta piloto de producción de biodiésel en el Laboratorio de Operaciones Unitarias. Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 11. Acidificación del glicerol crudo con ácido sulfúrico 2M.

Ácido sulfúrico (± 0.05 mL)	pH (± 0.01)
0	10.45
50	8.35
25	7.23
25	6.74
20	6.54
30	5.93

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 12. Pesos de material utilizado para la separación de sales de la purificación de glicerol.

Material	Peso (± 0.1 g)
Beaker 1L	297.0
Beaker 1L con sales	1,315.1
Beaker 250mL	96.4
Beaker 250mL con sales	356.6
Beaker 1L	461.1
Beaker 1L con glicerol	1097.8

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 13. Neutralización del glicerol con hidróxido de sodio 1M.

Hidróxido de sodio (± 0.05 mL)	pH (± 0.01)
0	6.21
20	6.57
25	7.19

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 14. Pesos de material utilizado para la determinación de cantidad de agua y metanol separados por destilación simple en el proceso de purificación de glicerol.

Material	Peso (± 0.1 g)
Beaker 500mL	202.6
Beaker 500 mL con metanol y agua destilados	362.3
Beaker 400mL	137.1
Beaker 400 mL con glicerol purificado	704.6

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 15 Pesos de material utilizado para la decantación de la purificación de glicerol.

Material	Peso (± 0.1 g)
Beaker 500mL	229.1
Beaker 500 mL con fase inferior (acuosa)	645.7
Beaker 250mL	175
Beaker 250 mL con fase intermedia	189.5
Beaker 400 mL	202.6
Beaker 400 mL con fase superior (oleosa)	399.7

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 16. Datos para determinación de densidad de las muestras de glicerina utilizando un picnómetro.

Material	Peso (± 0.0001 g)		
	1	2	3
Picnómetro	34.8395	34.8402	34.8398
Picnómetro con agua destilada	58.7661	58.7686	58.7741
Picnómetro con glicerina grado reactivo	65.0398	65.0084	64.9929
Picnómetro con glicerol crudo	59.2259	59.1714	59.1765
Picnómetro con glicerol purificado	63.5130	63.5236	63.4834

Datos obtenidos a 23°C de temperatura y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando un picnómetro con volumen de 24.36 mL.

Cuadro 17. Datos para determinación de viscosidad de las muestras de glicerina utilizando el viscosímetro.

Material	Temperatura (°C)	Tiempo (± 0.08 s)		
		1	2	3
Glicerina	50	1025.18	1041.94	1040.50
Glicerol crudo	50	236.49	262.52	259.10
*Glicerol purificado	50	997.82	962.32	999.48

Tiempos obtenidos utilizando un baño térmico a 50°C y un viscosímetro Cannon-Fenske con una constante de 0.09565 cSt/s. *En el caso del glicerol purificado se utilizó un viscosímetro de Ostwald con una constante de 0.01046 cSt/s.

Cuadro 18. Conteo de células de *Yarrowia lipolytica* y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol.

Fermentación		1	2	3
Tiempo (± 0.1 h)	Factor de dilución	Células		
0	2	572	565	577
4	2	777	703	716
9	2	758	751	689
26	20	173	176	146
32	20	271	289	323
48	200	535	470	597
54	200	596	543	617
73	200	619	627	600
80	200	623	651	590
96	200	629	640	589

El número de células representa el número total de células en los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). La concentración final en células/mL se encuentra en datos calculados tomando en cuenta el factor de dilución indicado anteriormente. La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana.

Cuadro 19. Conteo de células de *Yarrowia lipolytica* y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 70 g/L de glicerol.

Fermentación		1	2	3
Tiempo (± 0.1 h)	Factor de dilución	Células		
0	2	556	561	566
5	2	613	643	559
9	2	754	597	641
23	20	267	266	318
31	20	366	346	345
49	20	407	381	427
55	20	432	391	396
74	20	470	408	438
79	20	424	434	449
98	20	433	402	464

El número de células representa el número total de células en los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). La concentración final en células/mL se encuentra en datos calculados tomando en cuenta el factor de dilución indicado anteriormente. La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana.

Cuadro 20. Conteo de células de *Yarrowia lipolytica* y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 110 g/L de glicerol.

Fermentación		1	2	3
Tiempo (± 0.1 h)	Factor de dilución	Células		
0	2	556	573	564
3	2	488	601	549
9	2	560	678	660
25	20	85	147	152
32	20	100	161	202
48	20	139	217	267
57	20	173	226	272
73	20	230	265	315
80	20	265	271	299
97	20	296	270	326

El número de células representa el número total de células en los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). La concentración final en células/mL se encuentra en datos calculados tomando en cuenta el factor de dilución indicado anteriormente. La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana.

Cuadro 21. Conteo de células de *Yarrowia lipolytica* y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación		1	2	3
Tiempo (\pm 0.1 h)	Factor de dilución	Células		
0	2	561	557	562
4	2	741	563	614
9	2	827	848	840
26	20	275	254	286
32	20	431	414	429
48	20	568	628	581
54	20	612	647	634
73	20	640	643	651
80	20	647	662	630
96	20	652	665	657

El número de células representa el número total de células en los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). La concentración final en células/mL se encuentra en datos calculados tomando en cuenta el factor de dilución indicado anteriormente. La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana.

Cuadro 22. Conteo de células de *Yarrowia lipolytica* y tiempos de fermentación para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación		1	2	3
Tiempo (\pm 0.1 h)	Factor de dilución	Células		
0	2	567	560	552
4	2	775	631	543
9	2	755	792	629
26	20	194	153	163
32	20	328	266	284
48	20	477	342	388
54	20	508	479	479
73	20	535	512	503
80	20	524	547	509
96	20	527	541	528

El número de células representa el número total de células en los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). La concentración final en células/mL se encuentra en datos calculados tomando en cuenta el factor de dilución indicado anteriormente. La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana.

Cuadro 23. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	1		2		3	
	Concentración (± 0.001 %m/v)					
Tiempo (h)	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico
0	3.752	0.013	3.713	0.015	3.713	0.012
26	3.227	0.588	3.202	0.595	3.193	0.588
32	3.178	0.588	3.177	0.619	3.104	0.572
48	2.961	0.604	1.357	1.407	1.345	1.384
54	1.338	1.386	1.288	1.384	1.238	1.367
73	0.709	1.357	0.558	1.330	0.467	1.389
96	0.456	1.387	0.453	1.354	0.432	1.379

La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana. Los datos se determinaron con análisis por cromatografía líquida.

Cuadro 24. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	1		2		3	
	Concentración (± 0.001 %m/v)					
Tiempo (h)	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico
0	7.160	0.015	7.160	0.017	7.123	0.019
9	7.100	0.018	7.092	0.021	7.122	0.019
23	6.167	0.530	6.124	0.467	7.079	0.021
31	6.082	0.514	6.079	0.514	6.238	0.550
49	4.579	0.562	4.470	0.541	6.063	0.514
74	4.456	0.526	4.455	0.528	4.462	0.545
98	4.451	0.526	4.442	0.532	4.197	0.567

La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana. Los datos se determinaron con análisis por cromatografía líquida.

Cuadro 25. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	1		2		3	
	Concentración (± 0.001 %m/v)					
Tiempo (h)	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico
0	10.887	0.036	10.877	0.040	10.845	0.041
9	10.775	0.037	10.760	0.034	10.728	0.041
25	9.240	0.540	9.143	0.536	9.196	0.546
32	9.029	0.513	9.108	0.522	9.014	0.567
48	9.000	0.560	8.979	0.560	8.952	0.555
57	8.999	0.559	8.974	0.561	8.871	0.548
73	8.839	0.521	8.854	0.522	8.814	0.544
97	8.819	0.519	8.826	0.513	8.876	0.506

La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana. Los datos se determinaron con análisis por cromatografía líquida.

Cuadro 26. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	1		2		3	
	Concentración (± 0.001 %m/v)					
Tiempo (h)	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico
0	3.039	0	3.985	0	3.559	0
26	2.902	0	1.023	0.172	2.331	0.800
32	1.249	0.374	0.809	0.125	0.741	0.128
48	1.443	0.435	0.565	0.191	0.700	0.115
54	0.550	0.837	0.589	0.427	0.653	0.168
73	0	1.327	0	1.106	0.550	0.837
96	0	0.507	0	0.509	0.487	0.515

La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana. Los datos se determinaron con análisis por cromatografía líquida.

Cuadro 27. Concentración de glicerol y ácido cítrico para las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	1		2		3	
	Concentración (± 0.001 %m/v)					
Tiempo (h)	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico	Glicerol	Ácido cítrico
0	3.202	0	3.210	0.056	3.911	0
26	3.168	0.048	3.050	0.110	3.185	0
32	3.083	0.078	2.931	0.165	2.960	0.123
48	2.574	0.198	2.060	0.213	2.124	0.188
54	1.919	0.208	1.112	0.178	1.108	0.171
73	0.830	0.163	0.833	0.153	0.916	0.191
96	0.755	0.215	0.744	0.285	0.716	0.228

La fermentación se llevó a cabo a 28°C y 180 rpm por una semana. Los datos se determinaron con análisis por cromatografía líquida.

Cuadro 28. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de nitrógeno.

Fermentación	Pesos (\pm 0.001g)		
	Tubo Falcon	Tubo Falcon con medio fermentado	Tubo Falcon con biomasa seca
1	12.449	38.768	12.841
	12.546	41.551	12.752
	12.718	41.839	13.048
	12.579	39.793	12.815
2	12.441	46.674	12.740
	12.663	44.135	12.957
	12.637	46.441	12.932
	12.697	45.640	12.994
3	12.558	38.917	12.798
	13.284	38.606	13.555
	12.529	44.318	12.843
	12.433	44.082	12.697

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 29. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 250 mL (\pm 0.1 g)	111.3	124.7	122.7
Beaker 250 mL con medio fermentado (\pm 0.1g)	220.8	254.8	235.8

Continuación Cuadro 29.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 150 mL con cal (± 0.1 g)	226.4	258.1	237.8
Filtro 1 (± 0.001 g)	0.410	0.924	0.463
Filtro 1 con cal y citrato (± 0.001 g)	4.116	2.098	0.858
Beaker 150 mL (± 0.1 g)	110.8	135.2	62.5
Beaker 150 mL con cal y citrato (± 0.1 g)	113.2	136.1	62.9
Beaker 150 mL con ácido sulfúrico (± 0.1 g)	123.1	144.6	103.2
Filtro 2 (± 0.001 g)	0.847	0.933	0.451
Filtro 2 con sulfato de calcio (± 0.001 g)	2.774	1.607	0.753
Filtro 3 (± 0.001 g)	0.712	0.938	0.466
Filtro 3 con ácido cítrico (± 0.001 g)	2.080	2.437	1.891
Filtro 4 (± 0.001 g)	0.838	0.929	0.452
Filtro 4 con ácido cítrico recristalizado (± 0.001 g)	1.959	2.131	1.694

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 30. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L.

Fermentación	Pesos (± 0.001 g)		
	Tubo Falcon	Tubo Falcon con medio fermentado	Tubo Falcon con biomasa seca
1	13.053	44.930	13.248
	12.551	36.146	12.703
	12.634	36.525	12.837
	13.323	42.812	13.573
2	13.010	43.978	13.172
	12.543	45.089	12.743
	12.534	45.077	12.745
	12.534	45.135	12.705
3	12.570	36.163	12.766
	13.555	47.899	13.805
	13.356	35.197	13.504
	13.012	47.347	13.277

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 31. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 70 g/L.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 250 mL (± 0.1 g)	108.7	135.2	121.3
Beaker 250 mL con medio fermentado (± 0.1 g)	215.9	262.0	233.2

Continuación Cuadro 31.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 150 mL con cal (± 0.1 g)	223.5	265.7	237.5
Filtro 1 (± 0.001 g)	0.416	0.931	0.468
Filtro 1 con cal y citrato (± 0.001 g)	10.441	1.999	1.422
Beaker 150 mL (± 0.1 g)	108.3	73.6	77.3
Beaker 150 mL con cal y citrato (± 0.1 g)	113.7	74.4	78.1
Beaker 150 mL con ácido sulfúrico (± 0.1 g)	127.6	86.0	131.5
Filtro 2 (± 0.001 g)	0.888	0.443	0.456
Filtro 2 con sulfato de calcio (± 0.001 g)	5.620	1.365	1.176
Filtro 3 (± 0.001 g)	0.950	0.443	0.463
Filtro 3 con ácido cítrico (± 0.001 g)	1.386	0.945	1.143
Filtro 4 (± 0.001 g)	0.774	0.445	0.458
Filtro 4 con ácido cítrico recristalizado (± 0.001 g)	1.143	0.861	0.961

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 32. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L.

Fermentación	Pesos (± 0.001 g)		
	Tubo Falcon	Tubo Falcon con medio fermentado	Tubo Falcon con biomasa seca
1	12.424	46.861	12.576
	12.571	47.555	12.718
	12.646	42.787	12.771
	13.415	41.865	13.537
2	12.774	47.113	12.929
	12.528	46.814	12.598
	14.273	46.063	14.349
	13.039	46.933	13.237
3	12.550	40.673	12.688
	12.579	41.010	12.745
	12.578	40.392	12.740
	12.508	40.930	12.644

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 33. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones con una concentración inicial de glicerol de 110 g/L.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 250 mL (± 0.1 g)	132.8	125.2	125.8
Beaker 250 mL con medio fermentado (± 0.1 g)	259.3	258.5	233.7
Beaker 150 mL con cal (± 0.1 g)	263.2	260.7	241.8

Continuación Cuadro 33.

Material	Peso		
	1	2	3
Filtro 1 (± 0.001 g)	0.952	0.938	0.950
Filtro 1 con cal y citrato (± 0.001 g)	2.356	1.793	3.086
Beaker 150 mL (± 0.1 g)	72.3	132.8	77.0
Beaker 150 mL con cal y citrato (± 0.1 g)	73.3	133.4	78.9
Beaker 150 mL con ácido sulfúrico (± 0.1 g)	85.5	141.9	103.7
Filtro 2 (± 0.001 g)	0.443	0.924	0.952
Filtro 2 con sulfato de calcio (± 0.001 g)	1.294	1.388	3.588
Filtro 3 (± 0.001 g)	0.442	0.924	0.946
Filtro 3 con ácido cítrico (± 0.001 g)	0.955	1.485	1.472
Filtro 4 (± 0.001 g)	0.444	0.935	0.956
Filtro 4 con ácido cítrico recristalizado (± 0.001 g)	0.836	1.384	1.365

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología.

Cuadro 34. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	Pesos (\pm 0.001g)		
	Tubo Falcon	Tubo Falcon con medio fermentado	Tubo Falcon con biomasa seca
1	14.249	47.924	14.547
	12.451	43.689	12.769
	12.563	43.860	12.848
	12.524	46.377	12.830
2	13.033	49.022	13.336
	12.451	43.320	12.762
	12.543	43.520	12.856
	13.123	48.914	13.427
3	12.266	37.123	12.518
	12.548	37.240	12.795
	13.219	53.949	13.565
	12.453	54.684	12.824

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología

Cuadro 35. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 250 mL (\pm 0.1 g)	87.9	77.3	73.5
Beaker 250 mL con medio fermentado (\pm 0.1g)	218.9	209.6	202.1

Continuación Cuadro 35.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 150 mL con cal (± 0.1 g)	227.0	220.1	217.3
Filtro 1 (± 0.001 g)	0.819	0.962	0.949
Filtro 1 con cal y citrato (± 0.001 g)	4.498	5.424	7.925
Beaker 150 mL (± 0.1 g)	77.4	77.3	73.5
Beaker 150 mL con cal y citrato (± 0.1 g)	80.7	81.6	80.3
Beaker 150 mL con ácido sulfúrico (± 0.1 g)	107.4	101.0	99.6
Filtro 2 (± 0.001 g)	0.902	0.936	0.951
Filtro 2 con sulfato de calcio (± 0.001 g)	4.769	4.490	6.800
Filtro 3 (± 0.001 g)	0.911	0.935	0.936
Filtro 3 con ácido cítrico (± 0.001 g)	1.488	1.420	1.472
Filtro 4 (± 0.001 g)	0.921	0.932	0.920
Filtro 4 con ácido cítrico recristalizado (± 0.001 g)	1.398	1.350	1.370

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología

Cuadro 36. Pesos de tubos y tubos con biomasa al final de la fermentación para determinación de gramos de biomasa generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

Fermentación	Pesos (± 0.001 g)		
	Tubo Falcon	Tubo Falcon con medio fermentado	Tubo Falcon con biomasa seca
1	14.251	47.874	14.488
	14.384	49.712	14.631
	12.529	47.717	12.756
	13.028	48.702	13.291
2	12.269	49.568	12.516
	12.549	44.860	12.796
	12.663	49.719	12.936
	12.804	44.659	13.038
3	14.392	45.608	14.592
	13.316	49.315	13.556
	13.322	49.668	13.629
	13.172	46.405	13.400

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología

Cuadro 37. Pesos para determinación de rendimiento de cristalización de ácido cítrico generado en las fermentaciones realizadas con una concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.

Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 250 mL (± 0.1 g)	95.6	108.0	102.2
Beaker 250 mL con medio fermentado (± 0.1 g)	232.9	244.0	236.2

Continuación Cuadro 37.

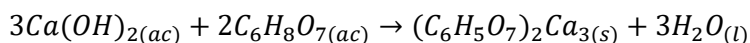
Material	Peso		
	1	2	3
Beaker 150 mL con cal (± 0.1 g)	242.2	251.4	239.9
Filtro 1 (± 0.001 g)	0.815	0.814	0.816
Filtro 1 con cal y citrato (± 0.001 g)	7.336	4.549	4.002
Beaker 150 mL (± 0.1 g)	95.5	107.9	102.2
Beaker 150 mL con cal y citrato (± 0.1 g)	101.5	111.4	105.1
Beaker 150 mL con ácido sulfúrico (± 0.1 g)	137.6	161.8	133.2
Filtro 2 (± 0.001 g)	0.801	0.798	0.813
Filtro 2 con sulfato de calcio (± 0.001 g)	6.573	2.934	2.233
Filtro 3 (± 0.001 g)	0.910	0.903	0.897
Filtro 3 con ácido cítrico (± 0.001 g)	1.154	1.210	1.152
Filtro 4 (± 0.001 g)	0.895	0.912	0.906
Filtro 4 con ácido cítrico recristalizado (± 0.001 g)	1.092	1.179	1.114

Datos obtenidos a 23°C y 84.6kPa de presión atmosférica utilizando los materiales indicados en Metodología

B. Muestra de cálculos

Ecuación 1. Reacción balanceada de precipitación de ácido cítrico en citrato de calcio empleando hidróxido de calcio.

Esta reacción representa la formación del precipitado de citrato de calcio al utilizar una solución de hidróxido de calcio 30% (p/v) para reaccionar con el ácido cítrico acuoso presente en el medio post fermentativo.



Donde:

$Ca(OH)_2$ = Hidróxido de calcio

$C_6H_8O_7$ = Ácido cítrico

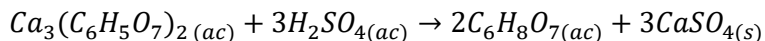
$(C_6H_5O_7)_2Ca_3$ = Citrato de calcio

H_2O = Agua

Empleando esta ecuación balanceada se determinó la cantidad aproximada de hidróxido de calcio que se agregó en exceso y el citrato de calcio obtenido a partir de los datos mostrados en el Cuadro 29.

Ecuación 2. Reacción balanceada de precipitación de sulfato de calcio empleando ácido sulfúrico.

Esta reacción representa la formación del precipitado de sulfato de calcio al utilizar una solución de ácido sulfúrico 2M para reaccionar con el precipitado de citrato de calcio recuperado de la ecuación 1 para obtener ácido cítrico acuoso.



Donde:

$Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ = Citrato de calcio

H_2SO_4 = Ácido sulfúrico

$C_6H_8O_7$ = Ácido cítrico

$CaSO_4$ = Sulfato de calcio

Empleando esta ecuación balanceada se determinó la cantidad de sulfato de calcio teórico generado.

Cálculo 1. Determinación de densidad utilizando el picnómetro.

Para determinar la densidad de las muestras de glicerol se empleó un picnómetro con un volumen de 24.36 mL. Este instrumento permite conocer la densidad de un fluido a una determinada temperatura a partir de la diferencia de pesos entre el instrumento vacío y el instrumento con el fluido en estudio. La razón entre esta diferencia de pesos y la capacidad de volumen del instrumento dan la densidad del fluido.

$$\rho \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{m_L(g) - m_a(g)}{v_L (mL)} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

ρ = Densidad del líquido

m_L = Masa del picnómetro con el fluido

m_a = Masa del picnómetro vacío

v_L = Volumen del fluido vertido en el picnómetro.

Utilizando los datos de la corrida 1 para la glicerina grado reactivo mostrados en el Cuadro 16 y el peso promedio del picnómetro vacío se obtiene,

$$\rho_{\text{glicerina}} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{65.0398 \pm 0.0001 \text{ g} - 34.8398 \pm 0.0002 \text{ g}}{24.36 \text{ mL}}$$

$$\rho_{\text{glicerina}} \left(\frac{g}{mL} \right) = 1.2397 \pm 0.0002 \text{ g/mL}$$

De esta forma se determinó la densidad de las otras muestras empelando los datos mostrados en el Cuadro 16.

Cálculo 2. Determinación de viscosidad cinemática de las muestras de glicerol utilizando viscosímetro.

El viscosímetro es un instrumento que permite conocer la viscosidad de un fluido a una determinada temperatura a partir de la medición del tiempo que toma al fluido recorrer de la marca superior a la marca inferior del instrumento. Cada viscosímetro presenta una constante determinada por el proveedor, la cual se multiplica por el tiempo mencionado anteriormente (en segundos) para determinar la viscosidad.

$$v(cSt) = c (cSt/s) \times t (s) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

v = Viscosidad cinemática

c = Constante del viscosímetro

t = Tiempo de flujo entre las marcas del viscosímetro

Utilizando los datos del Cuadro 17 para determinar la viscosidad de la corrida 1 de la glicerina grado reactivo utilizando la constante del viscosímetro Cannon-Fenske (0.09565 cSt/s), se obtiene,

$$v_{\text{glicerina}}(cSt) = 0.09565 \text{ cSt/s} \times 1025.18 \pm 0.08 \text{ s} = 98.053 \pm 0.008 \text{ cSt}$$

De esta forma se determinó la viscosidad de las demás corridas para la glicerina grado reactivo y el glicerol crudo empleando los datos del Cuadro 17. La viscosidad de las muestras de glicerol purificado se determinó de la misma manera empleando un viscosímetro Ubbelohde con una constante de 0.01046 cSt/s.

Cálculo 3. Determinación de la viscosidad dinámica de las muestras de glicerol.

La viscosidad dinámica de un fluido se define como el producto entre su viscosidad cinemática y su densidad, mostrado en la siguiente ecuación,

$$\mu (cP) = \nu(cSt) \times \rho (g/cm^3) \quad (Ec. 5)$$

Donde:

μ = Viscosidad dinámica

ν = Viscosidad cinemática

ρ = Densidad del líquido

Para determinar la viscosidad de la corrida 1 de la glicerina grado reactivo se utilizaron los datos determinados con el cálculo 2 y empleando la densidad promedio de la glicerina mostrada en el Cuadro 39 se obtiene,

$$\mu_{glicerina}(cP) = 98.053 \pm 0.008cSt \times 1.2387 \pm 0.0010g/cm^3$$

$$\mu_{glicerina}(cP) = 121.455 \pm 0.097 cP$$

De esta forma se determinó la viscosidad de las demás corridas para la glicerina grado reactivo y el glicerol crudo y purificado utilizando el promedio de sus respectivas densidades.

Cálculo 4. Determinación del factor de dilución utilizado para el conteo celular.

El factor de dilución se emplea para realizar una corrección de la concentración de una muestra al realizar el análisis de su dilución. Toma en cuenta el volumen utilizado de la muestra original en la dilución y el volumen final analizado. La siguiente ecuación muestra el cálculo de este factor para la dilución de una muestra de medio inoculado diluido en agua y su posterior dilución con azul de metileno para realizar el conteo celular empleando la cámara de Neubauer.

$$FD = \frac{1}{\frac{mx(uL)}{mx(uL) + H_2O(uL)}} \times \frac{1}{\frac{mx_d(uL)}{mx_d(uL) + Az(uL)}} \quad (Ec. 6)$$

Donde:

FD = Factor de dilución

mx = Muestra de fermentación

H_2O = Agua destilada

mx_d = Muestra diluida

Az = Azul de metileno

Ingresando los volúmenes empleados de cada uno de los componentes de la ecuación, se obtiene,

$$FD = \frac{1}{\frac{100 uL}{100 uL + 900 uL}} \times \frac{1}{\frac{11 uL}{11 uL + 11 uL}} = 20$$

De esta forma se determinó el factor de dilución para cada muestra analizada utilizando la cámara de Neubauer.

Cálculo 5. Determinación de concentración celular a partir del conteo de células utilizando la cámara de Neubauer.

Para determinar la concentración celular en una muestra empleando la cámara de Neubauer es necesario conocer las dimensiones de ancho, largo y profundidad del pozo de la cámara, así como el número de células promedio por cuadro determinado por conteo empleando un microscopio.

$$CN \text{ (células/mL)} = PC \text{ (Células/cuadro)} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{L \text{ (mm)} \times A \text{ (mm)} \times P \text{ (mm)}} \times \frac{1,000 \text{ (mm}^3\text{)}}{1 \text{ (mL)}} \times FD \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

CN = Concentración celular de la muestra

PC = Promedio de conteo de células en los recuadros contados.

L = Largo del pozo

A = Ancho del pozo

P = Profundidad del pozo

FD = Factor de dilución

El promedio de conteo de células se obtuvo por el conteo de los 4 cuadrantes (4x4) de las esquinas de la cuadrícula en la cámara de Neubauer en duplicado (Ver Figura 45 en Anexos). Utilizando los datos del Cuadro 18 para determinar la concentración celular a las 26 horas de la fermentación 1 con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno y conociendo las dimensiones del pozo en la cámara de Neubauer se obtiene,

$$CN \text{ (células/mL)} = 21.6 \text{ Células/cuadro} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}} \times \frac{1,000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \times 20$$

$$CN \text{ (células/mL)} = 4.33 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

De esta forma se determinó la concentración celular para cada muestra analizada de los cuadros 18, 19, 20, 21 y 22 utilizando la cámara de Neubauer.

Cálculo 6. Rendimiento global de generación de biomasa en función del consumo de sustrato.

El rendimiento de generación de biomasa hace referencia a la relación entre la producción de biomasa y la asimilación del sustrato principal en una fermentación. Se emplea la diferencia de concentración celular y la diferencia de concentración de sustrato en dos tiempos diferentes de fermentación para determinar este rendimiento.

$$Y_{x/s} = \frac{X_f (g/L) - X_i (g/L)}{S_i (g/L) - S_f (g/L)} \quad (Ec. 8)$$

Donde:

$Y_{x/s}$ = Rendimiento de biomasa en función de consumo de sustrato

X_f = Concentración de biomasa final

X_i = Concentración de biomasa inicial

S_f = Concentración de sustrato final

S_i = Concentración de sustrato inicial

Para determinar el rendimiento global de generación de biomasa para la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.5g/L de fuente de nitrógeno se utilizaron los datos promedio del Cuadro 23 y Cuadro 41, obteniendo,

$$Y_{x/s} = \frac{7.639 \text{ g/L} - 0.705 \text{ g/L}}{37.26 \text{ g/L} - 4.47 \text{ g/L}} = 0.211 \text{ g biomasa/g glicerol}$$

De esta forma se determinó el rendimiento global de generación de biomasa con respecto al consumo de sustrato para las otras fermentaciones.

Cálculo 7. Rendimiento global de generación de producto en función del consumo de sustrato.

El rendimiento de generación de producto hace referencia a la relación entre la producción de ácido cítrico y la asimilación del sustrato principal en una fermentación. Se emplea la diferencia de concentración del producto de interés y la diferencia de concentración de sustrato en dos tiempos diferentes de fermentación para determinar este rendimiento.

$$Y_{p/s} = \frac{P_f (g/L) - P_i (g/L)}{S_i (g/L) - S_f (g/L)} \quad (Ec. 9)$$

Donde:

$Y_{p/s}$ = Rendimiento de producto en función de consumo de sustrato

P_f = Concentración de producto final

P_i = Concentración de producto inicial

S_f = Concentración de sustrato final

S_i = Concentración de sustrato inicial

Para determinar el rendimiento global de generación de producto para la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35g/L y 0.5g/L de fuente de nitrógeno se utilizaron los datos promedio del Cuadro 23, obteniendo,

$$Y_{p/s} = \frac{13.73 \text{ g/L} - 0.13 \text{ g/L}}{37.26 \text{ g/L} - 4.47 \text{ g/L}} = 0.415 \text{ g ácido/g glicerol}$$

De esta forma se determinó el rendimiento global de generación de producto con respecto al consumo de sustrato para las otras fermentaciones.

C. Análisis de error

Cálculo 8. Media o promedio para una serie de datos.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

\bar{x} = Media o promedio de una serie de datos.

x_i = Valor medido

n = Cantidad de valores medidos.

Empleando los datos del Cuadro 39 para determinar el promedio de la densidad de la glicerina grado reactivo se obtiene,

$$\bar{x} = \frac{1.2397 + 1.2384 + 1.2378}{3} = 1.2387 \text{ g/mL}$$

De esta forma se determinó el promedio de diferentes series de datos donde se requería un promedio.

Cálculo 9. Desviación estándar para una serie de valores.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

S = Desviación estándar de una serie de datos

\bar{x} = Media o promedio de una serie de datos.

x_i = Valor medido

n = Cantidad de valores medidos.

Empleando los datos del Cuadro 39 para determinar la desviación estándar de la densidad de la glicerina grado reactivo se obtiene,

$$S = \sqrt{\frac{(1.2397 - 1.2387)^2 + (1.2384 - 1.2387)^2 + (1.2378 - 1.2387)^2}{3 - 1}} = 0.0010 \text{ g/mL}$$

De esta forma se determinó la desviación estándar de diferentes series de datos donde se requería una desviación estándar.

Cálculo 10. Propagación de error de sumas y restas.

$$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + S_c^2 + \dots} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado

$S_{a,b,c,\dots,n}$ = Incertidumbre de cada valor

Cálculo 11. Propagación de error de multiplicaciones y divisiones.

$$S_y = Y \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2 + \dots} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado

Y = Resultado de la multiplicación o división.

a, b, c, \dots, n = Valor medido

$S_{a,b,c,\dots,n}$ = Incertidumbre de cada valor

D. Datos calculados

Cuadro 38. Datos calculados para el balance de masa del proceso de purificación de glicerol con su respectiva incertidumbre.

Material	Masa (g)
Glicerol crudo	1,809.3 ± 5.0
Ácido sulfúrico 2M	210.2 ± 7.1
Glicerol ácido (entrada a separación de sales)	2,019.5 ± 8.7
Sales (separación de sales)	1,278.3 ± 0.5
Pérdidas (separación de sales)	74.3 ± 8.7
Glicerol ácido (salida de separación de sales)	666.9 ± 0.141
Hidróxido de sodio 2M	75.0 ± 0.2
Sales (neutralización)	7.4 ± 0.1
Glicerol impuro (entrada a destilación)	734.5 ± 0.3
Agua de enfriamiento	176,879.5 ± 0.2
Glicerol impuro (salida de destilación)	567.5 ± 0.2
Metanol y agua	159.7 ± 0.3
Pérdidas (destilación)	7.3 ± 0.3
Glicerol purificado	355.9 ± 0.1
Ácidos grasos	197.1 ± 0.1
Pérdidas y contaminantes (decantación)	14.5 ± 0.2

Cuadro 39. Triplicado de densidades de las muestras de glicerina con promedio y desviación estándar.

Muestra	Densidad (± 0.0002 g/mL)			Promedio (g/mL)
	1	2	3	
Glicerina	1.2397	1.2384	1.2378	1.2387 ± 0.0010
Glicerol crudo	1.0011	0.9998	0.9990	0.9996 ± 0.0012
Glicerol purificado	1.1771	1.1775	1.1758	1.1768 ± 0.0009

Cuadro 40. Triplicado de viscosidades de las muestras de glicerina con promedio y desviación estándar.

Muestra	Viscosidad (cP)			
	1	2	3	Promedio
Glicerina	121.455 ± 0.097	123.441 ± 0.098	123.270 ± 0.098	122.72 ± 1.10
Glicerol crudo	22.611 ± 0.029	25.100 ± 0.032	24.773 ± 0.032	24.16 ± 1.35
Glicerol purificado	12.282 ± 0.009	11.845 ± 0.009	12.303 ± 0.009	12.14 ± 0.26

Cuadro 41. Triplicado de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.

Tiempo (± 0.1 h)	Concentración celular (células/mL)			
	1	2	3	Promedio
0	(1.43 ± 0.04)x10 ⁶	(1.41 ± 0.05)x10 ⁶	(1.44 ± 0.09)x10 ⁶	(1.43 ± 0.02)x10 ⁶
4	(1.94 ± 0.09)x10 ⁶	(1.76 ± 0.05)x10 ⁶	(1.79 ± 0.24)x10 ⁶	(1.83 ± 0.10)x10 ⁶
9	(1.90 ± 0.07)x10 ⁶	(1.88 ± 0.09)x10 ⁶	(1.72 ± 0.06)x10 ⁶	(1.83 ± 0.09)x10 ⁶
26	(4.33 ± 0.45)x10 ⁶	(4.40 ± 0.79)x10 ⁶	(3.65 ± 0.48)x10 ⁶	(4.13 ± 0.41)x10 ⁶
32	(6.78 ± 0.71)x10 ⁶	(7.23 ± 0.85)x10 ⁶	(8.08 ± 1.09)x10 ⁶	(7.36 ± 0.66)x10 ⁶
48	(1.34 ± 0.04)x10 ⁷	(1.18 ± 0.08)x10 ⁷	(1.49 ± 0.10)x10 ⁷	(1.34 ± 0.16)x10 ⁷
54	(1.49 ± 0.06)x10 ⁷	(1.36 ± 0.06)x10 ⁷	(1.54 ± 0.10)x10 ⁷	(1.46 ± 0.10)x10 ⁷
73	(1.55 ± 0.06)x10 ⁷	(1.57 ± 0.07)x10 ⁷	(1.50 ± 0.14)x10 ⁷	(1.54 ± 0.03)x10 ⁷
80	(1.56 ± 0.07)x10 ⁷	(1.63 ± 0.01)x10 ⁷	(1.48 ± 0.07)x10 ⁷	(1.55 ± 0.08)x10 ⁷
96	(1.57 ± 0.07)x10 ⁷	(1.60 ± 0.06)x10 ⁷	(1.47 ± 0.10)x10 ⁷	(1.55 ± 0.07)x10 ⁷

Cuadro 42. Triplicado de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 70 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.

Tiempo (± 0.1 h)	Concentración celular (células/mL)			
	1	2	3	Promedio
0	$(1.39 \pm 0.07) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.42 \pm 0.14) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.01) \times 10^6$
5	$(1.53 \pm 0.11) \times 10^6$	$(1.61 \pm 0.14) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.07) \times 10^6$	$(1.51 \pm 0.11) \times 10^6$
9	$(1.89 \pm 0.11) \times 10^6$	$(1.49 \pm 0.10) \times 10^6$	$(1.60 \pm 0.13) \times 10^6$	$(1.66 \pm 0.20) \times 10^6$
23	$(6.68 \pm 1.19) \times 10^6$	$(6.65 \pm 0.87) \times 10^6$	$(7.95 \pm 1.06) \times 10^6$	$(7.09 \pm 0.74) \times 10^6$
31	$(9.15 \pm 0.60) \times 10^6$	$(8.65 \pm 1.21) \times 10^6$	$(8.63 \pm 0.87) \times 10^6$	$(8.81 \pm 0.30) \times 10^6$
49	$(1.02 \pm 0.09) \times 10^7$	$(9.53 \pm 0.86) \times 10^6$	$(1.07 \pm 0.06) \times 10^7$	$(1.01 \pm 0.58) \times 10^7$
55	$(1.08 \pm 0.10) \times 10^7$	$(9.78 \pm 0.92) \times 10^6$	$(9.90 \pm 0.94) \times 10^6$	$(1.02 \pm 0.06) \times 10^7$
74	$(1.18 \pm 0.09) \times 10^7$	$(1.02 \pm 0.09) \times 10^7$	$(1.10 \pm 0.05) \times 10^7$	$(1.10 \pm 0.08) \times 10^7$
79	$(1.06 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.09 \pm 0.06) \times 10^7$	$(1.12 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.09 \pm 0.03) \times 10^7$
98	$(1.08 \pm 0.17) \times 10^7$	$(1.01 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.16 \pm 0.08) \times 10^7$	$(1.08 \pm 0.08) \times 10^7$

Cuadro 43. Triplicado de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 110 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.

Tiempo (± 0.1 h)	Concentración celular (células/mL)			
	1	2	3	Promedio
0	$(1.39 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.43 \pm 0.10) \times 10^6$	$(1.41 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.41 \pm 0.02) \times 10^6$
3	$(1.22 \pm 0.45) \times 10^6$	$(1.50 \pm 0.10) \times 10^6$	$(1.37 \pm 0.15) \times 10^6$	$(1.37 \pm 0.14) \times 10^6$
9	$(1.40 \pm 0.12) \times 10^6$	$(1.70 \pm 0.09) \times 10^6$	$(1.65 \pm 0.22) \times 10^6$	$(1.58 \pm 0.16) \times 10^6$
25	$(2.13 \pm 0.45) \times 10^6$	$(3.68 \pm 0.57) \times 10^6$	$(3.80 \pm 0.98) \times 10^6$	$(3.20 \pm 0.93) \times 10^6$
32	$(2.50 \pm 0.90) \times 10^6$	$(4.03 \pm 0.61) \times 10^6$	$(5.05 \pm 1.02) \times 10^6$	$(3.86 \pm 1.28) \times 10^6$
48	$(3.48 \pm 0.52) \times 10^6$	$(5.43 \pm 0.89) \times 10^6$	$(6.68 \pm 0.62) \times 10^6$	$(5.19 \pm 1.61) \times 10^6$
57	$(4.33 \pm 0.49) \times 10^6$	$(5.65 \pm 0.72) \times 10^6$	$(6.80 \pm 0.48) \times 10^6$	$(5.59 \pm 1.24) \times 10^6$
73	$(5.75 \pm 0.11) \times 10^6$	$(6.63 \pm 1.11) \times 10^6$	$(7.88 \pm 0.42) \times 10^6$	$(6.75 \pm 1.07) \times 10^6$
80	$(6.63 \pm 0.79) \times 10^6$	$(6.78 \pm 2.10) \times 10^6$	$(7.48 \pm 1.15) \times 10^6$	$(6.96 \pm 0.45) \times 10^6$
97	$(7.40 \pm 0.96) \times 10^6$	$(6.75 \pm 0.70) \times 10^6$	$(8.15 \pm 1.17) \times 10^6$	$(7.43 \pm 0.70) \times 10^6$

Cuadro 44. Triplicado de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.

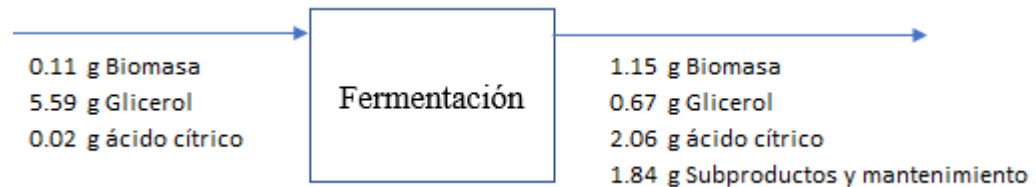
Tiempo (± 0.1 h)	Concentración celular (células/mL)			
	1	2	3	Promedio
0	$(1.40 \pm 0.14) \times 10^6$	$(1.39 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.41 \pm 0.12) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.01) \times 10^6$
4	$(1.85 \pm 0.13) \times 10^6$	$(1.41 \pm 0.10) \times 10^6$	$(1.54 \pm 0.14) \times 10^6$	$(1.60 \pm 0.23) \times 10^6$
9	$(2.07 \pm 0.15) \times 10^6$	$(2.12 \pm 0.10) \times 10^6$	$(2.10 \pm 0.11) \times 10^6$	$(2.10 \pm 0.03) \times 10^6$
26	$(6.88 \pm 0.94) \times 10^6$	$(6.53 \pm 1.15) \times 10^6$	$(7.15 \pm 0.91) \times 10^6$	$(6.79 \pm 0.41) \times 10^6$
32	$(1.08 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.04 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.07 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.06 \pm 0.02) \times 10^7$
48	$(1.42 \pm 0.08) \times 10^7$	$(1.57 \pm 0.09) \times 10^7$	$(1.45 \pm 0.18) \times 10^7$	$(1.48 \pm 0.08) \times 10^7$
54	$(1.53 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.62 \pm 0.15) \times 10^7$	$(1.59 \pm 0.10) \times 10^7$	$(1.58 \pm 0.04) \times 10^7$
73	$(1.60 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.61 \pm 0.09) \times 10^7$	$(1.63 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.61 \pm 0.01) \times 10^7$
80	$(1.62 \pm 0.11) \times 10^7$	$(1.66 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.58 \pm 0.17) \times 10^7$	$(1.62 \pm 0.04) \times 10^7$
96	$(1.63 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.66 \pm 0.14) \times 10^7$	$(1.64 \pm 0.15) \times 10^7$	$(1.65 \pm 0.02) \times 10^7$

Cuadro 45. Triplicado de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* para elaboración de curva de crecimiento con concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno con promedio y desviación estándar.

Tiempo (± 0.1 h)	Concentración celular (células/mL)			
	1	2	3	Promedio
0	$(1.42 \pm 0.12) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.18) \times 10^6$	$(1.38 \pm 0.14) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.02) \times 10^6$
4	$(1.94 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.58 \pm 0.07) \times 10^6$	$(1.36 \pm 0.15) \times 10^6$	$(1.62 \pm 0.29) \times 10^6$
9	$(1.89 \pm 0.11) \times 10^6$	$(1.98 \pm 0.13) \times 10^6$	$(1.57 \pm 0.16) \times 10^6$	$(1.81 \pm 0.21) \times 10^6$
26	$(4.85 \pm 0.68) \times 10^6$	$(3.83 \pm 1.09) \times 10^6$	$(4.08 \pm 1.14) \times 10^6$	$(4.25 \pm 0.53) \times 10^6$
32	$(8.20 \pm 0.98) \times 10^6$	$(6.65 \pm 0.68) \times 10^6$	$(7.10 \pm 1.65) \times 10^6$	$(7.32 \pm 0.80) \times 10^6$
48	$(1.19 \pm 0.13) \times 10^7$	$(8.55 \pm 1.59) \times 10^6$	$(9.70 \pm 0.98) \times 10^6$	$(1.01 \pm 0.17) \times 10^7$
54	$(1.27 \pm 0.10) \times 10^7$	$(1.20 \pm 0.18) \times 10^7$	$(1.20 \pm 0.14) \times 10^7$	$(1.22 \pm 0.04) \times 10^7$
73	$(1.34 \pm 0.06) \times 10^7$	$(1.28 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.26 \pm 0.17) \times 10^7$	$(1.29 \pm 0.04) \times 10^7$
80	$(1.31 \pm 0.11) \times 10^7$	$(1.37 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.27 \pm 0.19) \times 10^7$	$(1.32 \pm 0.05) \times 10^7$
96	$(1.32 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.35 \pm 0.16) \times 10^7$	$(1.32 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.33 \pm 0.02) \times 10^7$

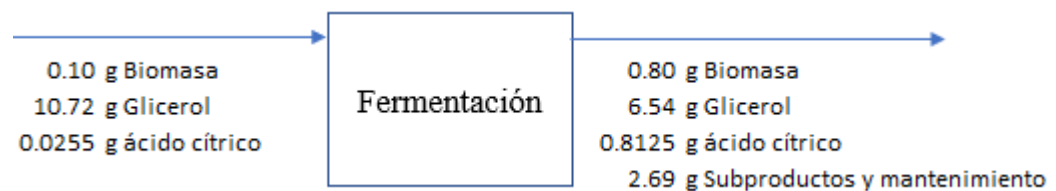
E. Balances de masa

Figura 15. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*.



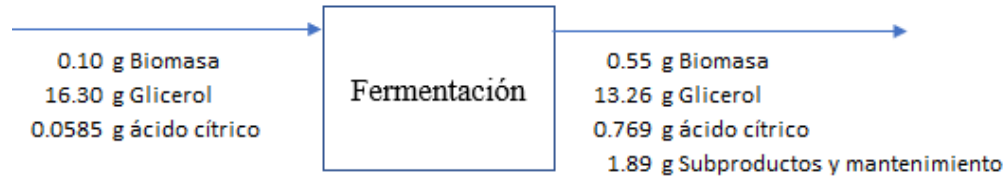
Balance realizado para fermentación realizada a 28°C y 180 rpm por una semana en un volumen 150 mL. Datos de glicerol y ácido cítrico obtenidos con análisis HPLC y datos de biomasa obtenidos por conteo celular y los cálculos mostrados en la sección de anexos.

Figura 16. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 70 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*.



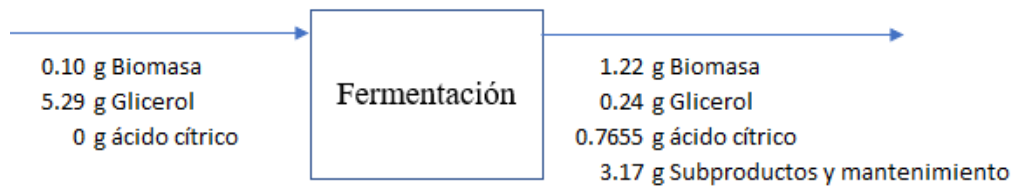
Balance realizado para fermentación realizada a 28°C y 180 rpm por una semana en un volumen 150 mL. Datos de glicerol y ácido cítrico obtenidos con análisis HPLC y datos de biomasa obtenidos por conteo celular y los cálculos mostrados en la sección de anexos.

Figura 17. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 110 g/L y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*.



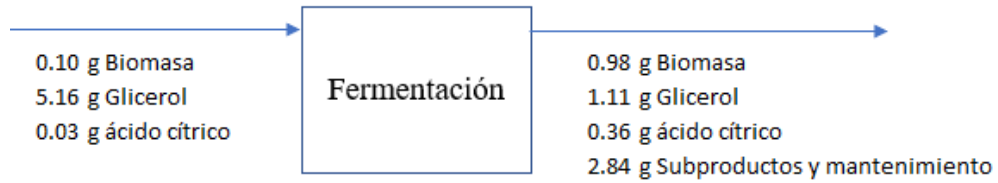
Balance realizado para fermentación realizada a 28°C y 180 rpm por una semana en un volumen 150 mL. Datos de glicerol y ácido cítrico obtenidos con análisis HPLC y datos de biomasa obtenidos por conteo celular y los cálculos mostrados en la sección de anexos.

Figura 18. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 1 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*.



Balance realizado para fermentación realizada a 28°C y 180 rpm por una semana en un volumen 150 mL. Datos de glicerol y ácido cítrico obtenidos con análisis HPLC y datos de biomasa obtenidos por conteo celular y los cálculos mostrados en la sección de anexos.

Figura 19. Balance de masa de la fermentación con concentración inicial de glicerol de 35 g/L y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*.



Balance realizado para fermentación realizada a 28°C y 180 rpm por una semana en un volumen 150 mL. Datos de glicerol y ácido cítrico obtenidos con análisis HPLC y datos de biomasa obtenidos por conteo celular y los cálculos mostrados en la sección de anexos.

F. Gráficos adicionales para identificación de fases en curva de crecimiento

Figura 20. Logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.

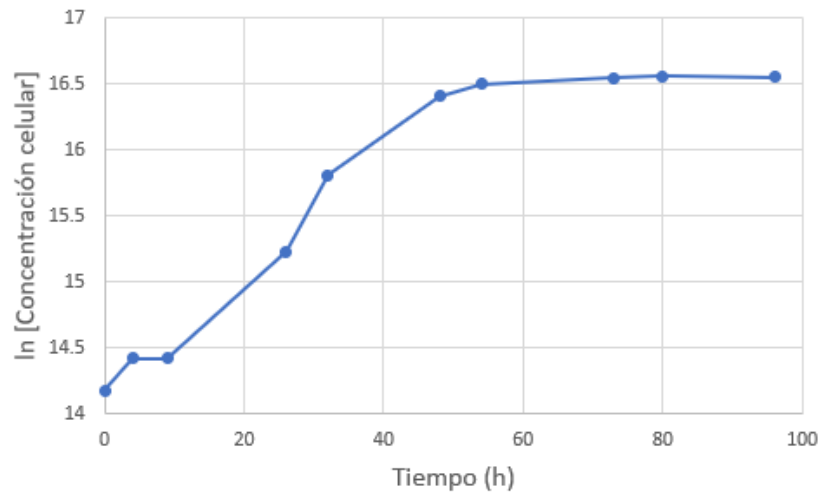


Figura 21. Logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 70g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.

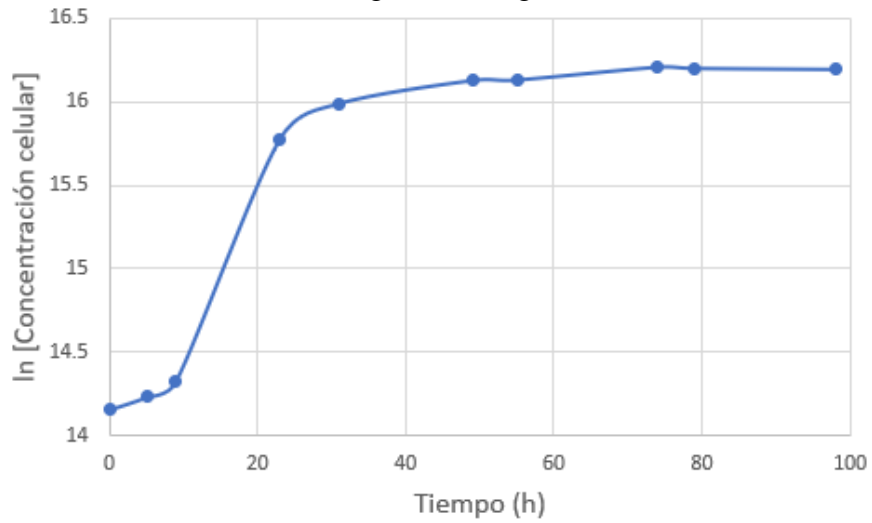


Figura 22. Logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 110g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.

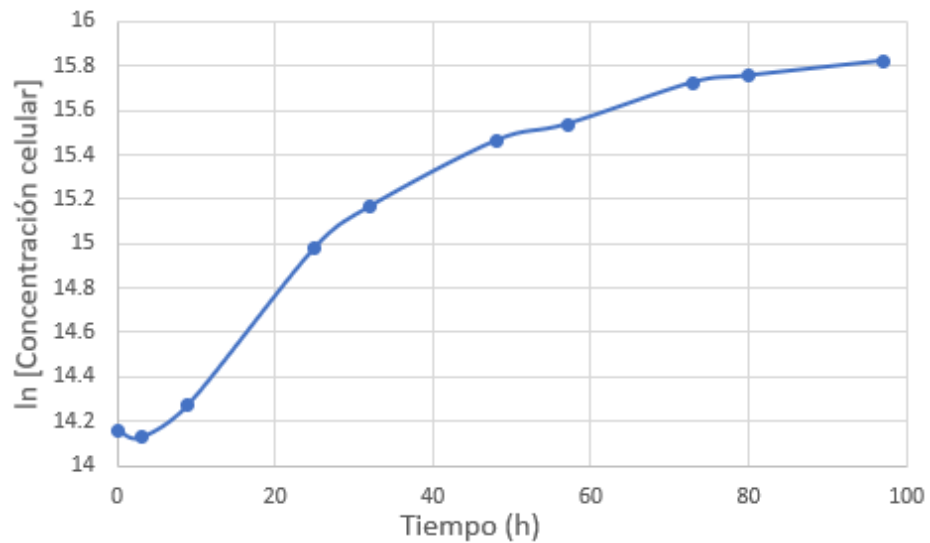


Figura 23. Logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 1.0g/L.

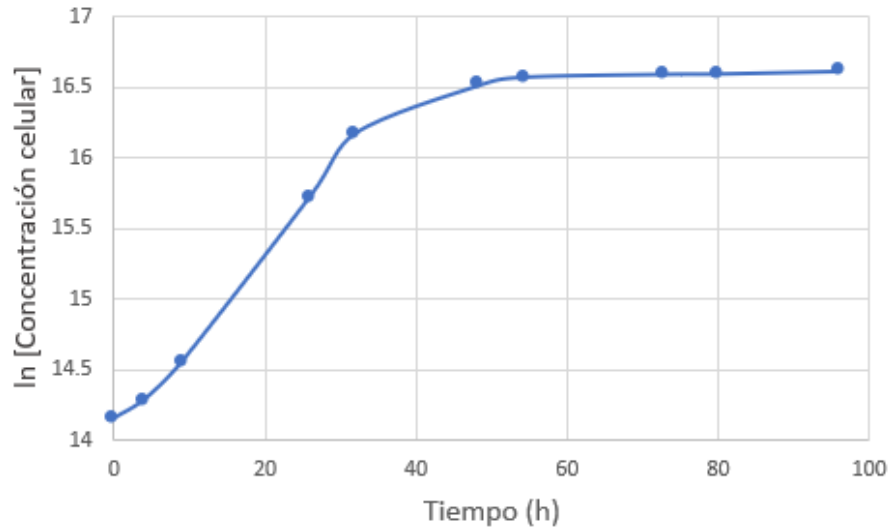


Figura 24. Logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.2g/L.

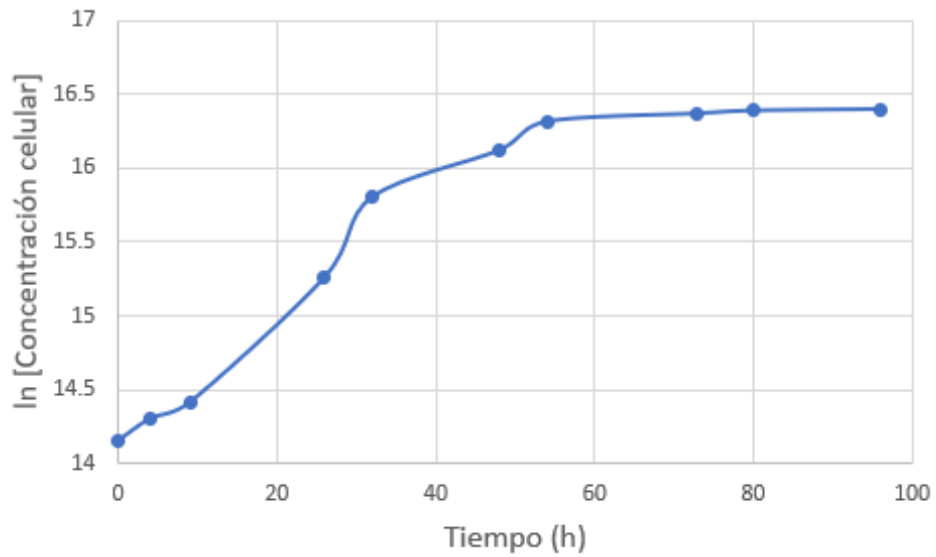
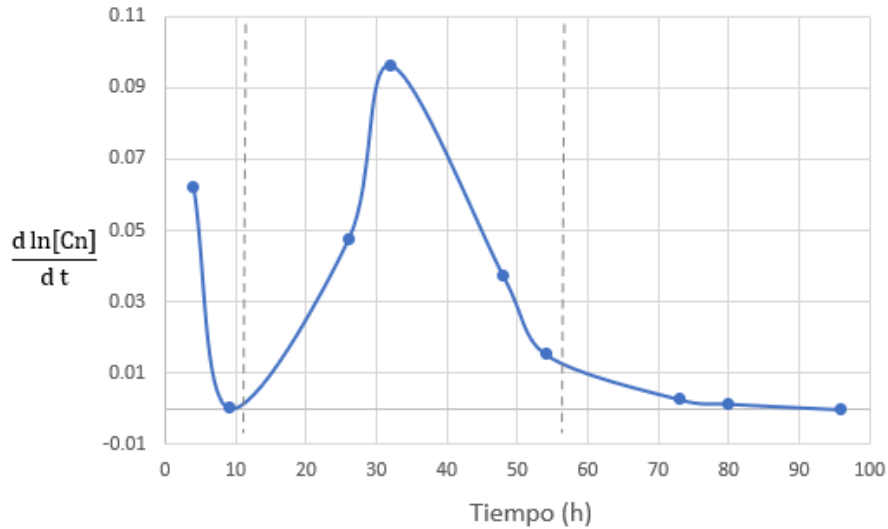
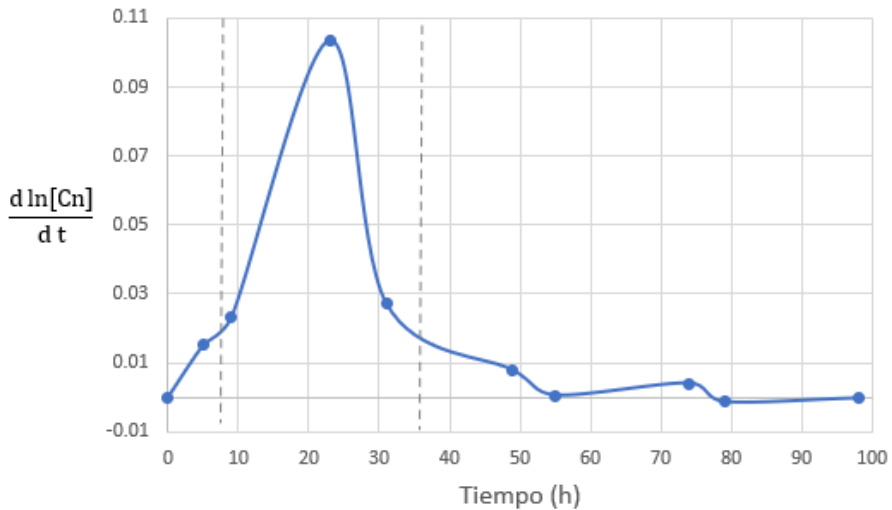


Figura 25. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.



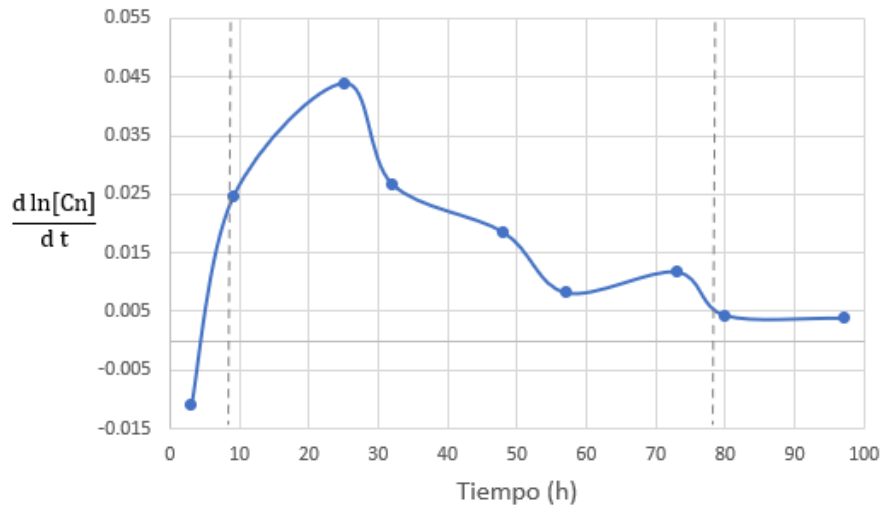
Las líneas punteadas muestran la separación de las fases de aceleración, exponencial y estacionaria (de izquierda a derecha) de la curva de crecimiento.

Figura 26. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 70g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.



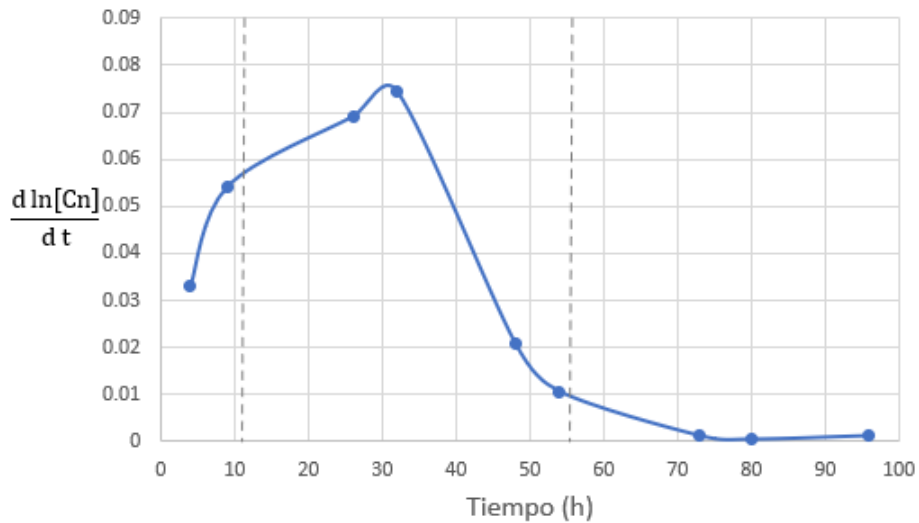
Las líneas punteadas muestran la separación de las fases de aceleración, exponencial y estacionaria (de izquierda a derecha) de la curva de crecimiento.

Figura 27. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 110g/L y concentración de nitrógeno de 0.5g/L.



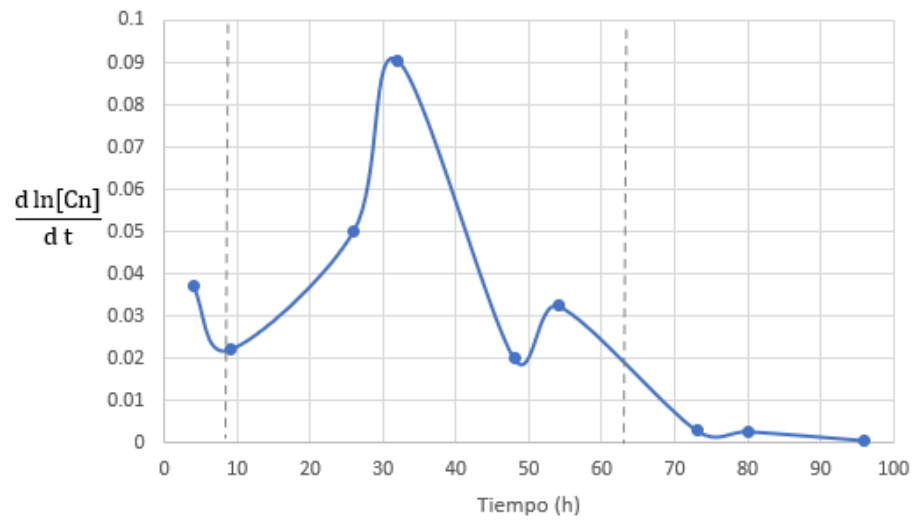
Las líneas punteadas muestran la separación de las fases de aceleración, exponencial y estacionaria (de izquierda a derecha) de la curva de crecimiento.

Figura 28. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 1.0g/L.



Las líneas punteadas muestran la separación de las fases de aceleración, exponencial y estacionaria (de izquierda a derecha) de la curva de crecimiento.

Figura 29. Diferencial del logaritmo natural de concentración celular de *Yarrowia lipolytica* por diferencial de tiempo en función del tiempo con concentración inicial de glicerol de 35g/L y concentración de nitrógeno de 0.2g/L.



Las líneas punteadas muestran la separación de las fases de aceleración, exponencial y estacionaria (de izquierda a derecha) de la curva de crecimiento.

G. Datos de equipo

Cuadro 46. Información de balanza analítica para pesaje de reactivos.

Equipo	Balanza analítica
Marca	Ohaus
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110
Incertidumbre (g)	0.0001

Cuadro 47. Información de balanza para pesaje de materiales.

Equipo	Balanza
Marca	Ohaus
Modelo	V31XH2
Capacidad máxima (g)	2000
Incertidumbre (g)	0.1

Cuadro 48. Información de balanza móvil para pesaje de materiales.

Equipo	Balanza móvil
Marca	Ohaus
Modelo	T31P
Capacidad máxima (kg)	150
Legibilidad (kg)	0.05

Cuadro 49. Información de potenciómetro para determinación de pH.

Equipo	Multi-parámetro
Marca	Thermo Fisher Scientific
Modelo	PTTestr35
Rango (pH)	0.00 – 14.00
Incertidumbre (pH)	0.01

Cuadro 50. Información de baño térmico para determinación de viscosidad

Equipo	Baño térmico
Marca	PolyScience
Modelo	MX17VB6G-A11B

Cuadro 51. Información de centrífuga para tubos Falcon de 50 mL para purificación de ácido cítrico.

Equipo	Centrífuga tubos Falcon 50mL
Marca	Eppendorf 2
Modelo	5804R
Velocidad máxima (rpm)	14000
Presión máxima de operación (bar)	25

Cuadro 52. Información de horno de convección para secado de materiales.

Equipo	Horno de convección
Marca	VWR
Modelo	Symphony

Cuadro 53. Información de incubadora con agitación para las fermentaciones.

Equipo	Incubadora con agitación
Marca	Barnstead International
Modelo	SHKA4450
Rango agitación (rpm)	0 - 500

Cuadro 54. Información de incubadora para cultivo en cajas Petri de *Yarrowia lipolytica*.

Equipo	Incubadora
Marca	LAB-LINE INSTRUMENTS, INC.
Modelo	310

Cuadro 55. Información de estufa para preparación de medios.

Equipo	Estufa
Marca	Thermo Scientific
Modelo	Cimarec +
Rango temperatura (°C)	0 – 540
Rango agitación (rpm)	0 - 1500

Cuadro 56. Información de microscopio para conteos celulares.

Equipo	Microscopio
Marca	Fisher Scientific
Modelo	Micromaster A2009-A751-001

Cuadro 57. Información de viscosímetro Cannon-Fenske.

Equipo	Viscosímetro Cannon-Fenske
Marca	Cannon Instrument Company
Número de serie	T144
Constante (cSt/s)	0.09572 (40°C) 0.08527 (100°C)
Rango viscosidad cinemática (cSt)	20 – 100

Cuadro 58. Información de viscosímetro de Ubbelohde

Equipo	Viscosímetro Ubbelohde
Marca	Cannon Instrument Company
Número de serie	N656
Constante (cSt/s)	0.01046
Rango viscosidad cinemática (cSt)	2 – 10

Cuadro 59. Información de bomba de vacío para filtración de ácido cítrico.

Equipo	Bomba de vacío
Marca	Gast
Modelo	D0A-P104-AA

Cuadro 60. Información de autoclave para esterilización de medios y materiales.

Equipo	Autoclave
Marca	Tuttnauer
Modelo	2840ELV
Presión máxima de operación (psi)	40
Capacidad máxima (kg)	5.4

H. Curvas de calibración HPLC

Figura 30. Curva de calibración para la determinación de glicerol de HPLC.

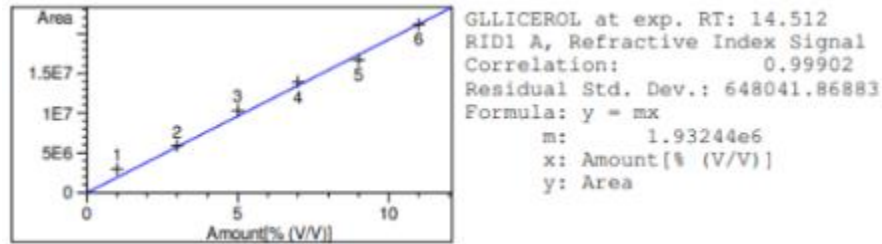
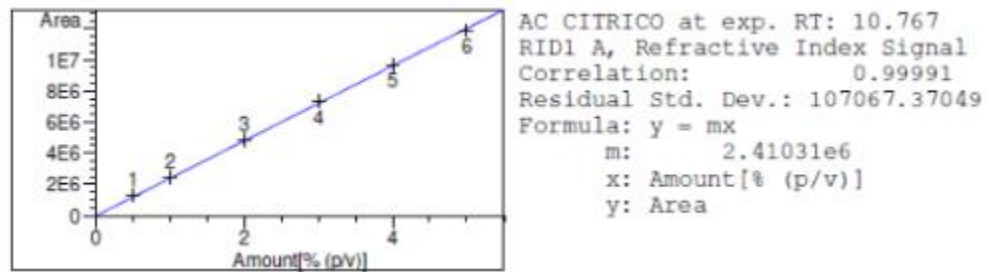


Figura 31. Curva de calibración para la determinación de ácido cítrico de HPLC.



I. Muestra de cromatogramas obtenidos por análisis HPLC

Figura 32. Ejemplo de cromatograma de la muestra a las 48 horas de fermentación con 35g/L de glicerol y 0.2 g/L de nitrógeno empleando *Y. lipolytica*.

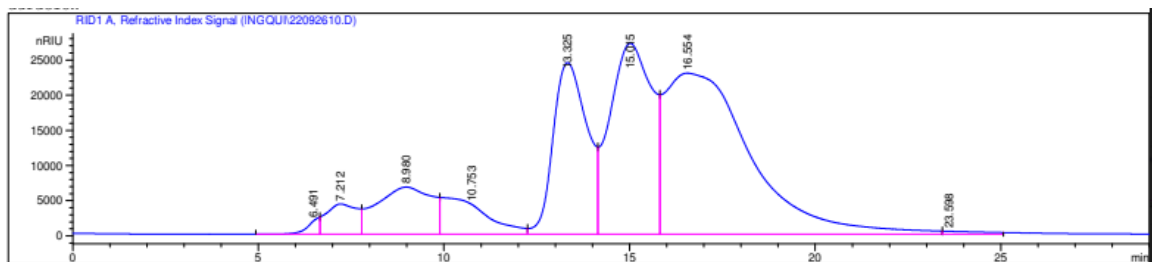
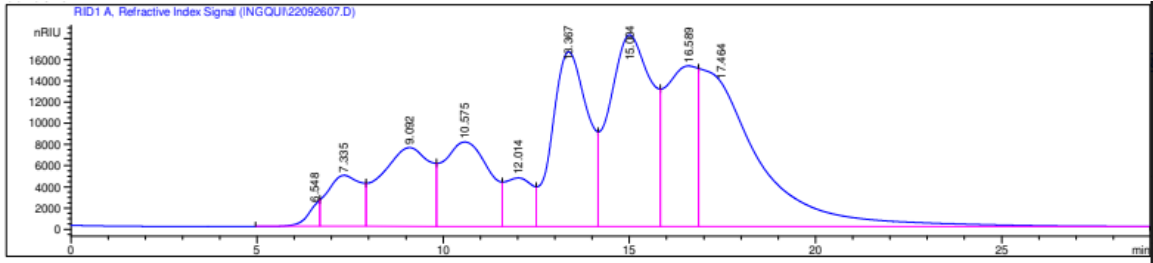


Figura 33. Ejemplo de cromatograma de la muestra a las 96 horas de fermentación con 35g/L de glicerol y 0.2 g/L de nitrógeno empleando *Y. lipolytica*.



J. Espectros IR de las muestras analizadas

Figura 34. Espectro IR de ácido cítrico grado reactivo

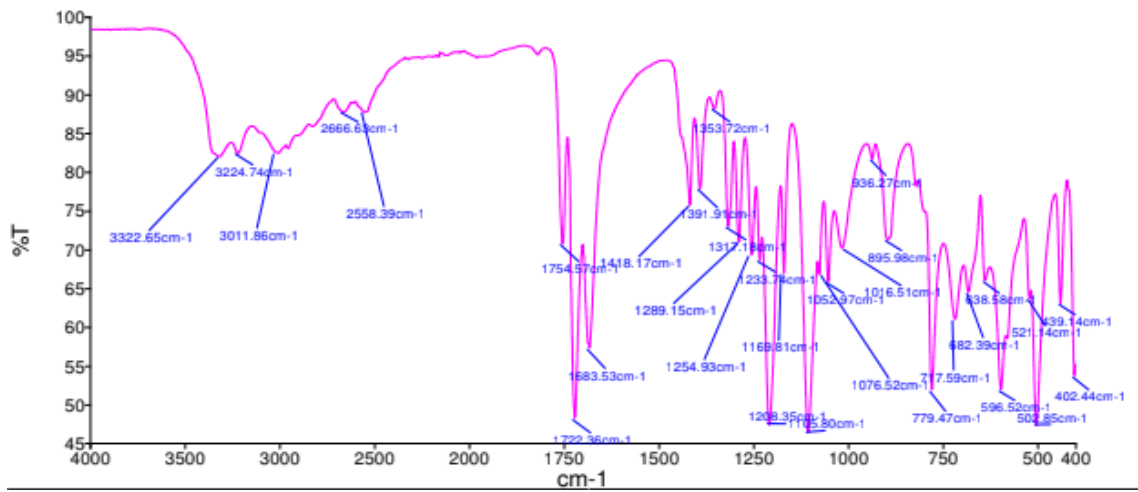


Figura 35. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

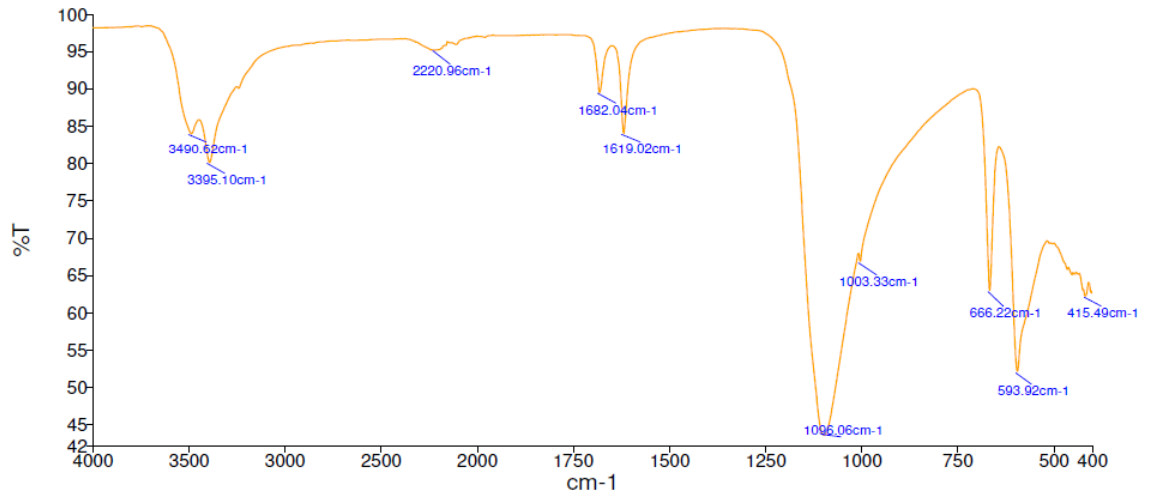


Figura 36. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 70 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

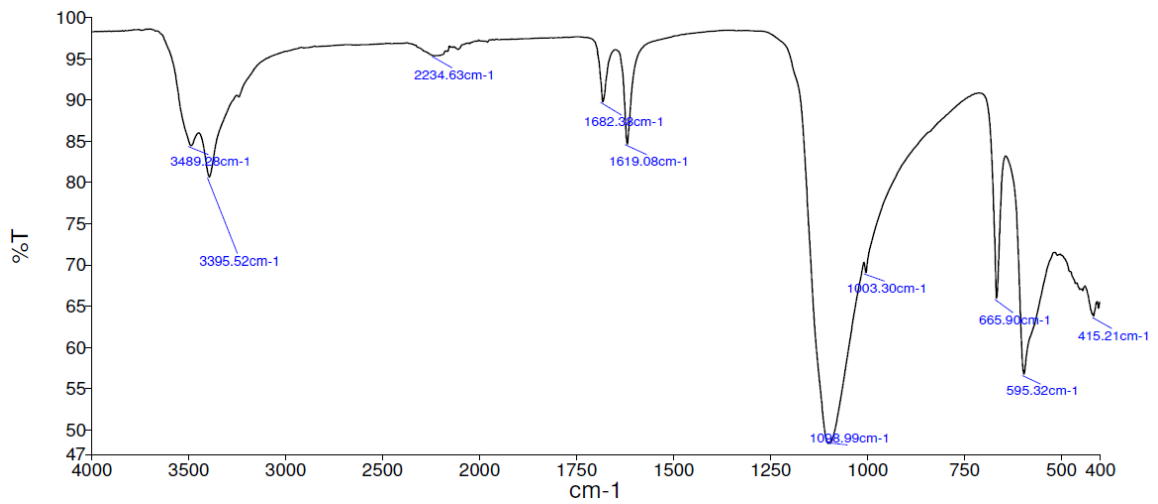


Figura 37. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 110 g/L de glicerol y 0.5 g/L de fuente de nitrógeno.

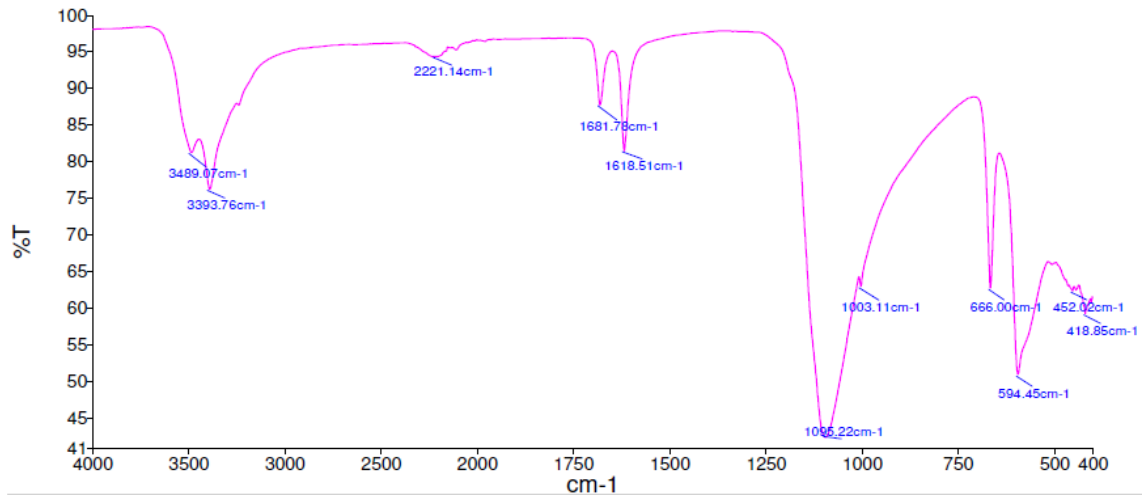


Figura 38. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 1 g/L de fuente de nitrógeno.

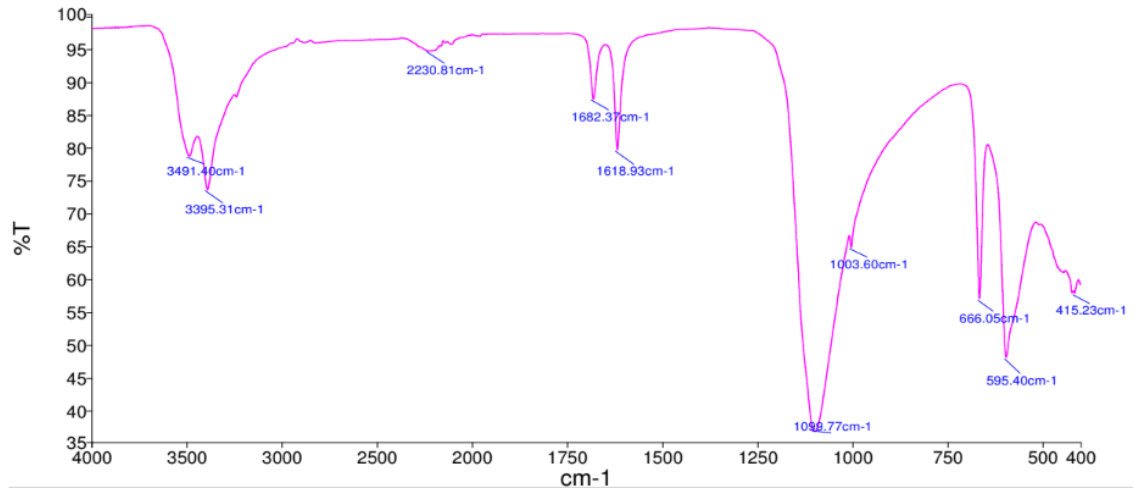
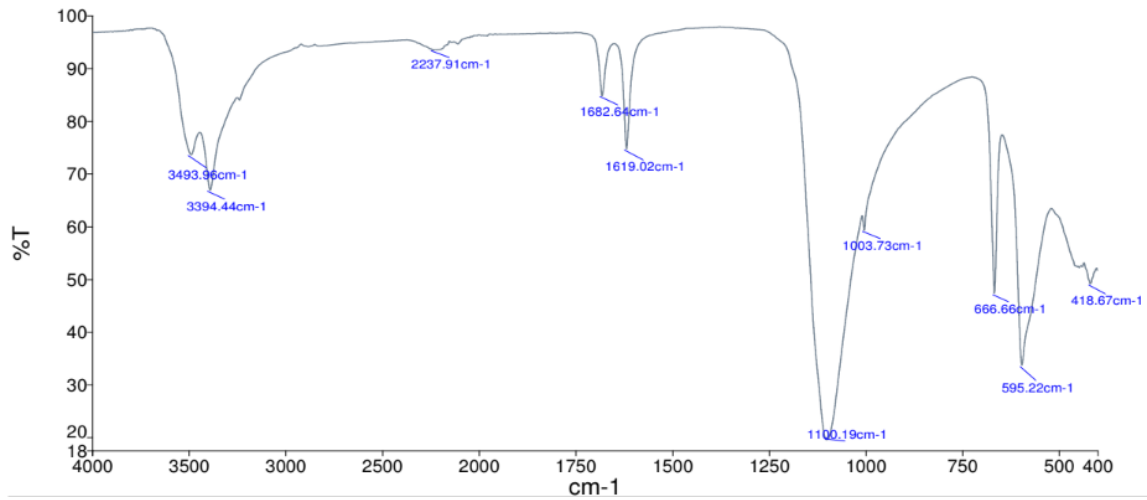


Figura 39. Espectro IR de ácido cítrico cristalizado a partir de la fermentación con una concentración inicial de 35 g/L de glicerol y 0.2 g/L de fuente de nitrógeno.



K. Ilustraciones

Figura 40. Glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel en el Laboratorio de Operaciones Unitarias.

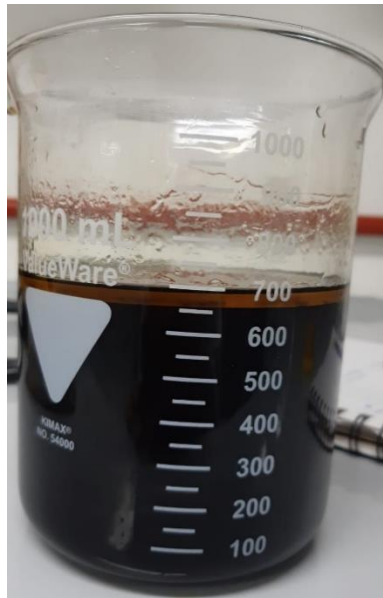


Figura 41. Separación de sales del glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel.



Figura 42. Sistema de destilación simple armado en el laboratorio para evaporación de metanol y agua.

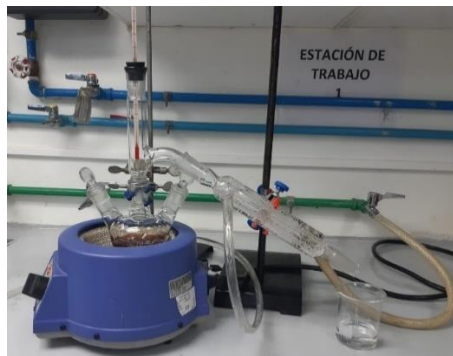


Figura 43. Separación de la fase de ácidos grasos y la fase acuosa con glicerina empleando una ampolla de decantación.

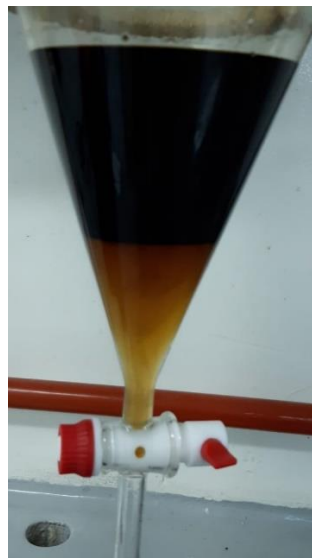


Figura 44. Producto final obtenido del proceso de purificación de glicerol mostrado en la Figura 5 en resultados.

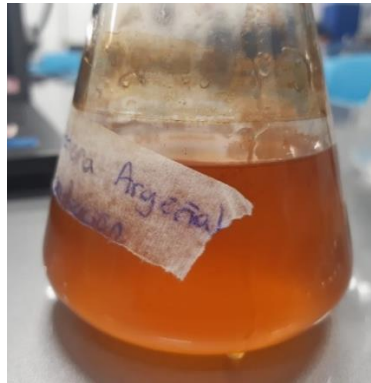


Figura 45. Representación de la cuadrícula de la cámara de Neubauer empleada para los conteos celulares.

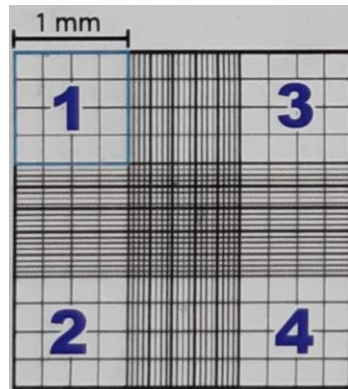


Figura 46. Muestras de conteo celular utilizando la cámara de Neubauer.

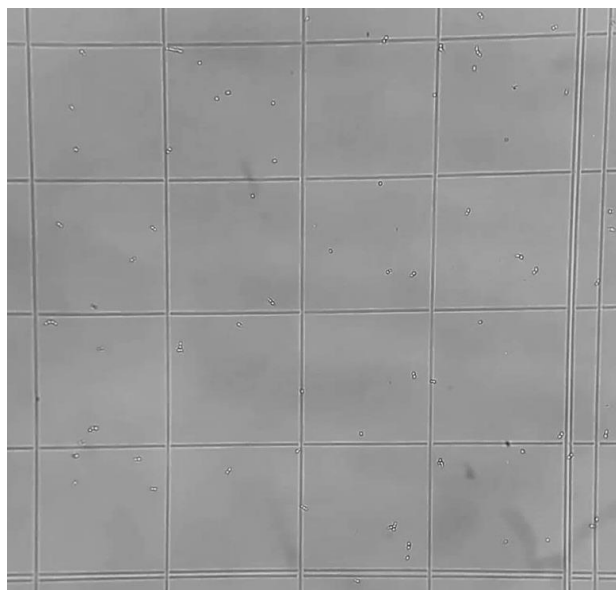


Figura 47. Sistema armado en el laboratorio para filtraciones al vacío.



Figura 48. Cristales recuperados del proceso de extracción y purificación de ácido cítrico a partir del medio post fermentativo.



Figura 49. Cristales recuperados de la filtración al vacío posterior al proceso de extracción y purificación.

