

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

“Producción microbiana de aceite a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiesel a nivel de laboratorio”

Trabajo de graduación presentado por Mariela Calmo Blanco para optar al grado académico de Licenciatura en Ingeniería Química

Guatemala  
2010



“Producción microbiana de aceite a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiesel a nivel de laboratorio”

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

“Producción microbiana de aceite a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiesel a nivel de laboratorio”

Trabajo de graduación presentado por Mariela Calmo Blanco para optar al grado académico de Licenciatura en Ingeniería Química

Guatemala  
2010

Vo.Bo:

(f) \_\_\_\_\_  
Ing. Oscar Armando Maldonado Ordóñez  
Colegiado No. 90

Tribunal Examinador:

(f) \_\_\_\_\_  
Ing. Gamaliel Zambrano Ruano  
Colegiado No. 686

(f) \_\_\_\_\_  
Ing. Victor Alvarado Ruiz  
Colegiado No. 1346

(f) \_\_\_\_\_  
Ing. Oscar Maldonado Ordóñez  
Colegiado No. 90

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre del 2010

# CONTENIDO

CONTENIDO .....	VI
LISTA DE CUADROS .....	VIII
LISTADO DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE GRÁFICOS .....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT .....	XVII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
A. GLICERINA COMO SUBPRODUCTO DE LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL.....	2
B. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA GLICERINA.....	3
C. USOS ALTERNATIVOS DEL GLICEROL O GLICERINA .....	5
1. Combustible en calderas.....	5
2. Fertilizante para suelos.....	5
3. Suplemento en la producción de alimentos balanceados.....	5
4. Otras alternativas.....	5
D. TRATAMIENTO DE LA GLICERINA PROVENIENTE DE LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL.....	6
E. LEVADURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE.....	6
F. MEDIOS DE CULTIVO.....	8
1. Condiciones de cultivo para levaduras productoras de aceite .....	8
2. Fuente de carbono alternativas para el crecimiento de levaduras.....	8
3. Caldo Sabouraud .....	9
G. PROCESO DE FERMENTACIÓN .....	10
1. Propagación de cultivos .....	11
2. Fermentación.....	11
3. Operaciones y proceso de separación y purificación de los productos.....	12
4. Tratamiento de efluentes .....	12
H. TIPO DE FERMENTADORES.....	13
1. Fermentación discontinua (Batch).....	13
2. Fermentación alimentada (fed-batch).....	13
3. Fermentación continua .....	13
I. RENDIMIENTO DE UN PROCESO MICROBIOLÓGICO.....	14

1.	Rendimiento o conversión del sustrato en células ( <i>YS</i> ).....	14
2.	Rendimiento de oxígeno ( <i>YO</i> ).....	14
3.	Rendimiento calorífico ( <i>YKcal</i> ) .....	15
J.	FUENTES DE ACEITE PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	15
K.	PERSPECTIVA DE LOS ACEITES MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	15
L.	EXTRACCIÓN DE ACEITE (MÉTODO SOXHLET) .....	16
1.	Selección del solvente .....	16
2.	Características de la matriz.....	17
3.	Condiciones de operación .....	17
M.	PRUEBA O TEST Q.....	17
III.	JUSTIFICACIÓN .....	19
IV.	OBJETIVOS .....	20
A.	GENERALES .....	20
B.	ESPECÍFICOS .....	20
V.	PROBLEMA A RESOLVER.....	21
VI.	METODOLOGÍA.....	22
A.	PRUEBAS EN FRASCOS DE CULTIVO .....	22
B.	PRUEBAS EN REACTOR .....	23
C.	COSTOS.....	23
VII.	RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	24
VIII.	DISCUSIÓN .....	35
IX.	CONCLUSIONES.....	42
X.	RECOMENDACIONES.....	43
XI.	BIBLIOGRAFÍA .....	44
XII.	APÉNDICE .....	46
A.	PROCEDIMIENTO .....	46
B.	DATOS ORIGINALES .....	53
C.	CÁLCULOS DE MUESTRA .....	58
D.	DATOS CALCULADOS .....	65
E.	ANÁLISIS DE ERROR.....	77
F.	GRÁFICAS .....	81
G.	ILUSTRACIONES .....	83

## LISTA DE CUADROS

Cuadro No. 1: Datos generales de la glicerina comercial.....	4
Cuadro No. 2: Propiedades físicas de la glicerina comercial .....	4
Cuadro No. 3: Producción de aceite de diferentes levaduras .....	6
Cuadro No. 4: Rendimiento de aceite y biomasa de diferentes levaduras.....	7
Cuadro No. 5: Parámetros de crecimiento y contenido de lípidos de <i>Lipomyces Starkeyi</i> utilizando glucosa en frascos agitado.....	7
Cuadro No. 6: Composición de ácidos grasos producidos por diferentes levaduras .....	7
Cuadro No. 7: Composición del medio de caldo Sabouraud.....	9
Cuadro No. 8: Principales materias primas para la elaboración de biodiesel.....	15
Cuadro No. 9: Valores críticos para el cociente de rechazo, Q .....	18
Cuadro No. 10: Caracterización de las cepas de levaduras (CBS y NCYC) .....	22
Cuadro No. 11: Abreviaturas de nombre de cepas de levaduras y medios de cultivo .....	24
Cuadro No. 12: Crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> (LS), <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL), <i>Rhodotorula glutinis</i> (RG) y <i>Rhodospiridium toruloides</i> (RT) en caldo Sabouraud 2% .....	24
Cuadro No. 13: Crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> (LS) y <i>Rhodospiridium toruloides</i> (RT) en caldo Sabouraud 2% y glicerina USP .....	25
Cuadro No. 14: Crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> (LS) y <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL) en caldo Sabouraud 2% .....	25
Cuadro No. 15: Crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> (LS) en fermentador de 5 L utilizando caldo Sabouraud 2% .....	29
Cuadro No. 16: Costo total de la producción de aceites microbianos con <i>Lipomyces Starkeyi</i> en un fermentador de 5 L utilizando Caldo Sabouraud como medio de cultivo .....	32
Cuadro No. 17: Código de equipo presentado en el balance de masa y energía .....	33
Cuadro No. 18: Especificación del equipo utilizada en pruebas a nivel laboratorio .....	51
Cuadro No. 19: Datos obtenidos para la elaboración de la curva patrón a base de glucosa, absorbancia leída a una longitud de onda de 540 nm .....	53
Cuadro No. 20: Datos obtenidos para la elaboración de la curva patrón a base de glicerina USP utilizando cromatografía de capa líquida de alta resolución.....	53
Cuadro No. 21: Peso seco celular de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.....	54

Cuadro No. 22: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud. ....	54
Cuadro No. 23: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> provenientes del crecimiento en caldo Sabouraud en frascos de cultivo. ....	55
Cuadro No. 24: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento de las levaduras <i>Lipomyces Starkeyi</i> y <i>Rhodospordium toruloide</i> en caldo Sabouraud .....	55
Cuadro No. 25: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras <i>Lipomyces Starkeyi</i> y <i>Rhodospordium toruloide</i> provenientes del crecimiento en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP.....	56
Cuadro No. 26: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras <i>Lipomyces Starkeyi</i> y <i>Yarrowia Lipolytica</i> en caldo Sabouraud.....	56
Cuadro No. 27: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras <i>Lipomyces Starkeyi</i> y <i>Yarrowia Lipolytica</i> provenientes del crecimiento en frascos de cultivo en caldo Sabouraud. ....	56
Cuadro No. 28: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en un fermentador de la levadura <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud.....	57
Cuadro No. 29: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por la levadura <i>Lipomyces Starkeyi</i> provenientes de la fermentación en caldo Sabouraud.....	57
Cuadro No. 30: Concentración de glucosa nivel reactivo para la elaboración de una curva patrón y absorbancia leída a una longitud de onda de 540 nm corregido con el blanco. ....	65
Cuadro No. 31: Peso seco celular obtenido del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> en medio con glicerina proveniente de la producción de biodiesel.....	65
Cuadro No. 32: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Rhodospordium Toruloides</i> , <i>Rhodotorula Glutinis</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud.....	66
Cuadro No. 33: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Rhodospordium Toruloides</i> , <i>Rhodotorula Glutinis</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud.....	66

Cuadro No. 34: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Rhodospordium Toruloides</i> , <i>Rhodotorula Glutinis</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud. ....	67
Cuadro No. 35: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras <i>Rhodospordium Toruloides</i> y <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP. ....	67
Cuadro No. 36: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Lipomyces starkeyi</i> en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP. ....	68
Cuadro No. 37: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de las levaduras <i>Rhodospordium Toruloides</i> y <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud (CS) y caldo simulado con glicerina USP (GUSP) ....	68
Cuadro No. 38: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> y <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud. ....	69
Cuadro No. 39: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> y <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud. ....	69
Cuadro No. 40: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de las levaduras <i>Yarrowia Lipolytica</i> y <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud. ....	69
Cuadro No. 41: Parámetros obtenidos de los crecimientos en frascos de cultivo de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, durante la fase 1. ....	70
Cuadro No. 42: Parámetros obtenidos de los crecimientos en frascos de cultivo de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, durante la fase 2. ....	70
Cuadro No. 43: Media, desviación estándar y mediana de los parámetros obtenidos de las pruebas de crecimiento en frascos de cultivo de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa. ....	71
Cuadro No. 44: Percentil de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa. ....	72
Cuadro No. 45: Análisis estadístico para trazado de diagrama de cajas de los datos de biomasa obtenida en los crecimientos a nivel frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospordium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa. ....	73

Continuación cuadro No. 46: Análisis estadístico para trazado de diagrama de cajas de los datos de biomasa obtenida en los crecimientos a nivel frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa. ....	74
Cuadro No. 47: Prueba Q de puntos atípicos de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, utilizada para obtener medias y desviaciones estándar. ....	74
Continuación cuadro No. 48: Prueba Q de puntos atípicos de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de <i>Yarrowia Lipolytica</i> , <i>Lipomyces Starkeyi</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i> utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, utilizada para obtener medias y desviaciones estándar. ....	75
Cuadro No. 49: Parámetros obtenidos del crecimiento en un fermentador de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud durante 144 horas. ....	75
Cuadro No. 50: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en un fermentador de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud durante 144 horas. ....	76
Cuadro No. 51: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del crecimiento en un fermentador de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en caldo Sabouraud durante 144 horas. ....	76
Cuadro No. 52: Potencia consumida y costo eléctrico de una fermentación en el reactor de 5 L. ....	76
Cuadro No. 53: Costo total de producción de aceites microbianos en utilizando un fermentador de 5 L. ...	77

## LISTADO DE FIGURAS

Figura No. 1: Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel. ....	2
Figura No. 2: Estructura del glicerol .....	3
Figura No. 3: Esquema general de un proceso de fermentación.....	12
Figura No. 4: Diagrama de flujo con balance de masa y energía de la producción de aceites microbianos a escala laboratorio .....	34
Figura No. 5: Procedimiento experimental.....	46
Figura No. 6: Diagrama de entradas y salidas de la fermentación para la producción de biomasa. ....	47
Figura No. 7: Diagrama de entradas y salidas extracción de aceites microbianos .....	48
Figura No. 8: Diagrama de procedimiento de siembra de levadura en frascos de cultivo. ....	49
Figura No. 9: Diagrama de procedimiento de siembra de levadura en fermentador 5 litros .....	50
Figura No. 10: Crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.....	83
Figura No. 11: <i>Yarrowia lipolytica</i> vista microscópica, crecimiento en glicerina proveniente de la producción de biodiesel .....	83
Figura No. 12: <i>Yarrowia lipolytica</i> vista microscopica.....	84
Figura No. 13: <i>Yarrowia lipolytica</i> vista microscopica, crecimiento en glicerina USP .....	84
Figura No. 14: <i>Yarrowia lipolytica</i> vista microscopica, crecimiento en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.....	85
Figura No. 15: Crecimiento de <i>Yarrowia Lipolytica</i> en Caldo Sabouraud durante 144 horas. ....	85
Figura No. 16: Crecimiento de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en Caldo Sabouraud durante 144 horas.....	86
Figura No. 17: Crecimiento de <i>Rhodospordium Toruloides</i> en Caldo Sabouraud durante 144 horas. ....	86
Figura No. 18: Crecimiento de <i>Rhodotorula Glutinis</i> en Caldo Sabouraud durante 144 horas.....	87
Figura No. 19: Crecimiento de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en Caldo Sabouraud 2% glucosa.....	87
Figura No. 20: Crecimiento de <i>Rhodospordium toruloides</i> en Caldo Sabouraud 2% glucosa.....	88
Figura No. 21: Crecimiento de <i>Lipomyces Starkeyi</i> y <i>Rhodospordium Toruloides</i> en medio que contenía glicerina USP. ....	88
Figura No. 22: Esterilización del fermentador de 5 L .....	89
Figura No. 23: Crecimiento de <i>Lipomyces Starkeyi</i> en un fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa. ....	90
Figura No. 24: Biomasa seca de <i>Lipomyces Starkeyi</i> obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa. ....	91

Figura No. 25: Trituración manual de la biomasa de <i>Lipomyces Starkeyi</i> obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa. ....	91
Figura No. 26: Extracción de aceite de la levadura <i>Lipomyces Starkeyi</i> obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa., utilizando el sistema Soxhlet .....	92
Figura No. 27: Crecimiento en frascos de <i>Lipomyces Starkeyi</i> utilizando en el medio glicerina USP .....	93
Figura No. 28: Crecimiento en frascos de <i>Lipomyces Starkeyi</i> utilizando en el medio glicerina proveniente de la producción de biodiesel .....	93

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica No. 1. Dispersión de biomasa (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% .....	25
Gráfica No. 2. Dispersión de pH del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% .....	26
Gráfica No. 3. Dispersión de glucosa consumida (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% .....	26
Gráfica No. 4. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa levadura) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3), RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% .....	27
Gráfica No. 5. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa glucosa) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% .....	27
Gráfica No. 6. Diagrama de cajas de la biomasa (g/L) obtenida del crecimiento en frascos de cultivo utilizando Caldo Sabouraud .....	28
Gráfica No. 7. Diagrama de cajas del porcentaje de rendimiento de lípidos (masa lípidos/ masa levadura) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2% .....	28
Gráfica No. 8. Diagrama de cajas del porcentaje de lípidos (masa lípidos/ masa glucosa) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2% .....	29
Gráfica No. 9: Crecimiento celular de <i>Lipomyces starkeyi</i> durante 144 horas en un fermentador de 5L.....	30
Gráfica No. 10: Porcentaje de rendimiento de biomasa obtenida durante el crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> durante 144 horas en un fermentador de 5 L en caldo Sabouraud 2% .....	30
Gráfica No. 11: Glucosa no consumida de <i>Lipomyces starkeyi</i> durante el crecimiento en un fermentador de 5L durante 144 horas en caldo Sabouraud. ....	31
Gráfica No. 12: Glucosa consumida durante el crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> durante el crecimiento en un fermentador de 5L en 144 horas en caldo Sabouraud 2% .....	31
Gráfica No. 13: pH durante el crecimiento de <i>Lipomyces starkeyi</i> durante 144 horas en un reactor de 5 litros con caldo Sabouraud 2% .....	32
Gráfica No. 14. Curva patrón a base de glucosa para ser utilizada en el Método de ácido dinitrosalicílico.....	81
Gráfica No. 15. Curva patrón a base de glicerina USP para identificar cantidad de glicoles no consumidos.....	82

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación es la producción de aceites microbianos utilizando levaduras lipolíticas teniendo como fuente principal de carbono, el glicerol o glicerina proveniente de la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales mediante el proceso de trans-esterificación; para lo cual se utilizaron cuatro especies las cuales fueron *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis*.

Inicialmente se utilizó un medio de cultivo de caldo Sabouraud 2% de glucosa para aprender las técnicas preliminares de reproducción de las cepas y mantenimiento de las mismas. Posteriormente se empleó un caldo de cultivo simulado formado por peptona de carne, triptona de caseína siendo la fuente de carbono glicerina USP\* y glicerina proveniente de la producción de biodiesel, en la misma proporción que se encuentra presente la glucosa en el caldo Sabouraud.

La primera fase consistió en la selección de las levaduras que mayor porcentaje de lípidos por masa de levadura produjera, para lo cual se realizó una fermentación en frascos agitados con caldo Sabouraud al 2% como medio de cultivo. Las especies que presentaron mayor porcentaje de lípidos fueron *Lipomyces starkeyi* y *Rhodospiridium toruloides* con valores de 29.64% y 24.10% respectivamente.

Como segunda fase se procedió a realizar pruebas experimentales de cultivo de levaduras con caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP\*. En esta fase no se obtuvo resultados similares a los anteriores; por lo tanto, se procedió a repetir la selección pero en esta ocasión únicamente se siguió trabajando con *Yarrowia lipolytica* y *Lipomyces starkeyi* debido a que las otras dos levaduras no se lograron reproducir. En estas pruebas de crecimiento se llegó a obtener resultados mayores de producción de aceite para *Lipomyces starkeyi* (4.61%).

Se realizó una prueba experimental en un fermentador de 5 litros para verificar los resultados obtenidos en los frascos agitados y se obtuvo un contenido de aceite bastante bajo, del orden de 0.69%. Lo que se pudo derivar a que el sistema de extracción por solvente es sensible a errores, debido que a nivel frascos se trabaja con cantidades de biomasa muy pequeñas.

Por limitación de tiempo se prosiguió trabajando con *Lipomyces starkeyi* y se procedió a sembrar en medio simulado con glicerina USP\* y glicerina proveniente de la producción de biodiesel. En esta

ocasión se verificó con el microscopio si había presencia de células, las cuales fueron mínimas en el caso de los frascos con medio simulado utilizando glicerina UPS<sup>\*</sup>; por lo tanto, no se logró continuar con todos los análisis planificados que se habían venido realizando con las otras pruebas. Además, se observó presencia de esporas. En el caso de las pruebas experimentales con glicerina proveniente de la producción de biodiesel no se detectó crecimiento de levaduras.

*\*United States Pharmacopeia*

## ABSTRACT

The main purpose of this research is the production of microbial oils using lipolytic yeasts using as main carbon source glycerol or glycerin from biodiesel production from vegetable oils through the process of trans-esterification. For this, four species were used, namely *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium torulooides* and *Rhodotorula glutinis*.

Initially broth culture medium, Sabouraud 2% glucose, was used to learn the techniques of reproducing preliminary strains and their preservation. Later a simulated broth was used, consisting of meat peptone, tryptone casein, USP\* glycerin as the carbon source and glycerin from biodiesel production, in the same proportion as glucose is present in the Sabouraud broth.

The first step was the selection of yeast with the highest percentage of lipids produced by yeast mass, for which a shake-flask fermentation with Sabouraud 2% broth was used as a culture medium. The species with highest lipid yield were *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium torulooides* valued 29.64% and 24.10% respectively.

As second step, experimental tests were performed of yeast cultures with Sabouraud broth and simulated USP\* glycerol broth.. At this stage, yielded results now similar to the above; therefore, proceeded to repeat the selection but this time only continued to work with *Yarrowia lipolytica* and *Lipomyces starkeyi* because the other two yeasts are not able to reproduce. In these growth tests results, *Lipomyces starkeyi* produced more oil (4.61%).

Experimental tests were performed on a 5 liter fermenter to verify the results obtained in shaken flasks. At this scale, a very low oil content was obtained, namely 0.69%. Which means that the solvent system is sensible to mistakes due to small amounts of biomass required at flask level.

By limitation of time, *Lipomyces starkeyi* was the only strain worked with any further, At this point, growth was studied under a simulated medium with USP\* glycerin and glycerin from biodiesel production. Furthermore, it was observed under the microscope if there was presence of yeast cells, which were minimal in the case of the simulated medium using USP\* glycerin. Therefore, it was not possible to proceed with all the analysis that had been planned but were executed with other tests. In addition, the

presence of spores was observed. In the case of the flasks with simulated medium using glycerin from biodiesel production, no yeast growth was detected.

*\*United States Pharmacopeia*

# I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la problemática de contaminación ambiental asociada al uso de los derivados del petróleo aumenta; por lo tanto, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda y desarrollo de fuentes de provisión de combustibles de tipo renovable que permitan reemplazarlos de manera gradual y dar cumplimiento a regulaciones ambientales que aplican en la mayoría de países del mundo. Por esta razón, se desarrollaron los biocombustibles, dicho término se utiliza para cualquier tipo de combustible que se derive de biomasa (organismos recientemente vivos o sus desechos metabólicos) (Aimeretti *et.al*, 2008: 3).

El biocombustible más conocido es el biodiesel, se puede obtener partiendo de materias primas como aceites vegetales, animales, grasas de frituras usadas, hidróxido de sodio o potasio y metanol o etanol. En la producción de biodiesel se obtiene glicerina como subproducto, se produce aproximadamente un 10% en peso del biodiesel elaborado. La glicerina obtenida de este proceso puede ser refinada para obtener un producto con valor agregado, ésta es comercializable en la industria química, farmacéutica y cosmética. Algunos usos que tiene la glicerina refinada son: plastificante, solvente, edulcorante, suavizante, en la producción de nitroglicerina, cosméticos, jabonería, licores, lubricante, tintas, anticongelante, producción de resinas, esteres, humectante, emulsionantes, entre otros (Larosa, 2001:1).

Aunque la refinación es una opción, no es una de las mejores debido al elevado costo del proceso; por lo tanto, los investigadores han concentrado esfuerzos para encontrar otras opciones para generar productos o procesos en donde se utilice la glicerina proveniente de la producción de biodiesel, sin recurrir a pre-tratamiento costosos como lo es la refinación.

La glicerina puede convertirse biológicamente por medio de microorganismo lipolíticos, en un “aceite microbiano” que tiene características similares a los aceites vegetales.

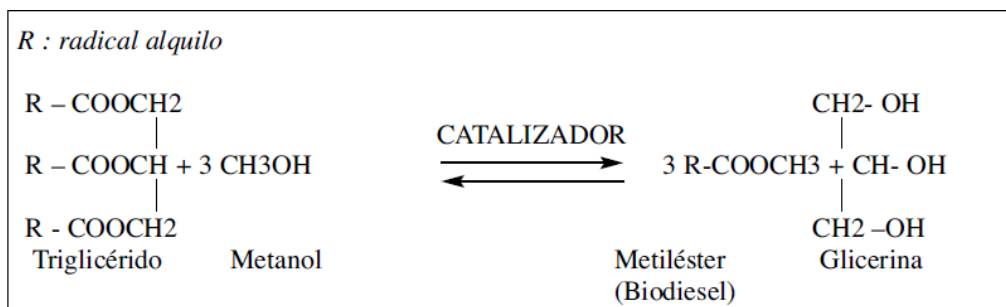
En este proyecto se realizaron pruebas de producción de aceites microbianos a nivel laboratorio para conocer la posibilidad de utilizar glicerina proveniente de la producción de biodiesel como fuente de carbono. Se espera que este trabajo pueda servir como guía para futuros estudios y proyectos relacionados con el tema.

## II. ANTECEDENTES

### A. Glicerina como subproducto de la producción de biodiesel

Debido a que el costo final de un producto es fundamental para los fines de poder determinar la viabilidad de su proceso de producción, el aprovechamiento de los subproductos es muy importante debido a que permite reducirlo. En el caso de la producción de biodiesel, que son ésteres metílicos ó etílicos obtenidos por transesterificación de grasa y aceite con metanol o etanol; en dicho proceso, como se puede observar en la Figura No. 1, la glicerina es el principal subproducto. La calidad de la glicerina obtenida es fundamental para plantear procesos con el fin de su aprovechamiento (Aimeretti, 2008:138).

Figura No. 1: Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel.



Luego de la reacción de transesterificación, la glicerina debe ser removida de los metilésteres o etilésteres debido a que si se encuentran libres en el combustible en cantidades superiores a las exigidas por la norma, podrían causar inconveniente en los filtros de combustible y en la combustión (Aimeretti, 2008:138).

Debido a que la glicerina tiene baja solubilidad en los metilésteres, la separación es rápida y puede llevarse a cabo por diferentes métodos, como decantación o centrifugación (Aimeretti, 2008:138).

Después de la separación, la mayor cantidad de glicerina se encuentra en la fase inferior debido a su mayor densidad, puede alcanzar una concentración del 50 a 70%. Los demás componentes de esta misma fase son: metanol sin reaccionar, parte del catalizador utilizado y jabones formados por la reacción entre los ácidos grasos libres y el hidróxido de sodio. Debido a esto, el valor comercial de la glicerina en este estado es bajo y la eliminación de sus contaminantes es dificultosa. Además, el

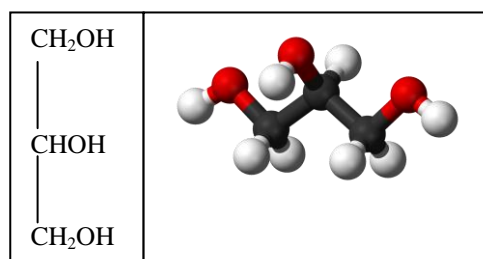
contenido de metanol o etanol hace que esta glicerina sea considerada como desecho peligroso (Aimeretti, 2008:138).

El primer paso para purificar la glicerina es la eliminación de los jabones utilizando un ácido mineral obteniendo ácidos grasos libres y sus sales, luego se remueve el metanol mediante un proceso de destilación flash al vacío u otro tipo de evaporación. De esta forma se obtiene glicerina con una pureza aproximada del 85% que puede ser vendida a refinerías. Si se requiere un producto de mayor pureza, se puede obtener mediante un proceso de destilación por alto vacío o intercambio iónico, logrando una concentración que puede alcanzar el 99.7% (grado alimenticio) (Aimeretti, 2008:139).

## B. Características y propiedades de la glicerina

El compuesto glicerol corresponde al compuesto químico 1,2,3 propanotriol, dicha molécula está compuesta por tres átomos de carbono, ocho de hidrógeno y tres de oxígeno unidos mediante enlaces simples (Aimeretti, 2008:140)

Figura No. 2: Estructura del glicerol



Entre sus propiedades físicas y químicas se puede mencionar que se trata de un compuesto orgánico, líquido, viscoso, incoloro, de sabor dulce. Sus propiedades solventes son similares a las del agua o alcoholes alifáticos simples, es insoluble en hidrocarburos, alcoholes de cadenas largas, grasas y solventes halogenados; la solubilidad de gases u otros líquidos en glicerol dependen de la temperatura y la presión (Aimeretti, 2008:140).

En condiciones neutras o alcalinas se puede calentar hasta 275°C sin formar gases tóxicos como la acroleína, pero en presencia de un ácido fuerte, ésta se forma a 160°C. A temperatura ambiente es muy hidróscópica y al superar los 180°C el glicerol comienza a deshidratarse formando poligliceroles (Aimeretti, 2008:140).

Dadas estas propiedades, la glicerina de alta calidad posee diversos y numerosos usos, entre los cuales se pueden destacar: la elaboración de resinas alquiflicas, productos de limpieza, medicinas,

explosivos, etc. También se utiliza como plastificante para celofán, humidificante para productos alimenticios o derivados del tabaco, lubricante para las máquinas procesadoras de alimentos, entre otros (Aimeretti, 2008:140).

A continuación se presentan los datos generales y propiedades físicas de la glicerina comercializada actualmente en el mercado (Productos químicos Monterrey, 1998:1)

Cuadro No. 1: Datos generales de la glicerina comercial

Datos generales	
Nombre comercial	Glicerina
Nombre químico	Glicerol
Sinónimos	1,2,3 propanotriol, Trehidroxipropano, alcohol glicil
Familia química	Alcoholes
Peso molecular	92.09 g/mol
Fórmula estructural	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>

(Productos químicos Monterrey, 1998:1)

Cuadro No. 2: Propiedades físicas de la glicerina comercial

Propiedades físicas	
Temperatura de fusión	18°C
Temperatura de ebullición	291°C
Presión de vapor @ 50°C	0.0025 mmHg
Densidad relativa	1.269@20°C (agua=1)
Densidad de vapor	3.17 (aire =1)
Solubilidad en agua (g/mL)	Miscible
Reactividad en agua	Ninguno
Estado físico, color y olor	Líquido almibarado claro, incoloro e inodoro
Velocidad de evaporación	Muy bajo (butil acetato =1)
Punto de inflamación	199°C
Temperatura de autoignición	370°C

(Productos químicos Monterrey, 1998:1)

## C. Usos alternativos del glicerol o glicerina

Debido a que la producción de biodiesel aumenta, el exceso de oferta de glicerina también. Además, como se mencionó anteriormente la glicerina obtenida de dicho procesos tiene baja calidad; por lo tanto, no puede ser utilizada para productos alimenticios, farmacéuticos o cosméticos (Naresh, 2006:2).

Por lo tanto, para resolver dicha problemática, investigadores de todo el mundo han estado evaluando diversas alternativas; algunas de ellas se mencionan a continuación:

1. Combustible en calderas. Utilizando mezclas con diesel u otro combustible y quemarlas dentro de la caldera. El uso de glicerina cruda como combustible primario tiene el riesgo, debido a su descomposición, de formar gases tóxicos como la acroleína, que es un carcinógeno fuerte. Debido a esto, es necesario que se mezcle con otros combustibles para obtener una temperatura de llama más alta, desapareciendo así la posibilidad de formación de dicho componente carcinógeno (Aimeretti, 2008:140).

2. Fertilizante para suelos. En este caso es necesario utilizar hidróxido de potasio (KOH) como catalizador de la reacción de transesterificación de modo que al realizar el tratamiento para eliminar jabones se obtenga sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) o fosfato dipotásico ( $PO_4HK_2$ ) según se utilice ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) como ácidos minerales de neutralización. Ésta opción es mucho más simple, pero es importante un control adecuado del pH para no afectar el desarrollo bacteriano en el suelo (Aimeretti, 2008:140).

3. Suplemento en la producción de alimentos balanceados. Para este fin el catalizador que se debe usar es hidróxido de sodio (NaOH) y se debe neutralizar con ácido clorhídrico (HCl) para obtener cloruro de sodio (NaCl). El consenso general, debido a que no existe reglamentación, es que el glicerol en bruto puede ser de hasta un 15 % en una dieta de rumiantes. En el caso particular de las vacas lecheras, se ha observado un aumento en la producción de leche y en su contenido de proteína (Aimeretti, 2008:141).

4. Otras alternativas. Algunas alternativas estudiadas son la producción de propilenglicol, producción de ácidos grasos omega 3, producción de bioetanol, producción de aditivos oxigenados, uso como medio dieléctrico, conversión de glicerol en productos útiles como 1,3-propanodiol, 1,2 propanodiol, dihidroxiacetonas, hidrógeno, poligliceroles, ácido succínico, poliésteres, entre otros (Aimeretti, 2008:140),(Naresh, 2006:2).

## D. Tratamiento de la glicerina proveniente de la producción de biodiesel

La glicerina proveniente de la producción de biodiesel contiene alcohol sin reaccionar, residuos de catalizador, jabones y otros contaminantes. Por lo tanto, el tratamiento previo dependerá del uso que se le dará. Debido a que uno de los objetivos de este trabajo es su uso para fermentación, el tratamiento que se encontró en la literatura es el siguiente (Cameron Douglas y J. Koutsky, 1994:9):

1. Ajustar el pH a 6 ó 7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
2. Someter la glicerina a 240°C durante 20 minutos en una autoclave (esto da lugar a la formación de una gran cantidad de precipitado y una pequeña capa de éster metílico).
3. Remover por decantación la capa de éster que se formó.
4. Centrifugar el material restante por 10 minutos a 12,000 revoluciones por minuto (rpm).

El material resultante puede oscilar entre 50-65% de glicerol. Este pretratamiento puede ser innecesario para la fermentación comercial (Cameron Douglas y J. Koutsky, 1994:9).

## E. Levaduras para la producción de aceite

Existen muchas especies de levaduras tales como *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulan* y *Yarrowia lipolytica*, que son capaces de acumular aceite bajo ciertas condiciones de cultivo y se reporta que cada especie pueden acumular diferentes cantidades de aceite. En la Tabla No. 1 se puede observar el rendimiento y coeficiente de lípidos obtenidos de cada especie, reportado por diferentes autores. (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754)

Cuadro No. 3: Producción de aceite de diferentes levaduras

Especie	Rendimiento de lípidos (g/L)	Coficiente de lípidos (%)	Referencia
R. toruloides	13.8	22.7	Li <i>et al.</i> (2006)
L. starkeyi	5.9	20.4	Liu <i>et al.</i> (2000)
L. starkeyi	9.99	14	Kong <i>et al.</i> (2007)
L. starkeyi	6.89	11	Kong <i>et al.</i> (2007)
R. glutinis	7.19	13	Shi <i>et al.</i> (2006)
T. fermentans	5.32	8.42	Kazuyoshi <i>et al.</i> (2006)
C. curvatus	37.1	-	Mainul <i>et al.</i> (1996)

(Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754)

Cuadro No. 4: Rendimiento de aceite y biomasa de diferentes levaduras.

Especie	Fermentación	Biomasa (g/L)	Contenido de lípidos % (p/p)	Rendimiento de lípidos (g/L)	Referencia
R. toruloides	Frasco	18.2	76.1	13.9	Li <i>et al.</i> (2006)
R. toruloides	Fermentador agitado	106.5	67.5	71.89	Li <i>et al.</i> (2007)
L. starkeyi	Frasco	19.0	52.6	9.99	Kong <i>et al.</i> (2007)

(Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754)

Cuadro No. 5: Parámetros de crecimiento y contenido de lípidos de *Lipomyces Starkeyi* utilizando glucosa en frascos agitado.

Relación C:N	Rendimiento celular m celular/m glucosa (g/g)	Contenido de lípidos (%)	Rendimiento de lípidos m(lípidos)/m(glucosa) (g/g)
19.8	0.44	19.4	0.09
39.7	0.38	22.1	0.09
61.2	0.29	20.0	0.10

(Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754)

Los principales ácidos grasos presentes en los aceites de levaduras son ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico y ácido linolénico. Según la literatura los aceites de levadura se pueden utilizar como materia prima para la producción de biodiesel con catálisis ya sea con lipasa o catálisis química (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

Cuadro No. 6: Composición de ácidos grasos producidos por diferentes levaduras

Especie	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoléico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido Linoléico (C18:2)	Ácido linolénico (C18:3)
L. starkeyi	33.0	4.8	4.7	55.1	1.6	n.d.
R. toruloides	24.3	1.1	7.7	54.6	2.1	n.d.
R. glutinis	18	1	6	60	12	2
Y. lipolytica	11	6	1	28	51	1

n.d. No determinado

(Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754)

## F. Medios de cultivo

El microorganismo requiere para su crecimiento de una fuente de energía y de fuentes de materia, en la mayoría de las fermentaciones industriales la fuente de energía y la de materia son la misma (glucosa), pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas por la composición interna del organismo (Quintero, 1981:27).

1. Condiciones de cultivo para levaduras productoras de aceite. Las condiciones de cultivo como la relación de carbono (C)/nitrógeno (N), los recursos de nitrógeno, temperatura, pH, oxígeno y concentración de sales inorgánicas tienen influencia en la variación de la acumulación de aceite.

Generalmente mientras más componentes de nitrógeno existan en el medio, las células contendrán menor cantidad de aceite. Según estudios realizados, se informa que cuando la relación C/N se incrementó desde 25 a 70, el contenido de aceite aumentó de 18% a 46%. Además, se dice que las diferentes fuentes de nitrógeno, orgánicas e inorgánicas, pueden ser utilizadas para el cultivo de levaduras, pero ambas fuentes tienen influencia en la acumulación de aceite. Según Huang, las fuentes de nitrógeno inorgánico fueron buenas para el crecimiento celular pero no para la producción de aceite, mientras que las fuentes orgánicas como caldo de peptona eran buenas para la producción de aceite pero no para el crecimiento celular (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

Otro estudio presenta que la biomasa y contenido de aceite se puede mejorar significativamente mediante la optimización de concentración de  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . Además, se presenta que la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es la correlación positiva con la acumulación de aceites en la biomasa (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

2. Fuente de carbono alternativas para el crecimiento de levaduras. Buscar otras fuentes de carbono en lugar de la glucosa es muy importante para reducir el costo de los aceites microbianos, especialmente si son aceites que se utilizarán para la producción de biodiesel. Entre algunas fuentes de carbono alternativa para el crecimiento de levaduras con acumulación de aceite se menciona la xilosa, arabinosa, manosa, glicerol, otros productos agrícolas y algunos desechos industriales (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de producción de biodiesel, el principal subproducto es la glicerina; según estudios realizados se informa que algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar el glicerol como fuente de carbono para la acumulación de aceite (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

Con el desarrollo a gran escala de biodiesel, en el futuro, se producirán mayores cantidades de glicerol; por lo tanto, la utilización de glicerol bruto para la producción de aceite de levaduras puede ser otra una investigación interesante y con una amplia perspectiva a la reducción de costo de dichos aceites. Además del glicerol, recientemente se ha tomado en cuenta la utilización de celulosa hidrolizada como fuente de carbono para la producción de aceites microbianos, pero este compuesto contiene algunos componentes tóxicos como ácido acético, ácido fórmico y otros, que pueden influenciar negativamente sobre el crecimiento celular. Por lo tanto, antes de utilizar esta fuente de carbono para la producción de aceites, la desintoxicación es necesaria (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

El uso de fuentes de carbono baratas para la producción de levaduras que acumulan aceite, abre un nuevo camino para la reducción del costo del aceite microbiano, lo cual es muy importante para el aceite que se utilizará para la producción de biodiesel en el futuro ya que esto disminuye el costo del mismo y la factibilidad de su producción (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

3. Caldo Sabouraud. El caldo Sabouraud, conocido también como medio de antibióticos N° 13, se usa para el aislamiento y cultivo de hongos y levaduras (Laboratorios Britania, s.f:1)

Cuadro No. 7: Composición del medio de caldo Sabouraud.

Compuestos	Cantidad (g/L)
Triptona	5.0
Peptona de carne	5.0
Glucosa	20.0

(Laboratorios Britania, s.f:1)

Las peptonas de carne y caseína suministran las fuentes de nitrógeno y carbono necesarios para el crecimiento de bacterias y hongos. La glucosa es la fuente de energía para aquellos organismos capaces de fermentarla. La preparación consiste en suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Laboratorios Britania, s.f:1)

La siembra del organismo dependerá del tipo de organismo. El crecimiento se evidencia por la aparición de turbidez (Laboratorios Britania, s.f:1).

## G. Proceso de fermentación

Las industrias de procesos bioquímicos se encargan del aprovechamiento, bajo condiciones controladas, de materiales biológicos tales como microorganismos, tejidos celular animal, productos microbianos y enzimas. Los procesos asociados con la producción de microorganismo y de algunos productos específicos son importantes comercialmente (Quintero, 1981:17).

A continuación se muestran las características en que se ha basado la utilización de los microorganismos como productores de fermentación.

Microorganismos	Elementos nutrientes	Parámetros
$\left[ \begin{array}{l} \textit{Bacterias} \\ \textit{Levaduras} \\ \textit{Hongos} \\ \textit{Tejido celular} \\ \textit{Entre otros} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{l} \textit{C, H, O, N, S, P} \\ \textit{Metales} \\ \textit{Vitaminas} \\ \textit{Otros} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{l} \textit{C, H, O, N, S, P} \\ \textit{Metales} \\ \textit{Vitaminas} \\ \textit{Otros} \end{array} \right]$

Esto quiere decir que para que una fermentación se realice son necesarios los siguientes requisitos: tener un microorganismo de características idóneas para el procesos o producto de interés, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga los nutrientes esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y por último, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación (Quintero, 1981:18).

Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone, 1994:8)

Fermentación $\longrightarrow$ Microorganismos + O <sub>2</sub> + Productos (intra y extracelulares)
--

La fermentación puede ser aeróbica (cuando se provee al sistema de oxígeno molecular) ó anaeróbica (cuando el oxígeno molecular está ausente) (Quintero, 1981:17).

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el reactor, y que en rigor es el resultado de los llamados efectores intra y extra celulares (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone,1994:8)

Los efectores internos están representados por la dotación genética intrínseca del organismo considerado y por sus mecanismos de regulación metabólica (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone,1994:8).

El comportamiento o expresión fenotípica, o sea lo que realmente se observa como respuesta del microorganismo al medio ambiente en el reactor es, además, el resultado de la influencia de las variables de naturaleza física y química que constituyen los efectores externos (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone, 1994:9).

Los efectores externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los reactores y son por ejemplo la temperatura, la agitación, aireación, etc; es decir, están constituidos por las variables de manipulación física que se fijan o se programan en el curso del proceso de producción (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone,1994:9).

Los efectores externos de naturaleza química están representados por la presencia de los componentes de los medios de fermentación, además del  $O_2$  que puede considerarse un nutriente más. Los componentes de los medios deben cumplir con todos los requerimientos nutricionales y además con los requerimientos específicos que son indispensables para la formación de productos (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone, 1994:9).

En un proceso de fermentación existen cuatro etapas definidas, las cuales son:

1. Propagación de cultivos. Se realiza en el laboratorio y comienza generalmente en un tubo de ensayo que contiene un repique reciente del microorganismo o un tubo liofilizado donde se conserva la cepa de interés o colonia de microorganismos previamente seleccionados. Este material microbiológico se utilizará para aumentar la cantidad del mismo mediante crecimiento en frascos que se agitan dentro de una cámara de cultivo.

2. Fermentación. El material obtenido anteriormente se siembra en el tanque de inóculo que puede tener un volumen de 50, 500 ó 1000 litros, el tamaño dependerá de la industria en que se esté trabajando. Del tanque de inóculo se pasa posteriormente al fermentador industrial cuyo volumen dependerá del producto que se quiere obtener y la concentración que se busca. Algo muy importante

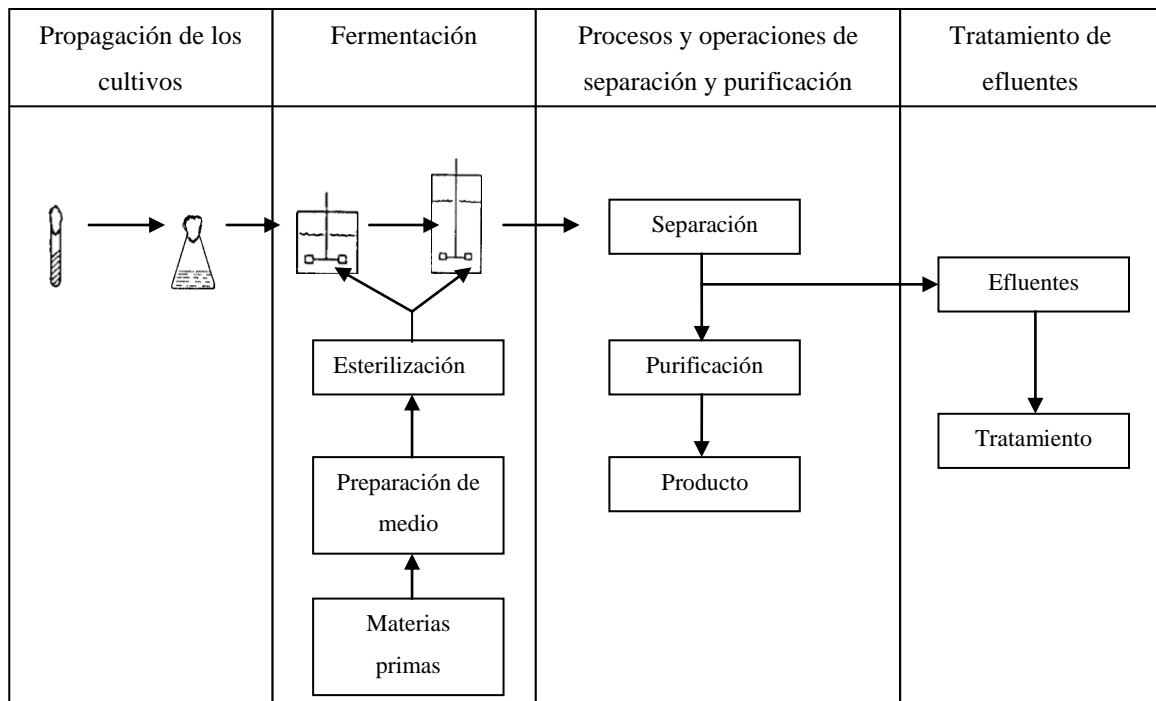
del proceso es la preparación y esterilización de los medios que se lleva a cabo previamente a la inoculación, esto se puede realizar en el tanque de inoculo o en el reactor industrial.

3. Operaciones y proceso de separación y purificación de los productos. Estas etapas se dividen en:

- a. Separación de insolubles por filtración, centrifugación o decantación.
- b. Separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción y ultrafiltración.
- c. Purificación por extracción líquido-líquido, extracción a dos fases acuosas o cromatografía de afinidad.
- d. Aislamiento del producto

4. Tratamiento de efluentes. Esta etapa es imprescindible porque es fundamental controlar la calidad del efluente que sale de la fábrica y que es enviada normalmente a ríos, mares o cualquier extensión hídrica. (Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone, 1994:9)

Figura No. 3: Esquema general de un proceso de fermentación



(Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone, 1994:9)

## H. Tipo de fermentadores

1. Fermentación discontinua (Batch). Una fermentación discontinua puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH (si lo requiere el microorganismo). La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Mateos, sf: 3).

En los procesos comerciales la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios) (Mateos, sf: 3).

2. Fermentación alimentada (fed-batch). Una mejora del proceso cerrado discontinuo es la fermentación alimentada que se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a represión catabólica (efecto glucosa). Por esta razón en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción (Mateos, sf: 3).

3. Fermentación continua. En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema (Mateos, sf: 3).

El objetivo fundamental de la industria de las fermentaciones es minimizar costos e incrementar los rendimientos. Esto puede alcanzarse si se desarrolla el tipo de fermentación más adecuado para cada paso en particular. Si bien los procesos de fermentación continua no se utilizan de forma general en la industria, debido fundamentalmente al mayor nivel de experiencia que se tiene en el crecimiento de células en fermentación discontinua, el coste de producción de biomasa mediante cultivo continuo es potencialmente inferior al de cultivo discontinuo (Mateos, sf: 3).

Aunque muchas fermentaciones para la producción de metabolitos funcionan bien como procesos continuos, sólo unos pocos procesos han resultado útiles para la aplicación práctica por varias razones (Mateos, sf: 3).

## I. Rendimiento de un proceso microbiológico

El rendimiento (Y) de un proceso microbiológico es la razón entre la cantidad de células producidas o productos celulares y el sustrato consumido, éste es muy importante tanto en el diseño como para conocer la variabilidad económica del proceso. Entre los rendimientos que más interesan al que diseña u opera un fermentador son (Quintero, 1981:223):

1. Rendimiento o conversión del sustrato en células ( $Y_S$ ). Éste depende del microorganismo, de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, concentración de oxígeno, entre otras) y del tipo de cultivo (batch o continuo). En el diseño de un medio de cultivo se considera que el valor del rendimiento es constante, pero una vez que se establece la fermentación debe confirmarse. Aunque no se puede predecir teóricamente cuál es el rendimiento de un sustrato, sí se puede indicar cuáles son los rangos de operación más comunes (Quintero, 1981: 223).

Ecuación No. 1

$$Y_S = \frac{\text{gramos de producto}}{\text{gramos de sustrato}}$$

a. Fuente de carbono. Los  $Y_S$  para carbono ( $Y_C$ ) presentan una variación muy grande por lo tanto se debe revisar la literatura para casos particulares.

b. Fuente de nitrógeno. El método más común para medir la proteína, es determinar el nitrógeno total y multiplicarlo por 6.25, obteniéndose lo que se denomina proteína cruda (%N x 6.25 = % proteína celular), contenido proteico mayor que el real. Los rendimientos de nitrógeno están dados por,  $Y_N$  gramos de células/ gramo de nitrógeno alimentado.

c. Fuente de otros nutrientes. El contenido celular de fósforo, azufre, magnesio, sodio, calcio, hierro, entre otros, varía de acuerdo con las condiciones de operación de la fermentación y del producto que se desea obtener.

2. Rendimiento de oxígeno ( $Y_O$ )

Ecuación No. 2

$$Y_O = \frac{\text{gramos de producto}}{\text{gramos de oxígeno}}$$

3. Rendimiento calorífico ( $Y_{Kcal}$ )

Ecuación No. 3

$$Y_{Kcal} = \frac{\text{kilocalorías desprendidas}}{\text{gramos de producto}}$$

## J. Fuentes de aceite para producción de biodiesel

Se puede decir que la producción de biodiesel tiende a provenir mayormente de los aceites extraídos de plantas oleaginosas, especialmente girasol, soja y colza. Sin embargo, cualquier materia que contenga triglicéridos puede utilizarse para la producción de biodiesel (girasol, colza, soja, aceites de fritura usado, sebo de vaca, grasa de pollo, pescado y otros) (Biodisol, sf:1).

Cuadro No. 8: Principales materias primas para la elaboración de biodiesel

Tipo de aceite	Fuentes
Aceites vegetales convencionales	Aceite de girasol Aceite de colza Aceite de soja Aceite de coco Aceite de palma
Aceites vegetales alternativos	Aceite de Brassica carinata Aceite de Cynara cardunculus Aceite de Camelina sativa Aceite de Crambe abyssinica Aceite de Pogonius Aceite de Jatropha curcas
Aceites de semillas modificadas genéticamente	Aceite de girasol de alto oleico
Grasas animales	Sebo de vaca Sebo de búfalo Grasa de pollo Grasa de pescado
Aceites de otras fuentes	Aceites de producciones microbianas Aceites de microalgas

(Biodisol, sf:1)

## K. Perspectiva de los aceites microbianos para la producción de biodiesel

Entre todos los microorganismos heterótrofos, las levaduras (según fuentes de la literatura) muestran ventajas en términos de su tasa de crecimiento rápido y alto contenido de aceite. Además, la optimización y la mejora de las capacidades de levadura de utilizar fuentes de carbono baratas para la

acumulación de aceite es muy importante para la producción de biodiesel en el futuro (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

Generalmente, los aceites microbianos podría convertirse en una de las materias primas potenciales para la producción de biodiesel en el futuro, ya que tiene las siguientes ventajas: es renovable, la tasa de crecimiento es rápida, y no utilizan las tierras para su cultivo. Otras modificaciones a través de ingeniería genética y la ingeniería metabólica tienen mucho potencial para la mejora del rendimiento de los microorganismos productores de aceites (Li, Qiang; D. Wei y L Dehua, 2008: 752-754).

## L. Extracción de aceite (Método Soxhlet)

La extracción es el proceso de separación de una o más sustancias; por medio de esta técnica se pueden separar componentes que se hallan presentes en mezclas sólidas, líquidas y otras (Núñez, 2008: 2).

La extracción con Soxhlet consiste básicamente en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente que va extrayendo de la mezcla, los componentes más solubles en él. Mediante el lavado sucesivo de una mezcla, se pueden extraer componentes cuya solubilidad en el solvente extractante es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones. Un equipo especialmente diseñado para realizar extracciones a partir de mezclas sólidas diversas es el Soxhlet (Núñez, 2008: 2)

Para la extracción con soxhlet se deben tener en cuenta:

1. Selección del solvente. Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables como alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58).

El solvente más utilizado para extraer aceites comestibles de las plantas es el hexano. El hexano tiene un rango en el punto de ebullición bastante estrecho, de aproximadamente 63-69 °C y es un excelente solvente de los aceites en lo que se refiere a su solubilidad y facilidad de recuperación. Sin embargo, el n-hexano, el elemento principal del hexano comercial, está ubicado como el número uno

en la lista de los 189 contaminantes del aire más riesgosos por la Agencia Americana de Protección del ambiente (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58).

El uso de solventes alternativos tales como: isopropanol, etanol, hidrocarburos, e incluso el agua, se ha incrementado debido a asuntos del medioambiente, la salud y preocupaciones de seguridad (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58).

Sin embargo, los solventes alternativos producen a menudo menos recuperación debido a una afinidad molecular disminuida entre el solvente y el soluto. Los costos de los solventes alternativos pueden ser superiores. A veces se agrega un cosolvente para aumentar la polaridad de la fase líquida. Además, se han reportado extracciones de mezclas de isopropanol y el hexano para aumentar el rendimiento y la cinética de extracción (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58).

2. Características de la matriz. La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. Para la extracción total de las grasas de las semillas oleaginosas, según la literatura, para partículas de 0.4 mm la extracción es de 2 horas obteniendo 99% de rendimiento; para partículas de 2.0 mm la extracción puede durar 12 horas para obtener eficiencia similar a la mencionada (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58)

3. Condiciones de operación. Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos. Las altas temperatura de ebullición para la recuperación del solvente pueden disminuirse usando evaporación flash o separación por membrana para recuperar el solvente (Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera, 2007:57-58).

## M. Prueba o Test Q

La prueba Q es una prueba sencilla y muy utilizada en la estadística para decidir si se conserva o rechaza un resultado discordante. En esta prueba se divide el valor absoluto de la diferencia del resultado discordante  $x_q$  y el valor más cercano a él,  $x_n$ , entre la dispersión,  $w$ , de todo el conjunto para obtener la cantidad Q (Skoog, Douglas, et al. 2005: 170-171).

Después, se compara este cociente con los valores críticos  $Q_{crit}$  que se muestran en el Cuadro No.9. Si Q es mayor que  $Q_{crit}$ , el resultado discordante puede rechazarse con el grado de confianza indicado (Skoog, Douglas, et al. 2005: 170-171).

Cuadro No. 9: Valores críticos para el cociente de rechazo, Q

No. observaciones	Q <sub>crit</sub> (rechazar si Q > Q <sub>crit</sub> )		
	Confianza de 90%	Confianza de 95%	Confianza de 99%
3	0.941	0.970	0.994
4	0.765	0.829	0.926
5	0.642	0.710	0.821
6	0.560	0.625	0.740
7	0.507	0.568	0.680
8	0.468	0.526	0.634
9	0.437	0.493	0.598
10	0.412	0.466	0.568

(Skoog, Douglas, *et al.* 2005: 170-171)

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática del cambio climático, investigadores de todo el mundo se han preocupado por generar combustibles alternativos, que al ser comparados con los combustibles fósiles, contaminan en menor proporción.

Uno de estos combustibles es el biodiesel, que posee las mismas propiedades del combustible diesel. El biodiesel se puede producir partiendo de materias primas agrícolas, aceites o grasas de fritura usados y metanol o etanol. Su producción ha aumentado cada año; por lo tanto, también la generación de sus subproductos. El subproducto que se genera en mayor cantidad es la glicerina. La glicerina o glicerol es un compuesto químico que en su estado de purificación adecuado tiene varios usos en la industria química, alimenticia, cosmética, farmacia, entre otras. Pero en el caso de la glicerina proveniente de la producción de biodiesel, ésta no cuenta con las características establecidas para ser utilizada en las industrias antes mencionadas. El costo de purificación es alto; por lo tanto, en los últimos años se han buscado opciones para su uso, como generación de otros compuestos orgánicos con mayor beneficio económico. El esfuerzo por aprovechar al máximo los subproductos del proceso es para aumentar la viabilidad de la producción de biodiesel.

La producción de aceites microbianos a partir de levaduras, cuyo medio de crecimiento contenga glicerina proveniente de la producción de biodiesel como fuente de carbono y energía, puede ser una alternativa más para su uso. Además, el aceite microbiano puede ser un complemento de las distintas alternativas que hoy se presentan en el mercado debido a su parecido, por su porcentaje y composición de ácidos grasos, a muchos aceites vegetales.

## IV. OBJETIVOS

### A. Generales

1. Producir aceite a partir de levaduras utilizando en el medio de cultivo como fuente de carbono glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiesel a nivel de laboratorio.

### B. Específicos

1. Seleccionar las levaduras que produzcan mayor cantidad de aceite a partir de un medio estándar de cultivo como lo es el caldo de Sabouraud.
2. Simular un caldo de cultivo utilizando glicerina nivel reactivo (USP) y glicerina proveniente de la producción de biodiesel como fuente de energía.
3. Determinar la cantidad de biomasa obtenida en cada crecimiento.
4. Determinar la cantidad consumida de glicerina durante la fermentación.
5. Determinar el porcentaje de aceite por biomasa de levadura.
6. Realizar el balance de masa y energía del sistema.
7. Determinar el costo del proceso a nivel laboratorio.

## V. PROBLEMA A RESOLVER

El principal problema que se tiene en la actualidad en la industria de producción de biodiesel es la generación de altas cantidades de glicerina como subproducto; debido a que ésta cuenta con varios contaminantes, tales como jabón, metanol (por lo que se caracteriza como desecho peligroso), restos de catalizador y otros; por lo que no se puede utilizar en otras industrias que exigen alto grado de pureza sin un tratamiento de purificación previo que tiene alto costo, lo que hace esta opción poco atractiva. Por lo tanto, es importante encontrar alternativas que generen mayor beneficio económico, lo cual permitirá disminuir el costo de producción del biodiesel y mayores ingresos para los empresarios. La producción de aceites microbianos a partir de glicerina proveniente de la producción de biodiesel puede ser una alternativa más para el uso de este abundante subproducto.

## VI. METODOLOGÍA

### A. Pruebas en frascos de cultivo

Tuvo como objetivo seleccionar la levadura que acumulara mayor cantidad de aceite. Inicialmente se realizaron pruebas de crecimiento en caldo Sabouraud para obtener la cantidad de aceite formado de cada levadura. A continuación se seleccionaron dos levaduras para realizar crecimientos en caldo Sabouraud 2% de glucosa y un medio simulado formado por peptona, triptona y glicerina USP. Por último se realizó crecimiento de la levadura que mayor cantidad de aceite formaba en caldo simulado con glicerina USP y glicerina proveniente de la producción de biodiesel.

Las cepas utilizadas fueron: *Rhodospiridium toruloides* (CBS14), *Rhodotorula glutinis* var *glutinis* (CBS322), *Lipomyces Starkeyi* (CBS1807) y *Yarrowia lipolytica* (CBS2075).

A continuación se presenta la caracterización de las cepas de levaduras utilizadas; información proporcionada por el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) y el National Collection of Yeast Cultures (NCYC).

Cuadro No. 10: Caracterización de las cepas de levaduras (CBS y NCYC)

Nombre	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Lipomyces starkeyi</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Estado	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>rufusa</i>	---	---	---
Estado asexual	---	---	---	<i>Candida lipolytica</i> var. <i>lipolytica</i>
Sinónimos	<i>Mycotorula rubescens</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>rubescens</i> , <i>Rhodoturula gracilis</i> ,	<i>Blastodendrion aereus</i> , <i>Cryptococcus bronchialis</i> , <i>Cryptococcus glutinis</i> , <i>Mycotorula roseo-coralina</i> ,	---	<i>Azymoprocandida lipolytica</i> , <i>candida deformans</i> , <i>Candida lipolytica</i> var. <i>Thermotolerans</i> , <i>Candida olea</i> , <i>Candida oleophila</i> , <i>Candida paralipolytica</i> ,

(CBS y NCYC)

Continuación Cuadro No. 10: Caracterización de las cepas de levaduras (CBS y NCYC)

Nombre	Rhodospiridium toruloides	Rhodotorula glutinis	Lipomyces starkeyi	Yarrowia lipolytica
Sinónimos	Rhodotorula koishikawensis, Rhodotorula longissima, Rhodotorula rubescens, Torula koishikawensis,	Rhodotorula bronchialis, Rhodotorula Glutinis var. Lusitánica, torulopsis saitoi, Torulopsis roseus	---	Candida petrophilum, Candida Pseudolipolytica, Endomycopsis lipolytica,
Número CBS	CBS14	CBS20, CBS108	CBS1807	CBS 2076
Número NCYC	NCYC021	NCYC2666	NCYC2710	NCYC025
Equivalente a otra colección	ATCC10788, ATCC15385, CCRC20306, DBVPG6740, IAM13469, IFO0559	ATCC2527, CCRC21418, DBVPG6081, IAM14113, IFO1125, VKMY332	ATCC58680, CRRRC21522, DBVPG6193, DBVPG6776, DSM70295	DBVPG6207
Tipo de célula	Células en ciernes	Células en ciernes	Células en ciernes	filamentos
Medio de cultivo	Base nitrogenada + 25nM-D-glucosa	Base nitrogenada + 25nM-D-glucosa	Base nitrogenada + 25nM-D-glucosa	Agar papa glucosa
Condiciones de crecimiento	---	~20h a $A_{640}=1.05$	~20h a $A_{640}=0.51$	9 días
Temperatura de incubación	25°C	25°C	25°C	20°C

(CBS y NCYC)

## B. Pruebas en reactor

Después de haber seleccionado la levadura que generó mayor cantidad de aceite en las pruebas a nivel frascos, se realizó un crecimiento en un reactor de 5 litros para visualizar el comportamiento del sistema y obtener el balance de masa y energía.

## C. Costos

Con base a los datos obtenidos en la prueba de crecimiento en el reactor en cuanto a los suministros y a otros factores necesarios se calcularon los costos de producción de aceites microbianos a nivel laboratorio.

## VII. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Cuadro No. 11: Abreviaturas de nombre de cepas de levaduras y medios de cultivo

<b>Cepas de levadura</b>	
<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre</i>
LS	<i>Lipomyces starkeyi</i>
YL	<i>Yarrowia Lipolytica</i>
RG	<i>Rhodotorula Glutinis</i>
RT	<i>Rhodospordium Toruloides</i>
<b>Medios de cultivo</b>	
CS	Caldo Sabouraud 2%
GUSP	Caldo simulado: peptona de carne, triptona de caseína y glicerina USP (United States Pharmacopeia)
GBIO	Caldo simulado: peptona de carne, triptona de caseína y glicerina proveniente de la producción de biodiesel

Cuadro No. 12: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS), *Yarrowia lipolytica* (YL), *Rhodotorula glutinis* (RG) y *Rhodospordium toruloides* (RT) en caldo Sabouraud 2%

Levadura	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	Porcentaje Rendimiento Biomasa	Porcentaje Lípidos_m (m <sub>lípidos</sub> /m <sub>lev</sub> )	Porcentaje Lípidos_C (m <sub>lípidos</sub> /m <sub>glucosa</sub> )
YL	7.26 ± 2.61	19.35 ± 0.13	8.34 ± 0.36	37.58%	4.16%	2.55%
RT	2.65 ± 0.52	18.83 ± 0.31	6.46 ± 3.19	14.07%	24.10%	2.09%
RG	2.73 ± 0.52	18.38 ± 0.11	8.68 ± 0.11	14.85%	2.98%	0.30%
LS	1.35 ± 0.78	17.49 ± 1.91	4.84 ± 0.13	7.52%	29.64%	2.33%

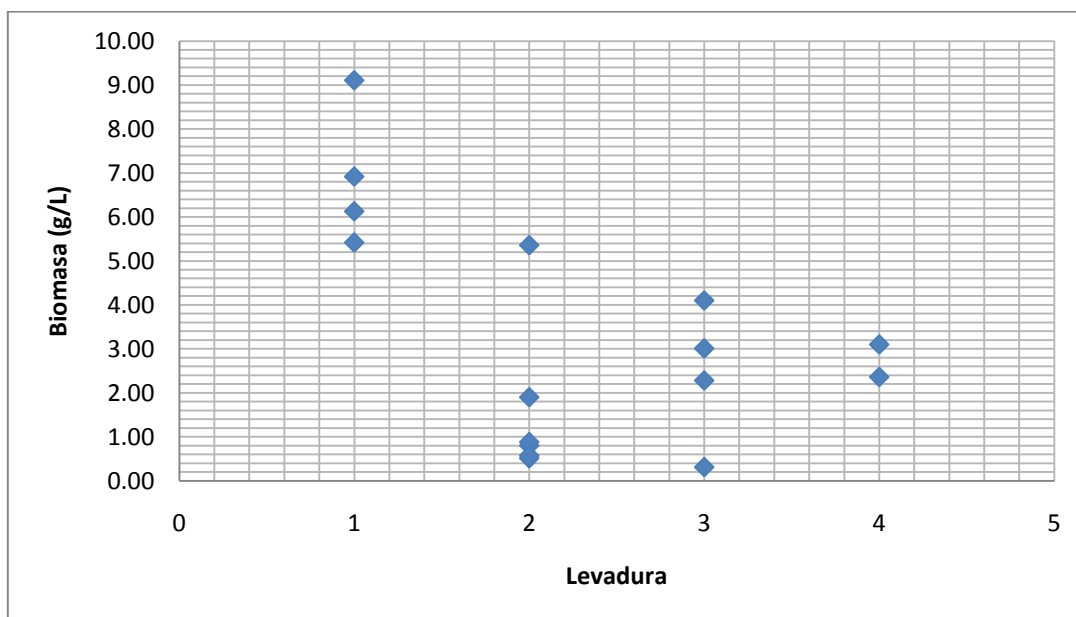
Cuadro No. 13: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) y *Rhodospiridium toruloides* (RT) en caldo Sabouraud 2% y glicerina USP

Levadura	Medio	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	Porcentaje Rendimiento Biomasa	Porcentaje Lípidos_m ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{lev}}$ )	Porcentaje Lípidos_C ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{glucosa}}$ )
LS	Caldo Sabouraud	2.97 ± 3.39	18.56 ± 0.20	6.56 ± 2.69	16.07%	3.76%	0.29%
	Glicerina USP	2.11 ± 0.10	17.35 ± 0.88	6.17 ± 0.57	12.17%	2.91%	0.27%
RT	Caldo Sabouraud	2.20 ± 2.68	16.97 ± 0.98	7.25 ± 2.06	13.48%	0.51%	0.09%
	Glicerina USP	3.62 ± 2.09	17.27 ± 3.86	6.88 ± 0.69	20.08%	0.01%	0.00%

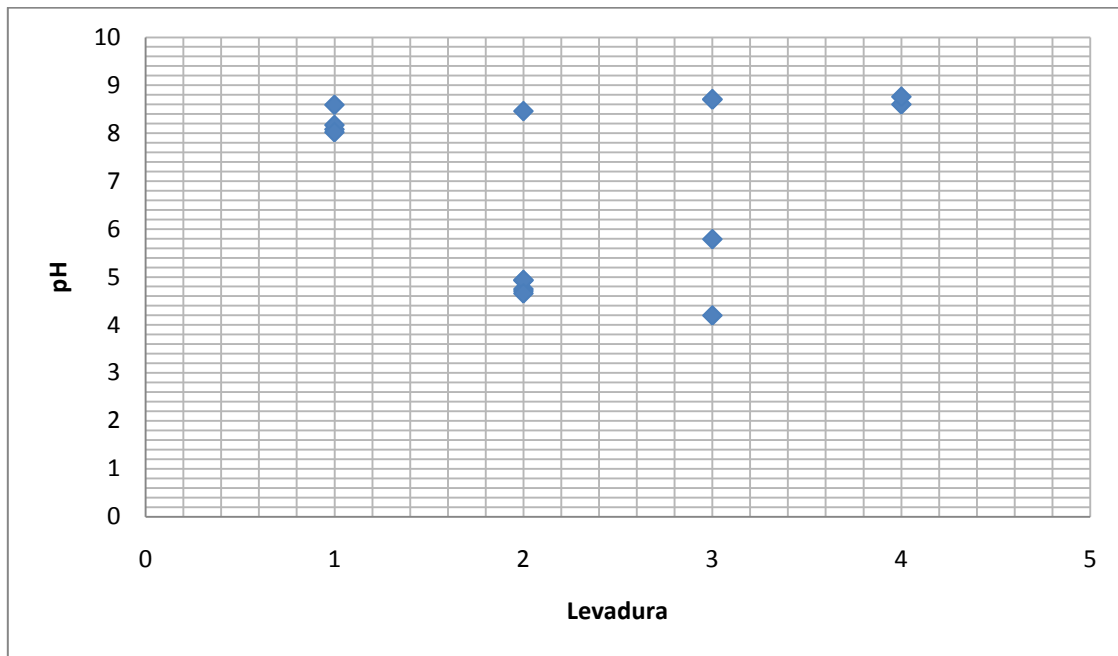
Cuadro No. 14: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) y *Yarrowia lipolytica* (YL) en caldo Sabouraud 2%

Levadura	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	Porcentaje Rendimiento Biomasa	Porcentaje Lípidos_m ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{lev}}$ )	Porcentaje Lípidos_C ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{glucosa}}$ )
YL	6.52 ± 0.56	19.50 ± 0.02	8.10 ± 0.11	33.47%	0.89%	0.18%
LS	0.70 ± 0.26	18.89 ± 0.06	4.83 ± 0.16	3.68%	4.61%	0.12%

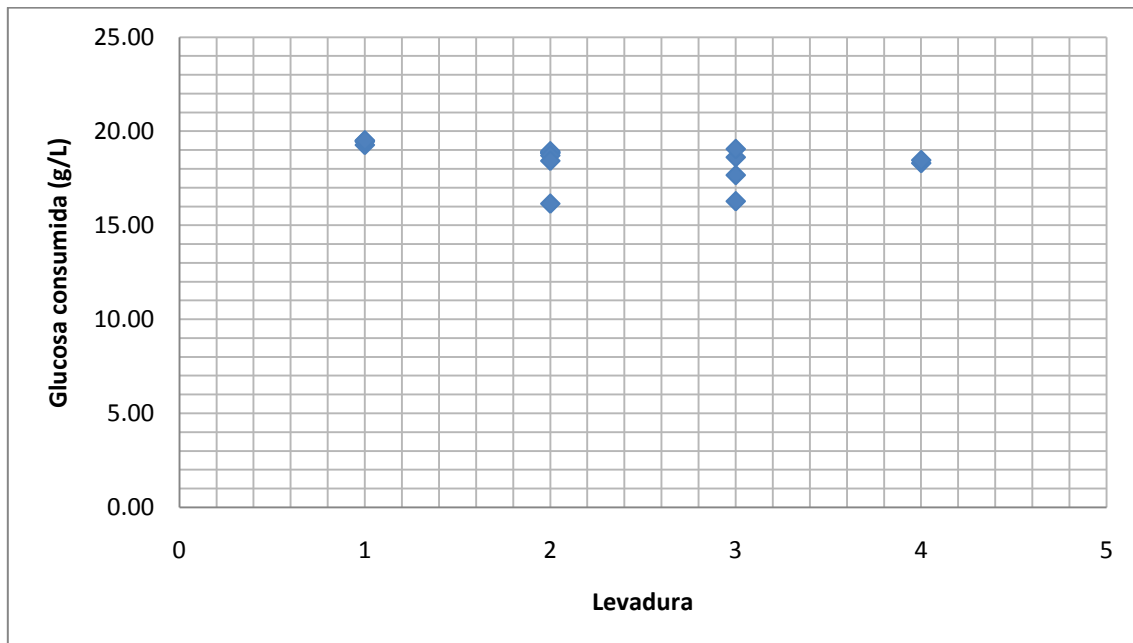
Gráfica No. 1. Dispersión de biomasa (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2%



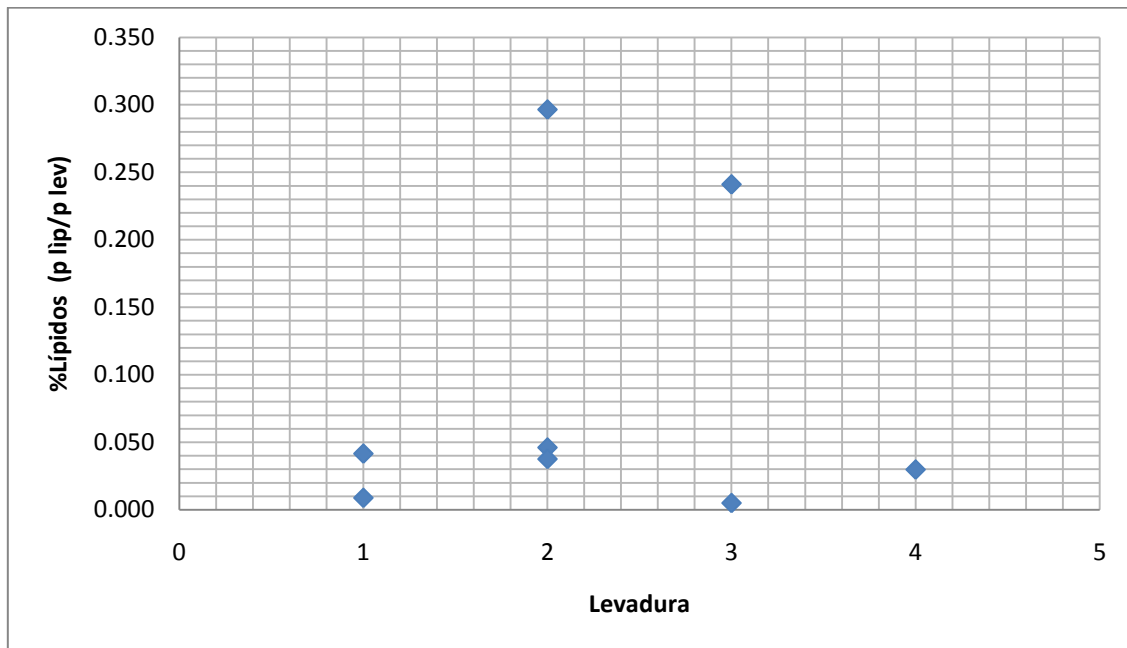
Gráfica No. 2. Dispersión de pH del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2%



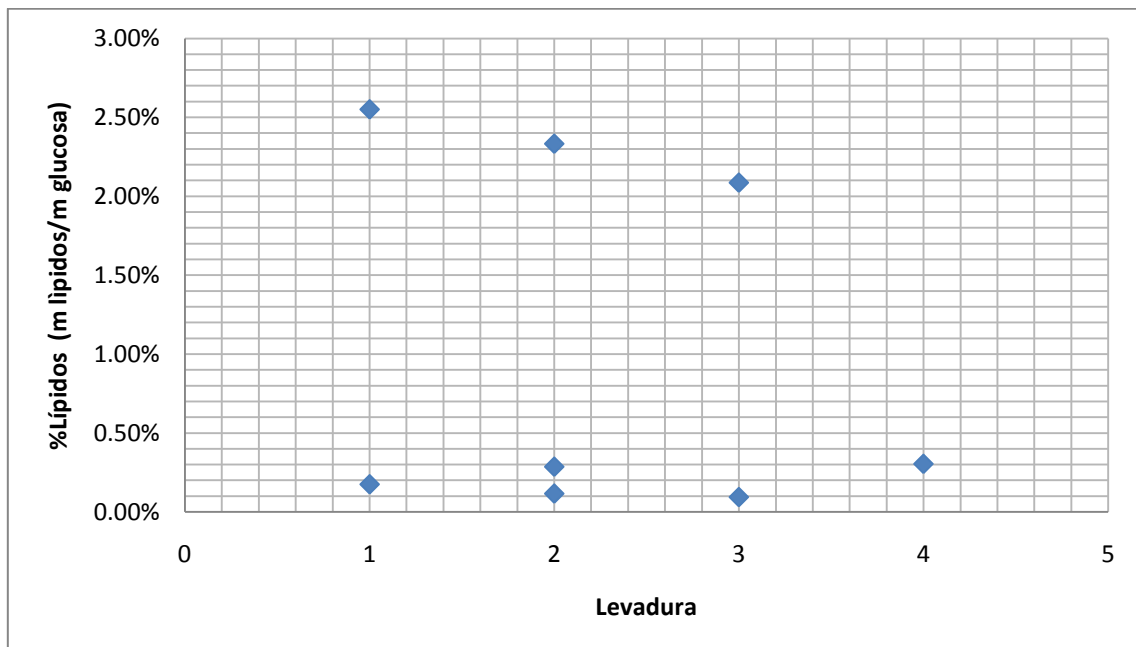
Gráfica No. 3. Dispersión de glucosa consumida (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2%



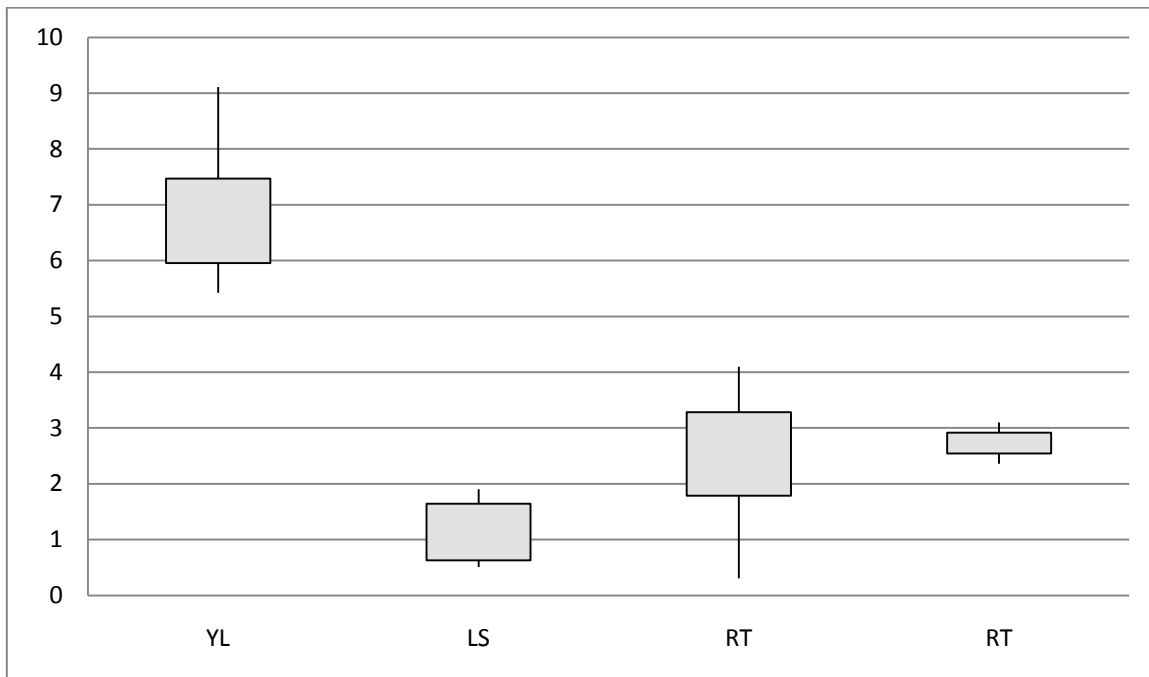
Gráfica No. 4. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa levadura) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3), RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2%



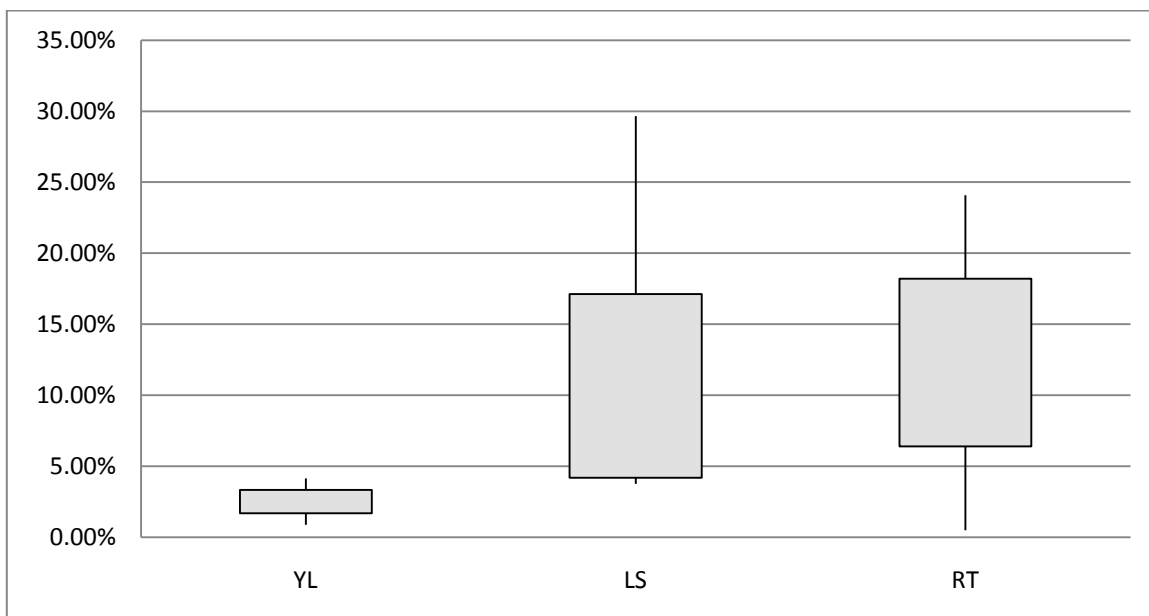
Gráfica No. 5. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa glucosa) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2%



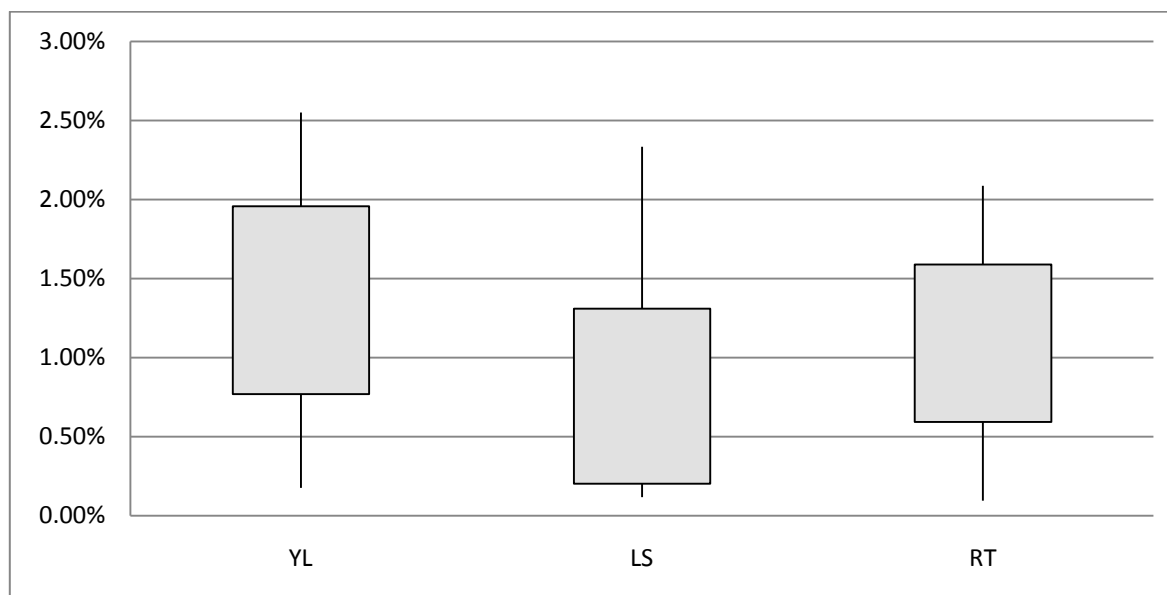
Gráfica No. 6. Diagrama de cajas de la biomasa (g/L) obtenida del crecimiento en frascos de cultivo utilizando Caldo Sabouraud



Gráfica No. 7. Diagrama de cajas del porcentaje de rendimiento de lípidos (masa lípidos/ masa levadura) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2%

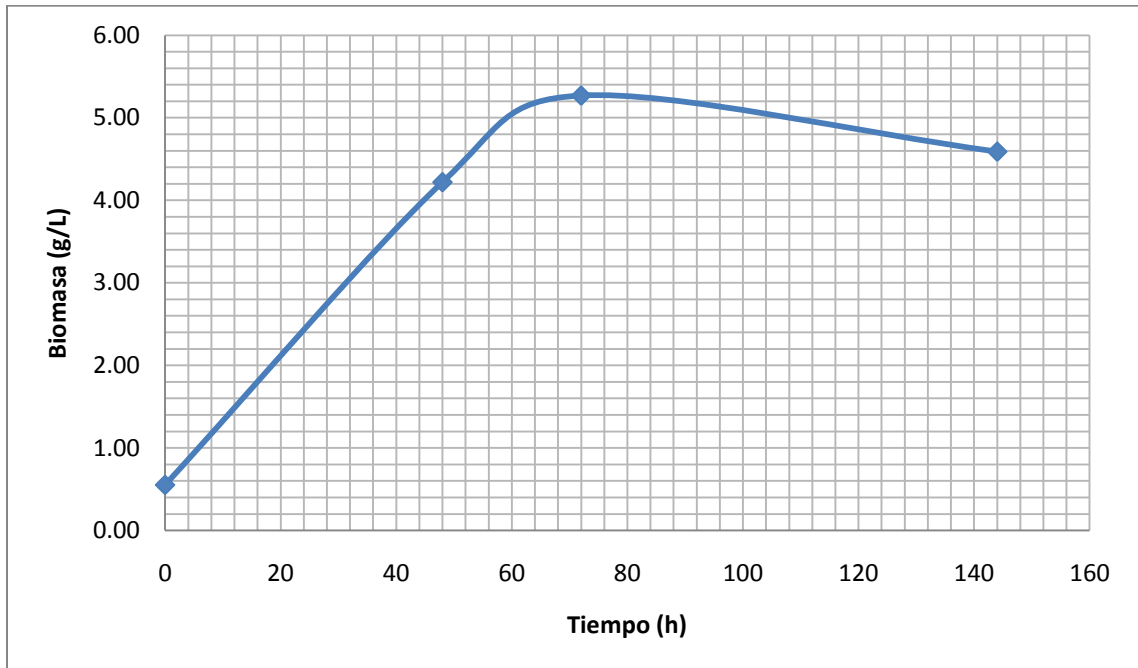
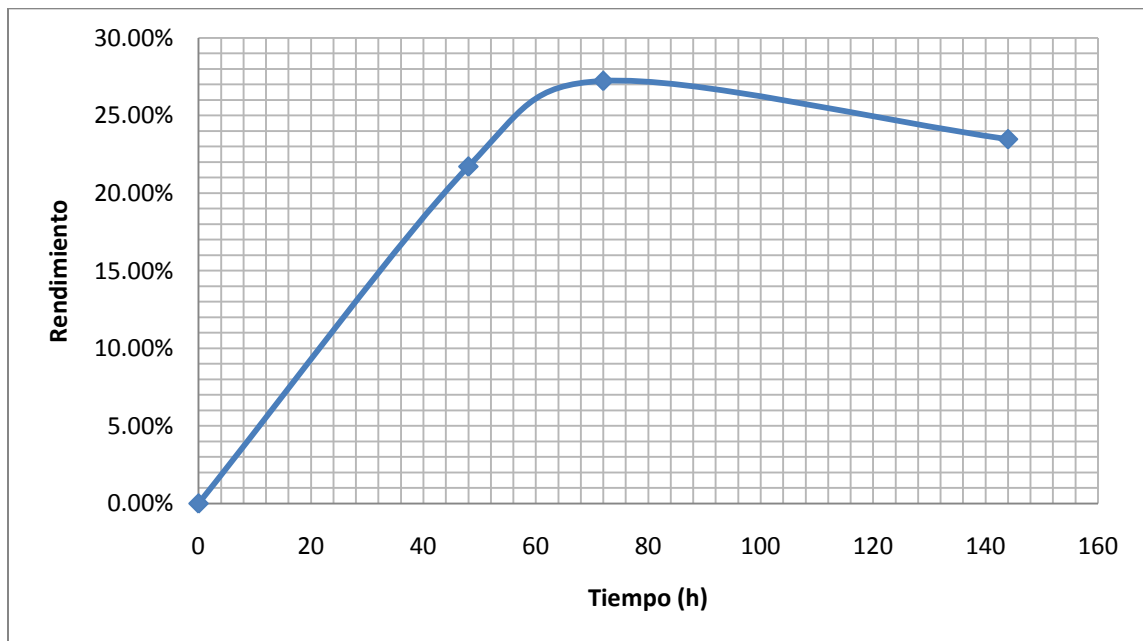


Gráfica No. 8. Diagrama de cajas del porcentaje de lípidos (masa lípidos/ masa glucosa) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2%

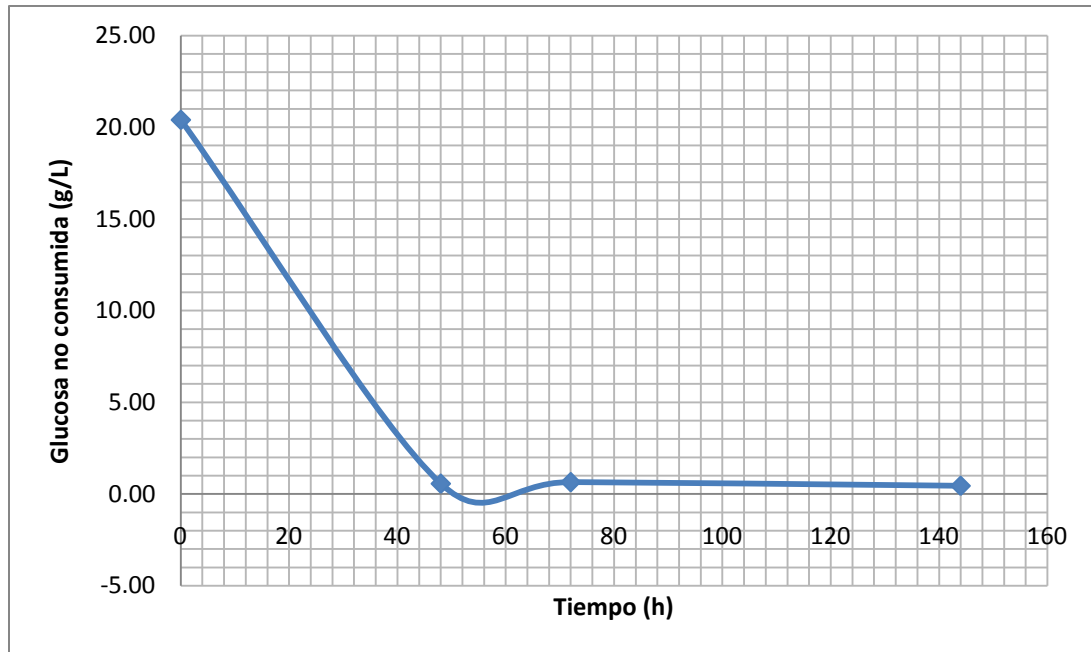


Cuadro No. 15: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) en fermentador de 5 L utilizando caldo Sabouraud 2%

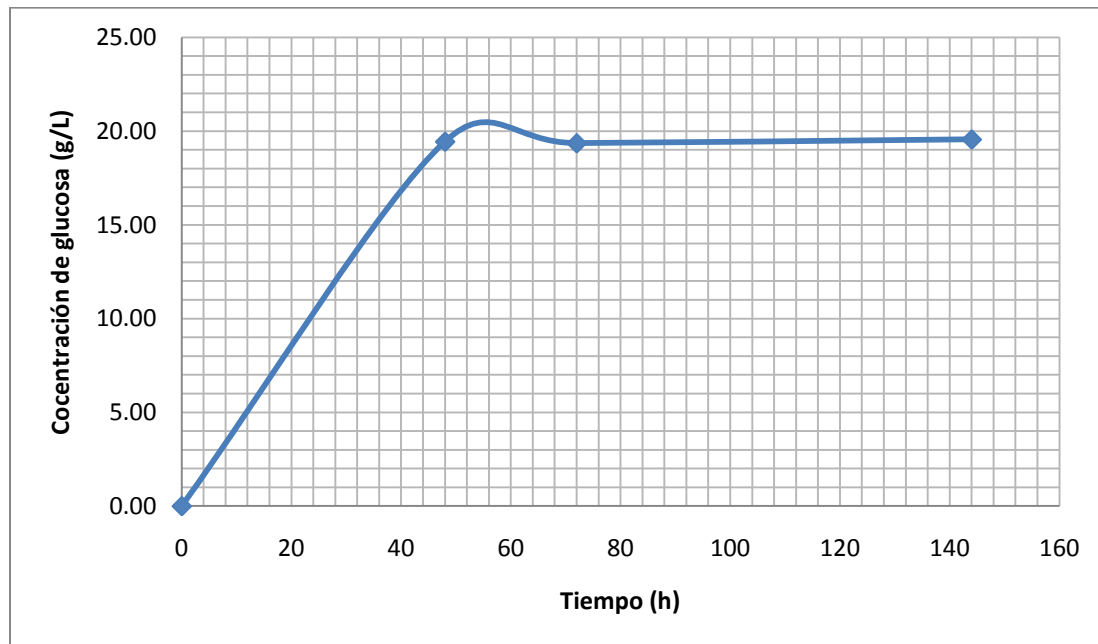
Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa Consumida (g/L)	pH	Porcentaje Rendimiento Biomasa	Porcentaje Lípidos_m ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{lev}}$ )	Porcentaje Lípidos_C ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{glucosa}}$ )
0	0.55± 0.14	0.00	5.79± 0.47	0	0.69%	0.18%
48	4.22± 0.08	19.43± 1.89E-02	5.50± 0.01	21.7%		
72	5.27± 0.20	19.35± 2.10E-03	5.34± 0.01	27.2%		
144	4.59± 0.01	19.55± 2.10E-03	7.98± 0.05	23.5%		

Gráfica No. 9: Crecimiento celular de *Lipomyces starkeyi* durante 144 horas en un fermentador de 5LGráfica No. 10: Porcentaje de rendimiento de biomasa obtenida durante el crecimiento de *Lipomyces starkeyi* durante 144 horas en un fermentador de 5 L en caldo Sabouraud 2%

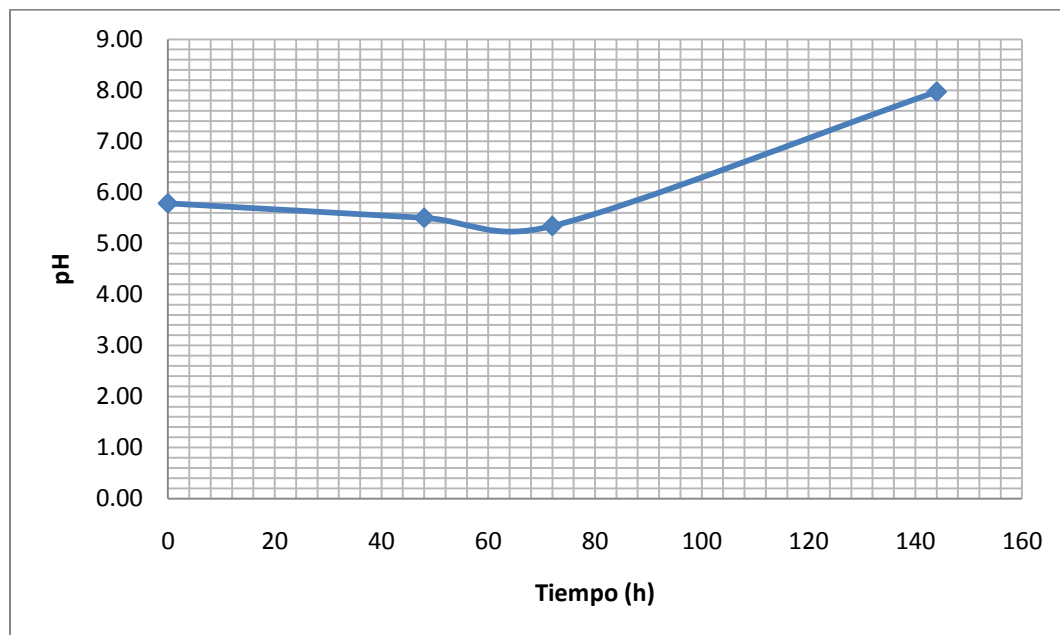
Gráfica No. 11: Glucosa no consumida de *Lipomyces Starkeyi* durante el crecimiento en un fermentador de 5L durante 144 horas en caldo Sabouraud



Gráfica No. 12: Glucosa consumida durante el crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* durante el crecimiento en un fermentador de 5L en 144 horas en caldo Sabouraud 2%



Gráfica No. 13: pH durante el crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* durante 144 horas en un reactor de 5 litros con caldo Sabouraud 2%



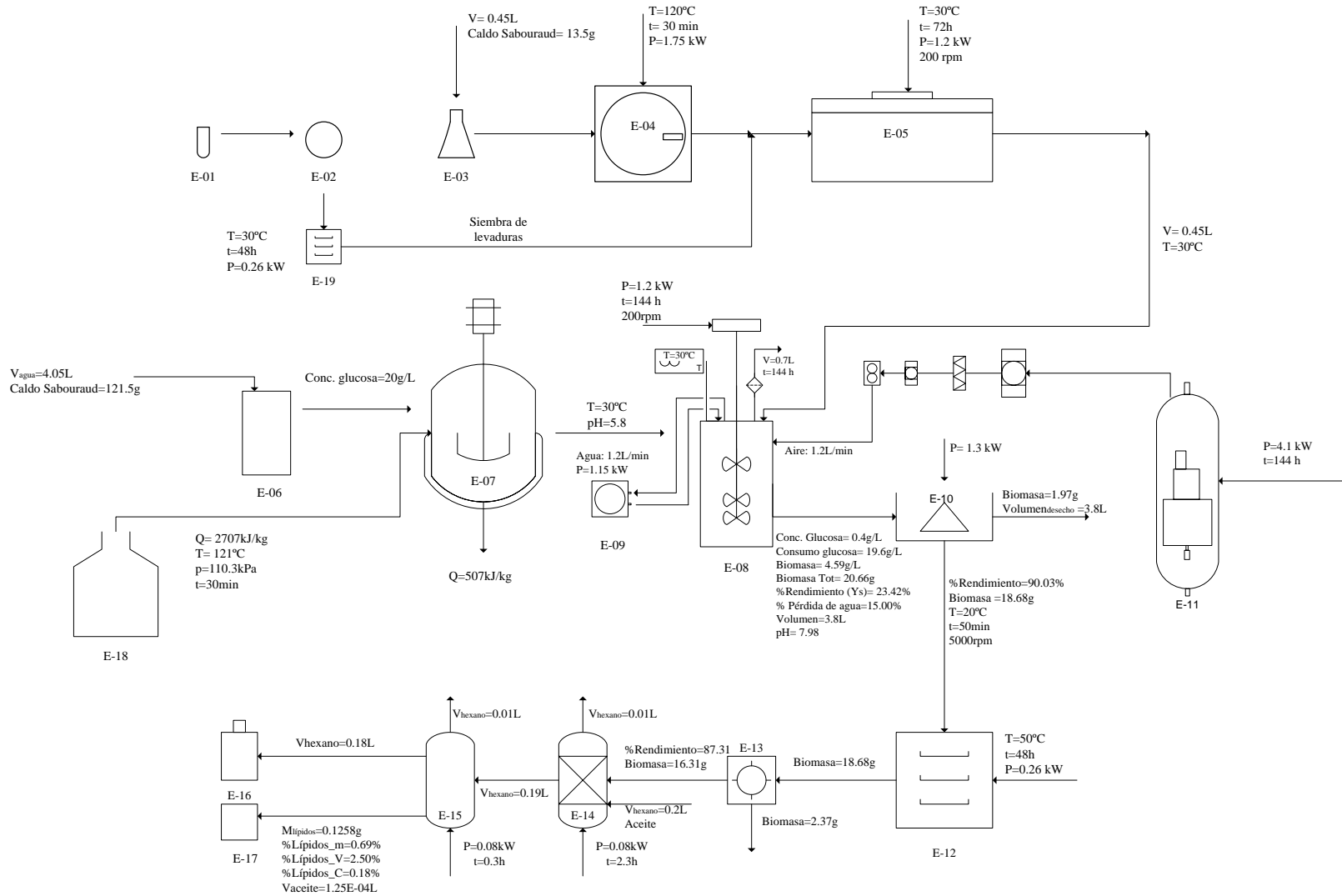
Cuadro No. 16: Costo total de la producción de aceites microbianos con *Lipomyces Starkeyi* en un fermentador de 5 L utilizando Caldo Sabouraud como medio de cultivo

Descripción	Consumo	Costo
Caja petri (unidad)	1.0	Q1.30
Agar Patata Dextrosa (g)	1.0	Q1.62
Caldo Sabouraud (g)	135.0	Q318.60
Agua (L)	4.5	Q4.29
Hexano (L)	0.2	Q37.04
Energía eléctrica (kW-h)	562.5	Q540.04
Vapor (m <sup>3</sup> )	0.004	Q0.80
Mano de obra (hH)	12.0	Q135.00
Total	---	Q1,038.68

Cuadro No. 17: Código de equipo presentado en el balance de masa y energía

Código	Nombre
E-01	Cepa
E-02	Caja petri
E-03	Caldo de cultivo
E-04	Autoclave
E-05	Incubadora con agitación
E-06	Fermentador: caldo de cultivo
E-07	Autoclave
E-08	Fermentador en funcionamiento
E-09	Baño de enfriamiento
E-10	Centrífuga
E-11	Compresor
E-12	Secado
E-13	Trituración
E-14	Soxhlet
E-15	Destilación
E-16	Hexano recuperado
E-17	Aceite extraído
E-18	Caldera
E-19	Incubadora

Figura No. 4: Diagrama de flujo con balance de masa y energía de la producción de aceites microbianos a escala laboratorio



## VIII. DISCUSIÓN

### A. Cultivo de cuatro cepas de levadura (LS, YL, RG y RT) en caldo Sabouraud 2%

En la sección de resultados en el Cuadro No. 12: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS), *Yarrowia lipolytica* (YL), *Rhodotorula glutinis* (RG) y *Rhodospiridium toruloides* (RT) en caldo Sabouraud 2% (Pág. 24), se observa que en la primera fase experimental la levadura que presentó mayor crecimiento de biomasa y consumo de glucosa fue la YL, presentó un rendimiento de 37.58% y la que presentó menor crecimiento de biomasa y consumo de glucosa fue la LS, con un rendimiento de 7.52%. Al comparar el porcentaje de lípidos ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{lev}}$ ) ó porcentaje de lípidos\_m se observa que la levadura LS y RT presentaron los porcentajes más grandes. La levadura RT tuvo un 24.10% y la LS un 29.64%. Al comparar los porcentajes de lípidos por cantidad de glucosa ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{glucosa}}$ ) ó porcentaje de lípidos\_C se obtuvo que la YL presenta el mayor porcentaje el cual es de 2.55%, la LS presentó un 2.33%, la RT 2.09% y la RG de 0.30%. A pesar que la YL tiene mayor crecimiento de biomasa, ésta acumula menor cantidad de aceite; y como el objetivo de este trabajo se centraba en la cantidad de aceite producido ésta no se tomó en cuenta para la siguiente fase.

### B. Cultivo de dos levaduras (LS y RT) en caldo Sabouraud 2% y medio simulado GUSP

La segunda fase consistió en el crecimiento de LS y RT en caldo Sabouraud y un medio simulado GUSP. Los resultados de ésta fase se encuentran en la sección de resultado Cuadro No. 13: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) y *Rhodospiridium toruloides* (RT) en caldo Sabouraud 2% y glicerina USP (Pág.25). La levadura LS tuvo un rendimiento de biomasa de 16.07% utilizando CS como medio de cultivo y la RT de 13.48%. El rendimiento aumentó en el caso de la LS y fue similar en el caso de la RT al comparar con los datos de la primera fase experimental. Respecto a la cantidad de aceite se obtuvo para la LS un porcentaje de lípidos\_m se obtuvo un 3.75% y la RT de 0.51%; al comparar dichos porcentajes con la primera fase experimental, se nota que los porcentajes no coincidieron, esto pudo originarse a que el método de extracción era a microescala por lo que cualquier error pudo afectar los resultados.

Al comparar los crecimientos con el medio simulado GUSP se observa, en el caso de LS, que el rendimiento de biomasa fue de 12.17% y para la RT fue de 20.08%; en el caso de la LS bajó el rendimiento de biomasa, pero en el caso de la RT subió y si nos vamos a la columna de biomasa (g/L) se nota que la desviación estándar es alto lo cual se pudo derivar a que se realizó en duplicado y los resultados en cada frasco no fueron homogéneos. El porcentaje de lípidos<sub>m</sub> fue mayor en el caso del uso de glucosa que el de glicerina USP como fuente de carbono aunque no es significativamente diferente en el caso de LS.

### C. Crecimiento de dos levaduras (LS y YL) en caldo Sabouraud 2%

Debido a que los datos obtenidos no coincidieron a los de la primera fase se pretendía repetir un crecimiento de las cuatro levaduras para corroborar si la LS persistía en ser la mayor productora de aceite. Los resultados en los frascos no fueron homogéneos por lo que se decidió sembrar en placas cada cepa de levadura, para que al momento de sembrar se tuviera la certeza que se estaban agregando células dentro del medio. Durante este crecimiento únicamente se reprodujeron dos de las levaduras, la YL y la LS. La RT y la RG se sembraron en diversos medios y no crecieron; por lo que se concluyó que la cepa había muerto, lo cual no permitió que se siguieran tomando en cuenta en el presente estudio. Por lo tanto, se realizó un crecimiento con caldo Sabouraud con YL y LS únicamente.

En el Cuadro No. 14: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) y *Yarrowia lipolytica* (YL) en caldo Sabouraud 2% (Pág.25), se observa que el rendimiento de biomasa fue mayor en la YL con un 33.47% y la LS tuvo 3.68%; el porcentaje lípidos<sub>m</sub> fue de 0.89% con YL y de 4.61% con LS. Esto nos muestra que la LS nos proporciona mayor cantidad de lípidos por masa de levaduras. Aunque al comparar los porcentajes de lípidos<sub>C</sub> es mayor el porcentaje en YL el cual fue de 0.18% y en LS fue de 0.12%. Dichos porcentajes son muy importantes porque muestran la bioconversión que hay de glicerina en lípidos; aunque el porcentaje es muy bajo.

### D. Gráficas de dispersión de los resultados obtenidos de los crecimientos en frascos utilizando caldo Sabouraud 2%

Con los datos obtenidos de todos los crecimientos en frascos utilizando caldo Sabouraud 2% se trazaron gráficas de dispersión para conocer el comportamiento de los resultados. En la Gráfica No. 1. Dispersión de biomasa (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% (Pág.25) se presentan los datos de biomasa (g/L), se observa que la YL tuvo mayor crecimiento ya que se encuentra entre 5.2 y 9 g/L de

biomasa, en comparación a las demás que se encuentran debajo de 5.2 g/L. Además, los datos obtenidos en cada crecimiento fueron variantes como se puede observar en dicha gráfica.

En la Gráfica No. 2. Dispersión de pH del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% (Pág.26), se observa que el pH en cada levadura varió en cada réplica, los datos que coincidieron más fueron el pH final de la YL que está entre 8 y 8.6 lo cual es discutible ya que puede deberse a que por el largo tiempo de incubación se formen bases que provocan que el pH suba. El pH de la LS se observa que se mantiene entre 4.6 y 5, existe un dato fuera de dicho rango que es aproximadamente de 8.4 lo cual puede ser que se deba a lo anteriormente mencionado.

En la Gráfica No. 3. Dispersión de glucosa consumida (g/L) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% (Pág.26), en ésta se puede determinar que en los frascos de YL el consumo fue similar en cada réplica. En el caso de la LS varió entre 16 y 18 g/L. Con la RT varió en casi todas las réplicas en un rango similar al anterior, con la diferencia que hubo menor precisión.

En la Gráfica No. 4. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa levadura) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3), RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% (Pág.27) en ésta se muestran los porcentajes de lípidos (m lípidos/ m levaduras); se puede observar que los datos para cada levadura fueron variantes, en el caso de la LS los resultados fueron mayores en comparación a las otras levaduras.

En la Gráfica No. 5. Dispersión porcentaje de lípidos (masa lípidos /masa glucosa) del crecimiento en frascos de levadura YL (1), LS (2), RT (3) y RG (4) utilizando Caldo Sabouraud 2% (Pág.27), se observa que la YL cuenta con un punto más alto que la LS, pero se debe tener en cuenta que también tiene un punto bajo, por lo que el rango es muy amplio para concluir que con la YL se tiene mayor conversión de glucosa a aceite. La LS cuenta con dos puntos bajos y uno alto cercano al de la YL. La RG y la RT cuentan con puntos más bajos que las dos anteriores.

## E. Diagramas de cajas de los resultados obtenidos de los crecimientos en frascos utilizando caldo Sabouraud 2%

Además, para conocer el comportamiento de datos obtenidos de los crecimientos en frascos utilizando caldo Sabouraud 2%, se realizaron diagramas de cajas.

En la Gráfica No. 6. Diagrama de cajas de la biomasa (g/L) obtenida del crecimiento en frascos de cultivo utilizando Caldo Sabouraud (Pág.28), se observa que la biomasa (g/L) de levadura YL y RT cuentan con mayores puntos extremos. En el caso de la LS se obtuvieron datos bajos pero en un rango similar y en el caso de la RG no se contó con muchos datos por lo que se obtuvo un rango pequeño.

En la Gráfica No. 7. Diagrama de cajas del porcentaje de rendimiento de lípidos (masa lípidos/ masa levadura) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2% (Pág.28), se observa que los porcentajes de lípidos\_m son bajos para la YL, los de la LS son más altos, pero con la diferencia que existen puntos atípicos, los porcentajes de la RT son simétricos y son mayores a los YL.

En la Gráfica No. 8. Diagrama de cajas del porcentaje de lípidos (masa lípidos/ masa glucosa) obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo utilizando caldo Sabouraud 2% (Pág.29), se observa que el diagrama de la YL tiene mayor simetría y los porcentajes son mayores en comparación a los de la LS y RT. En el caso de la LS se observa que hay una distorsión en la simetría que hala los datos hacia rendimientos bajos. Respecto a la RT se obtuvo mejor simetría aunque los porcentajes fueron bastante bajos, menores a los de la YL.

Los resultados obtenidos en crecimiento en frascos utilizando caldo Sabouraud al 2% de glucosa nos arrojaban medianas con desviaciones estándar muy altas, debido a que en ocasiones las muestras trabajadas en duplicado no dieron resultados similares; por lo tanto, para obtener datos más confiables se decidió aplicar la prueba Q para obtener promedios con mayor confiabilidad y además se sacó la mediana de los datos para obtener una idea más certera de los resultados obtenidos en los crecimientos en frascos de las cuatro levaduras trabajadas.

En el Cuadro No. 43: Media, desviación estándar y mediana de los parámetros obtenidos de las pruebas de crecimiento en frascos de cultivo de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa. (Pág. 71, sección de Datos Calculados); se presentan los resultados finales en promedios. Aunque dichos datos aún no son concluyentes debido a su amplia diferencia en cada corrida.

Debido a que no se obtuvo resultados que afirmaran con alta confiabilidad que la LS fuera la mayor productora de aceite se procedió a realizar un crecimiento con esta levadura en un reactor de cinco litros para conocer y corroborar los datos que se habían obtenido hasta el momento.

## F. Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* en un reactor de 5L

El crecimiento duró 144 horas, en el Cuadro No. 15: Crecimiento de *Lipomyces starkeyi* (LS) en fermentador de 5 L utilizando caldo Sabouraud 2% (Pág.29), se observa que el consumo de glucosa se alcanza casi totalmente a las 48 horas.

En la Gráfica No. 9: Crecimiento celular de *Lipomyces starkeyi* durante 144 horas en un fermentador de 5L (Pág.30), se observa una baja a partir de las 72 horas, lo cual se puede derivar a que durante el crecimiento aparezcan otros microorganismos que se alimenten de la biomasa formada y a partir de dicho tiempo empiece a disminuir. Por lo que se recomendaría que el crecimiento en caldo Sabouraud tenga una duración de 48 horas como mínimo y como máximo 72 horas debido a que el rendimiento máximo de biomasa se alcanza entre esos tiempos.

En la Gráfica No. 10: Porcentaje de rendimiento de biomasa obtenida durante el crecimiento de *Lipomyces starkeyi* durante 144 horas en un fermentador de 5 L en caldo Sabouraud 2% (Pág.30), se observa que el rendimiento baja al igual que la biomasa obtenida.

En la Gráfica No. 11: Glucosa no consumida de *Lipomyces Starkeyi* durante el crecimiento en un fermentador de 5L durante 144 horas en caldo Sabouraud (Pág.31), se observa que ésta disminuye considerablemente en el inicio y las 48 horas, después de este tiempo permanece constante.

En la Gráfica No. 12: Glucosa consumida durante el crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* durante el crecimiento en un fermentador de 5L en 144 horas en caldo Sabouraud 2% (Pág.31), se presenta una tendencia lineal a partir del tiempo 0 a las 48 horas, luego aparece un pequeño salto el cual puede derivarse de algún error de muestreo; aunque la tendencia después de las 48 horas se mantiene constante.

En la Gráfica No. 13: pH durante el crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* durante 144 horas en un reactor de 5 litros con caldo Sabouraud 2% (Pág.32), se observa que existe un aumento de pH a partir de las 72 horas. Lo cual indica que se está formando alguna base que puede perjudicar en la recuperación del aceite microbiano.

La biomasa final obtenida, del crecimiento de LS en caldo Sabouraud 2% fue de  $4.59 \pm 0.01$  g/L, se consumió  $19.55 \pm 2.10 \times 10^{-3}$  g/L de glucosa, el pH final fue de  $7.98 \pm 0.05$ , el porcentaje de rendimiento de biomasa fue de 23.5%, el porcentaje de lípidos<sub>m</sub> fue de 0.69% y el porcentaje de lípidos<sub>C</sub> fue de 0.18%. Estos dos últimos porcentajes fueron muy bajos. El porcentaje de lípidos<sub>m</sub> fue bajo, esto se pudo derivar por exceso de tiempo de fermentación lo que puede dar lugar al crecimiento de otros microorganismos que se alimentan de dicho aceite o que las mismas

levaduras lo empiezan a consumir; además, se pueden formar otros compuestos químicos que inhiban la formación de aceite y/o hasta lo destruyan. Por otro lado, debido a que se utilizó oxígeno no enriquecido puede dar lugar al crecimiento de otros microorganismos como esporas y hongos que inhiban el crecimiento de la levadura y disminuya la cantidad de aceite formado en ellas. Además, se debe tomar en cuenta que el reactor que se utilizó tenía un problema de agitación; se observó que la parte inferior estaba muerta, las aspas de agitación no estaban colocadas de forma adecuada para cubrir el área total del fermentador. Esto pudo influir en el crecimiento de biomasa y en la formación de hongos o material muerto debido a la falta de agitación en dicho lugar.

## G. Crecimiento de LS en caldos simulados (GUSP y GBIO)

Luego de los crecimientos en frascos y fermentador se decidió seguir trabajando con *Lipomyces starkeyi* debido a que fue la levadura que proporcionaba a nivel frascos la mayor cantidad de aceite. Por lo tanto, se procedió a pasar a la fase final del proyecto que era sembrar en glicerina USP y en glicerina proveniente de la producción de biodiesel. Para esto hubo una etapa previa, que fue el pre-tratamiento de glicerina proveniente de la producción de biodiesel con aceite de soya.

El crecimiento duró 144 horas, al término de dicho período se procedería a sacar peso seco, glicerina consumida (HPLC), extracción de aceite de toda la biomasa obtenida; pero antes se procedió a observar en el microscopio si había crecimiento de levaduras. Lamentablemente, al observar en el microscopio en varios de los frascos con caldo simulado GUSP se observó algunas células, pero en cantidades muy pequeñas. En el caso de glicerina proveniente de la producción de biodiesel no se observó ningún crecimiento. Esto pudo derivarse a que el pH inicial estaba entre 8 y 8.5 debido a que por el almacenamiento de la glicerina el pH subió; posiblemente se formó un buffer que hizo que no se mantuviera el pH neutro, al que se había llegado con ácido sulfúrico. Otra posibilidad es que la *Lipomyces starkeyi* necesita más de 144 horas para adaptarse al medio e iniciar con el consumo de glicerina proveniente de la producción de biodiesel. Lo cual indica que se necesita más tiempo para que las levaduras crezcan en glicerina.

## H. Balance de masa y energía

El balance de masa y energía se obtuvo con el crecimiento en el reactor de 5 L, éste se puede observar en la Figura No. 4: Diagrama de flujo con balance de masa y energía de la producción de aceites microbianos a escala laboratorio (Pág.34), en donde se encuentran condiciones de

operación, rendimientos y porcentajes de pérdidas. Ver Cuadro No. 17: Código de equipo presentado en el balance de masa y energía (Pág. 33).

Además, se observa el proceso de producción a nivel laboratorio el cual consiste en siembra de inóculo, incubación por 72 horas, traspaso del inóculo al fermentador con capacidad de 5 L (fermentador previamente esterilizado); fermentación durante 144 horas; recuperación de la biomasa por centrifugación; secado de la biomasa por 48 horas; trituración de biomasa seca para obtener una muestra homogénea; extracción de aceite por Soxhlet utilizando hexano como solvente; recuperación del hexano por destilación; peso de aceite obtenido.

Uno de los puntos críticos del proceso es la siembra del inóculo, ya que se debe realizar de forma rápida y precisa para evitar cualquier contaminación dentro del frasco y garantizar que existen células para que permitan el crecimiento dentro del medio. Se observa que el punto que presenta mayor pérdida de biomasa es después de la centrifugación y de la trituración de la biomasa seca. Las pérdidas del solvente se derivaron por evaporación durante su adición al balón, extracción y recuperación del mismo.

Como subproductos se obtiene el caldo de cultivo luego de la centrifugación y torta después de la extracción. El primer subproducto se deberá estudiar para conocer si es apto para riego o se puede utilizar para alguna otra actividad. La torta se puede utilizar como aditivo de alimento de animales, abonos, entre otros. Además, se debe realizar investigación para tener otras alternativas.

El costo total de la producción de aceite microbiano con *Lypomices starkeyi* fue de Q1,038.68; de éste crecimiento se obtuvo 0.1258 g de aceite, lo que representa un rendimiento de 0.69%. Dicho rendimiento es muy bajo y a la vez costoso; por lo que se debe optimizar el crecimiento de levaduras y extracción de aceite para obtener mayores rendimientos.

## IX. CONCLUSIONES

1. La levadura que produjo mayor cantidad de aceite con la metodología propuesta, en la mayoría de las fases experimentales fue la *Lipomyces Starkeyi*.
2. La levadura que produjo mayor cantidad de biomasa fue la levadura *Yarrowia lipolytica*.
3. La levadura *Rhodospiridium toruloides* presentó mayor rendimiento de lípidos utilizando glucosa en comparación con glicerina como fuente de carbono.
4. La levadura *Rhodoturula glutinis* presentó rendimiento bajo de lípidos en comparación a las demás levaduras, utilizando glucosa como fuente de carbono.
5. El rango de porcentaje de rendimiento de biomasa de levadura *Lipomyces Starkeyi* estuvo entre 3.68% a 16.07% en las pruebas en frascos agitados utilizando como medio de cultivo caldo Sabouraud y en el medio simulado GUSP se obtuvo un rendimiento de 12.17%.
6. El consumo de glucosa de la levadura *Lipomyces Starkeyi* estuvo entre 17.49 a 18.89 g/L en las pruebas experimentales realizadas en frascos agitados en medio caldo Sabouraud.
7. El consumo de glicerina de la levadura *Lipomyces Starkeyi* fue de 12.17% en las pruebas de frascos agitados utilizando el medio simulado con glicerina USP (GUSP).
8. El porcentaje de lípidos<sub>m</sub> ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{lev}}$ ) producidos por la levadura *Lipomyces starkeyi* en pruebas a nivel laboratorio en frascos agitados con caldo Sabouraud estuvo entre 3.76% y 29.64% y en caldo simulado GUSP fue de 2.91%.
9. Los porcentajes de lípidos<sub>C</sub> ( $m_{\text{lípidos}}/m_{\text{glucosa}}$ ) producidos por la levadura *Lipomyces starkeyi* en pruebas a nivel laboratorio en frascos agitados con caldo Sabouraud estuvo entre 0.12% y 2.33% y en caldo simulado GUSP fue de 0.27%.
10. El rendimiento de biomasa de la levadura *Lipomyces starkeyi* fue de 23.5%, el porcentaje de lípidos<sub>m</sub> fue de 0.69% y el porcentaje de lípidos<sub>C</sub> fue de 0.18% en una fermentación de 144 horas en un reactor de 5 L con caldo Sabouraud.
11. El método de extracción a microescala con que se contaba y se utilizó no fue el más adecuado, debido a que cualquier error alteraba drásticamente los resultados.

## X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar fermentaciones a nivel planta piloto en triplicado con diferentes levaduras como *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis*, utilizando caldo Sabouraud 2% . Dichos crecimientos servirán de referencia para conocer las cantidades máximas de lípidos contenidos en cada microorganismo.
- Se recomienda que las pruebas que se realicen con caldo Sabouraud tengan un tiempo de incubación máximo de 48 horas, debido a que durante este lapso se consume la mayor cantidad de glucosa.
- Realizar fermentaciones a nivel planta piloto, en triplicado, con las levaduras utilizadas en los crecimientos anteriores; utilizar caldo de cultivo que contenga glicerina USP como fuente de carbono.
- Seleccionar los microorganismos que presenten mayor contenido de aceite y adaptación al medio simulado con glicerina USP.
- Realizar pruebas de crecimiento con caldo de cultivo que contenga glicerina USP para verificar el tiempo óptimo de crecimiento y producción de aceites microbianos.
- Realizar fermentaciones a nivel planta piloto en triplicado con los microorganismos seleccionados utilizando caldo de cultivo que contenga glicerina proveniente de la producción de biodiesel como fuente de carbono durante el tiempo óptimo de crecimiento y producción de aceites microbianos.
- Caracterizar el aceite microbiano de cada prueba por medio de cromatografía para conocer los ácidos grasos presentes.
- Separar la biomasa por medio de una centrifugadora adecuada para evitar pérdidas en tubos de centrifugación, como sucede a nivel laboratorio.
- Secar la biomasa en un recipiente de vidrio que permita que la capa de biomasa sea pequeña para asegurar que la humedad haya sido eliminada y el tiempo de secado sea menor.
- Ensayar diferentes métodos de extracción como ondas ultrasónicas o microondas, para romper la pared celular de la biomasa y obtener mayor rendimiento de aceites microbianos.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aimeretti, Nora, *et.al.* 2008. <<Aprovechamiento de la glicerina obtenida durante la producción de biodiesel>> Invenio de la Universidad del centro educativo latinoamericano [Argentina]. 11 (020): 137-144.
2. Biodisol. sf. *Materias primas para la elaboración de biodiesel*.  
Disponible en:  
<http://www.biodisol.com/biodiesel-que-es-el-biodiesel-definicion-de-biodiesel-materias-primas-comunes/biodiesel-materias-primas-con-que-se-fabrica-biodiesel-aceites-y-grasas-produccion/>
3. Cameron Douglas y J. Koutsky.1994. *Conversion of Glycerol from SoyDiesel Production to 1,3-propanediol*.Department of Chemical Engineering, UW-Madison. 26 págs.
4. Ertola Rodolfo; O. Yantorno y C. Mignone.1994. *Microbiología industrial*. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
5. *Laboratorios Britania*. s.f. Caldo Sabouraud. Argentina.  
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/sabouraudcaldo.htm>
6. Larosa, Rodolfo. 2001. *Proceso para la producción de biodiesel*. Publicado en biodiesel Uruguay. 8 págs.  
Disponible en: [www.biodiesel-uruguay.com](http://www.biodiesel-uruguay.com)
7. Li, Qiang; D. Wei y L Dehua. 2008. <<Perspectives of microbial oils for biodiesel production>>. *Appl Microbiol Biotechnol.* (80):749-756.
8. Mateos Pedro. sf. *Tipos de fermentadores*. Universidad de Salamanca. Tema 12: 5 págs.

9. Naresh, Brian. 2006. *Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A survey of current research activities*. Biological and Agricultural Engineering, University of Idaho. American Society of Agricultural and Biological Engineers.
10. Núñez, Carlos. 2008. Extracciones con equipo soxhlet. 5 págs.
11. *Productos químicos Monterrey, S.A.* 1998. Hoja de datos de seguridad para sustancias químicas. México. 3 págs.  
Disponible en: <http://antiguo.itson.mx/laboratorios/GLICERINA.pdf>
12. Quintero Rodolfo. 1981. *Ingeniería bioquímica*. México, D.F. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. 331 págs.
13. Skoog, Douglas, et al. 2005. *Fundamentos de química analítica*. 8ª edición. México. 1065 págs.
14. Velasco Reinaldo; H. Villada y J. Carrera. 2007. <<Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria>>. Universidad del Cauca. Publicado en Revista información tecnológica. 18 (1): 56-66 págs.

## XII. APÉNDICE

### A. Procedimiento

Figura No. 5: Procedimiento experimental

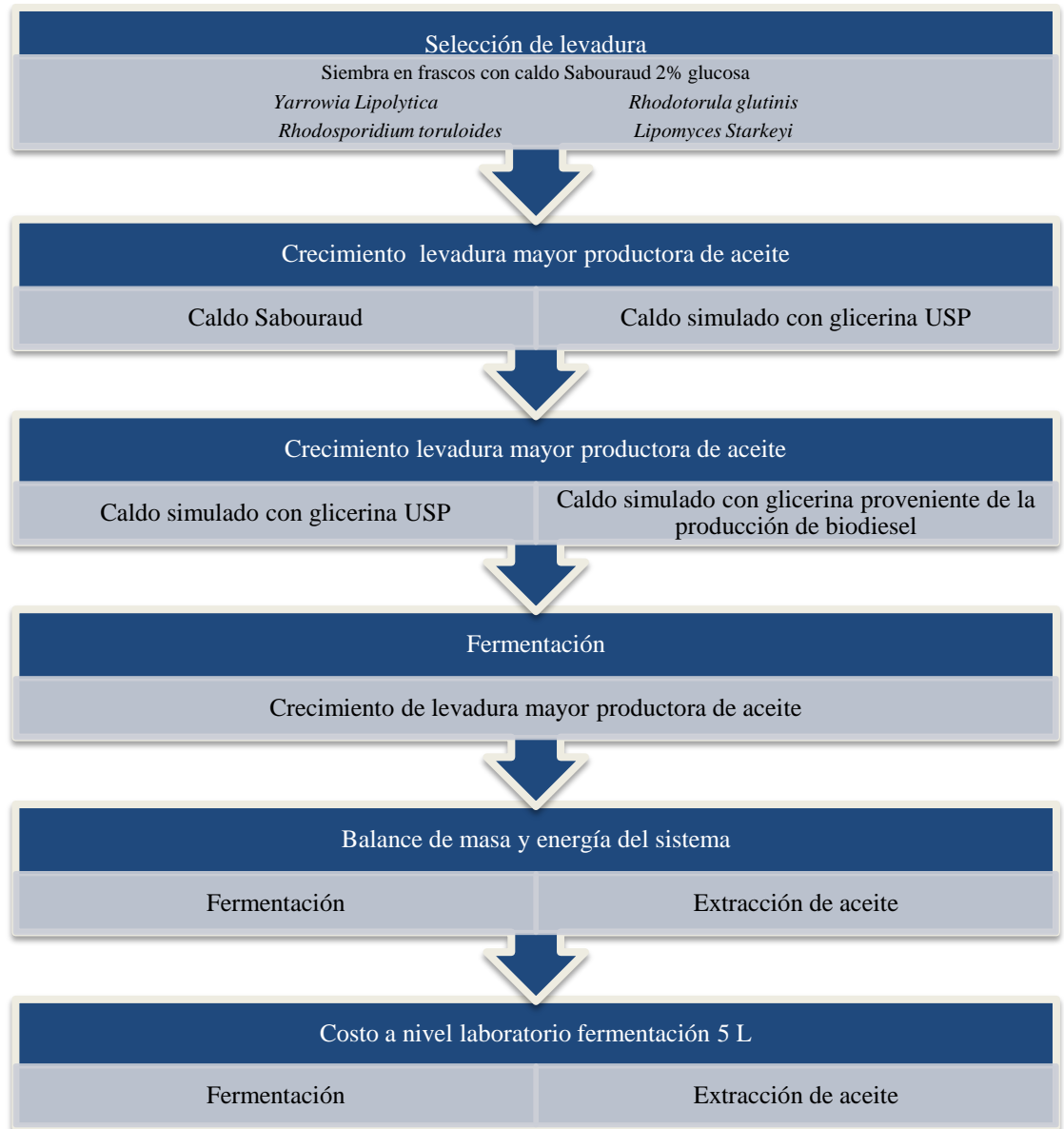


Figura No. 6: Diagrama de entradas y salidas de la fermentación para la producción de biomasa.



Figura No. 7: Diagrama de entradas y salidas extracción de aceites microbianos

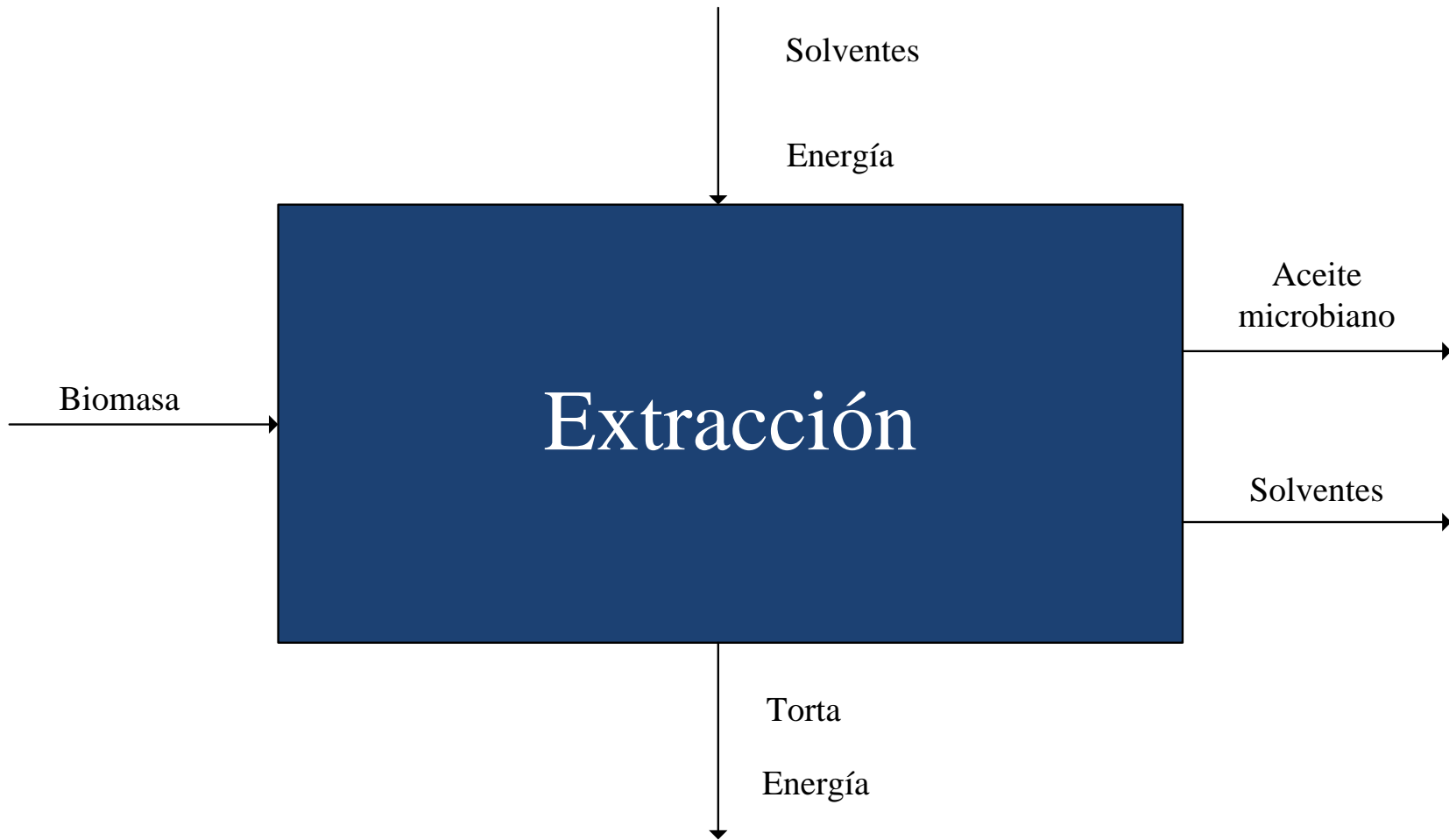


Figura No. 8: Diagrama de procedimiento de siembra de levadura en frascos de cultivo.

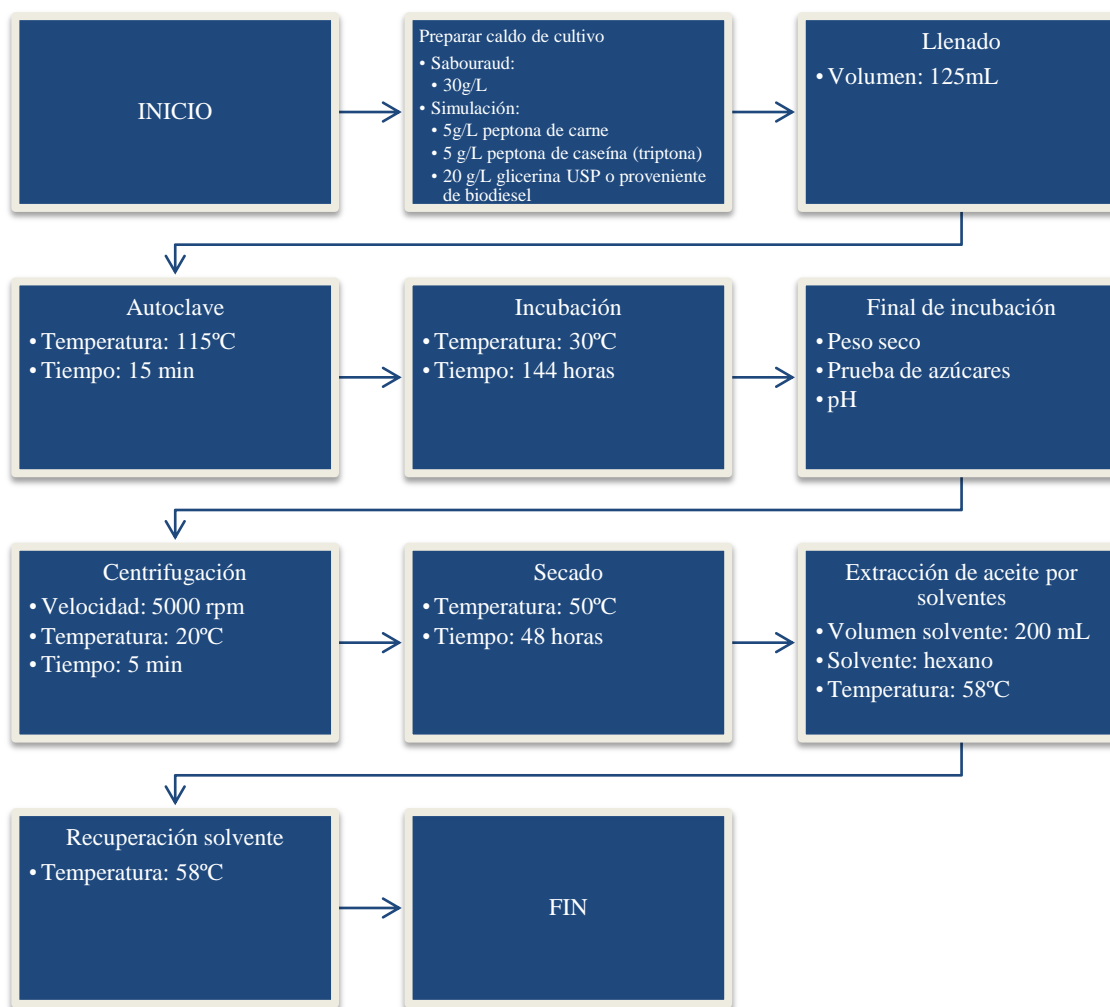
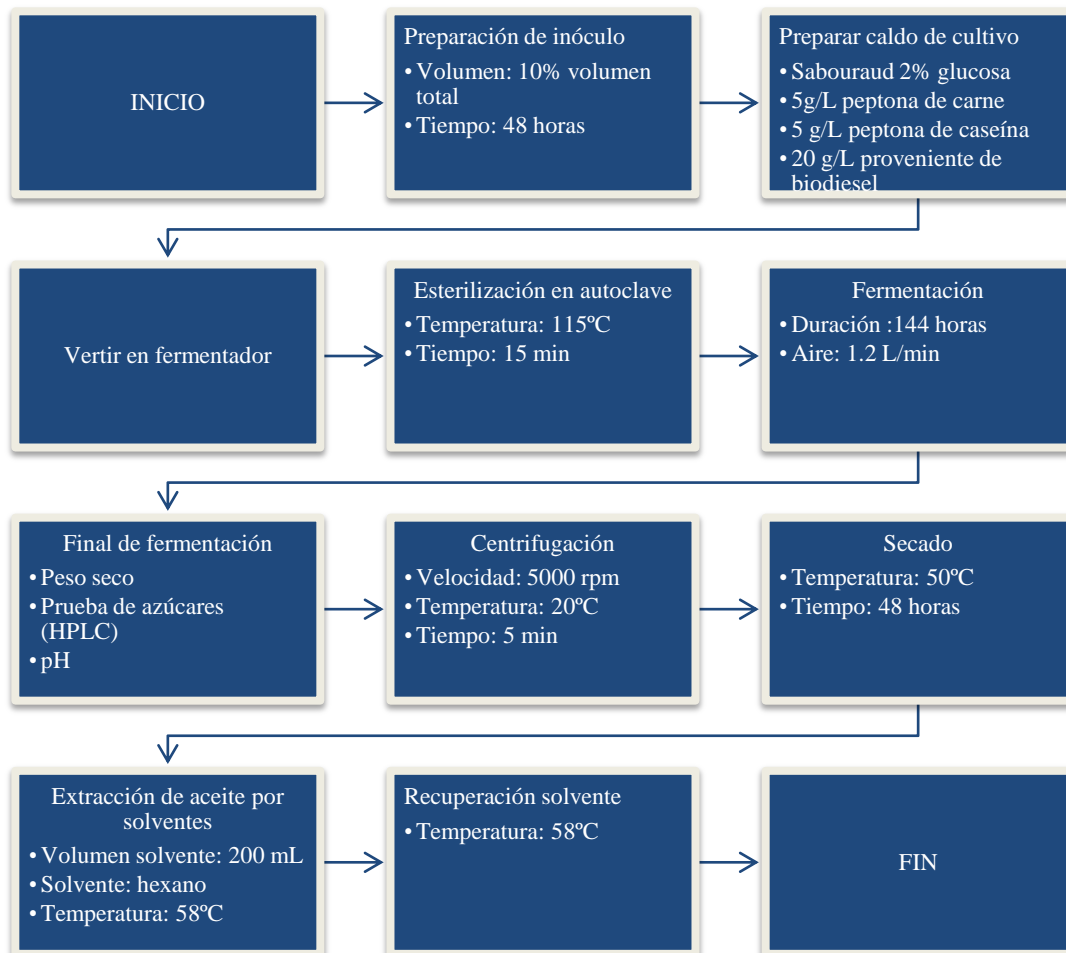


Figura No. 9: Diagrama de procedimiento de siembra de levadura en fermentador 5 litros



Cuadro No. 18: Especificación del equipo utilizada en pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificaciones		
Incubadora	Marca:	Fisher Scientific	
	Modelo:	Isotemp	
	Frecuencia:	60	Hz
	Voltaje:	120	V
	Corriente:	2.2	A
	Potencia:	260	W
Autoclave	Marca:	Napco	
	Modelo:	8000-DSE	
	Frecuencia:	60	Hz
	Potencia:	1750 W	W
Incubadora con agitación	Marca:	New Brunswick Scientific	
	Modelo:	G-25	
	Frecuencia:	50/60	Hz
	Voltaje:	120	V
	Corriente:	10	A
	Potencia:	1200	W
Fermentador	Marca:	New Brunswick Scientific	
	Modelo:	Bioflo 2000	
	Frecuencia:	50/60	Hz
	Voltaje:	120	V
	Corriente:	10	A
	Potencia:	1200	W
Baño de enfriamiento	Marca:	Thermo Scientific	
	Frecuencia:	60	Hz
	Voltaje:	115	V
	Corriente:	10	A
	Potencia:	1150	W
Centrífuga	Marca:	Eppendorf AG	
	Modelo:	5804R	
	Frecuencia:	60	Hz
	Voltaje:	120	V
	Corriente:	12	A
	Potencia:	1300	W
	Energía cinética	27450	Nm
	Presión de operación:	45	bar
	Refrigerante	R134 A	

Continuación Cuadro No. 18: Especificación del equipo utilizada en pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificación	
Caldera	Marca:	Cleaver Brookes, Inc.
	Tipo:	Pirotubular
	Modelo:	M200 x30
	Presión de vapor:	150 lb/pulg <sup>2</sup>
Balanza	Marca:	Ohaus
	Modelo:	Pionner
	Capacidad:	110 g
	Incertidumbre	±0.0001 g
	Voltaje:	20 V
	Corriente:	5 A
	Potencia:	4 W
Manta de calentamiento	Voltaje:	115 V
	Potencia:	80 W
Compresor	Marca:	American Forge
	Modelo:	Pro
	Potencia:	5.5 HP
	Potencia:	4103 W

## B. Datos originales

Cuadro No. 19: Datos obtenidos para la elaboración de la curva patrón a base de glucosa, absorbancia leída a una longitud de onda de 540 nm

Tubo No.	Solución Glucosa 0.1% ±0.05mL	Agua ±0.05mL	Ac. 3,5-dinitrosalicílico ±0.05mL	Absorbancia ±0.001
0	0.00	2.00	2.00	0.039
1	0.10	1.90	2.00	0.086
2	0.20	1.80	2.00	0.130
3	0.40	1.60	2.00	0.195
4	0.60	1.40	2.00	0.268
5	0.80	1.20	2.00	0.326
6	1.00	1.00	2.00	0.538

Cuadro No. 20: Datos obtenidos para la elaboración de la curva patrón a base de glicerina USP utilizando cromatografía de capa líquida de alta resolución.

Concentración (%)	Área (UA)
0.25	274198
0.50	663530
1.00	1270050
1.50	1923070

Cuadro No. 21: Peso seco celular de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.

Muestra	Peso tubo ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g
1	12.3130	12.3974
2	12.3152	12.3983

Cuadro No. 22: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras *Yarrowia Lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Muestra No.	Peso tubo ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g	Absorbancia ± 0.001	pH ± 0.01
<i>Yarrowia Lipolytica</i>	1	12.3130	12.4041	0.305	8.08
	2	11.3259	11.3801	0.244	8.59
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1	12.4386	12.4687	0.525	8.71
	2	11.6838	11.7066	0.377	4.20
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	11.4951	11.5261	0.577	8.76
	2	11.4951	11.5261	0.577	8.76
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	1	12.3152	12.3342	0.448	4.75
	2	11.6853	11.6933	1.356	4.93

Cuadro No. 23: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras *Yarrowia Lipolytica*, *Rhodospordium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces Starkeyi* provenientes del crecimiento en caldo Sabouraud en frascos de cultivo.

Levadura	Peso muestra ± 0.0001 g	Peso balón ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g
<i>Yarrowia Lipolytica</i>	2.9641	108.5404	108.6638
<i>Rhodospordium toruloides</i>	0.4075	103.6439	103.7421
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.4694	108.5404	108.5544
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	0.3441	103.7025	103.8045

Cuadro No. 24: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento de las levaduras *Lipomyces Starkeyi* y *Rhodospordium toruloide* en caldo Sabouraud

Levadura	Medio	Muestra No.	Peso tubo ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g	Absorbancia ± 0.001	Concentración glicerina %	pH ± 0.01
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	Caldo	1	12.6038	12.6095	0.493	---	4.66
	Sabouraud	2	11.1278	11.1814	0.589	---	8.46
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	Simulado con	1	12.3152	12.3356	---	0.33	6.57
	Glicerina USP	2	12.222	12.2438	---	0.20	5.77
<i>Rhodospordium toruloides</i>	Caldo	1	12.3792	12.3823	0.845	---	5.79
	Sabouraud	2	12.5249	12.5659	1.313	---	8.70
<i>Rhodospordium toruloides</i>	Simulado con	1	11.4951	11.5165	---	0.55	6.39
	Glicerina USP	2	11.6838	11.7347	---	0.00	7.36

Cuadro No. 25: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras *Lipomyces Starkeyi* y *Rhodospiridium toruloide* provenientes del crecimiento en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP.

Levadura	Medio	Peso muestra ± 0.0001 g	Peso balón ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	Caldo Sabouraud	0.3533	103.6374	103.6507
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	Glicerina USP	0.3986	103.6401	103.6517
<i>Rhodospiridium toruloide</i>	Caldo Sabouraud	0.3952	108.5306	108.5326
<i>Rhodospiridium toruloide</i>	Glicerina USP	0.6949	103.648	103.6481

Cuadro No. 26: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras *Lipomyces Starkeyi* y *Yarrowia Lipolytica* en caldo Sabouraud

Levadura	Muestra	Peso tubo ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g	Absorbancia ± 0.001	pH ± 0.01
<i>Yarrowia Lipolytica</i>	1	12.3130	12.3743	0.231	8.17
	2	12.3152	12.3844	0.224	8.02
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	1	12.6038	12.6089	0.446	4.71
	2	12.4386	12.4474	0.4183	4.94

Cuadro No. 27: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por las levaduras *Lipomyces Starkeyi* y *Yarrowia Lipolytica* provenientes del crecimiento en frascos de cultivo en caldo Sabouraud.

Levadura	Peso muestra ± 0.0001 g	Peso balón ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g
<i>Yarrowia Lipolytica</i>	1.9262	108.8439	108.8610
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	0.2384	103.9637	103.9747

Cuadro No. 28: Mediciones tomadas para obtener cantidad de biomasa, glucosa consumida y pH del crecimiento en un fermentador de la levadura *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Muestra No.	Tiempo (h)	Peso tubo ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g	Absorbancia ± 0.001	pH ± 0.01
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	1	0	12.4386	12.4451	0.194	5.45
	2	0	12.3130	12.3175	0.195	6.12
	1	48	12.3152	12.3635	0.243	5.51
	2	48	12.3862	12.4333	0.252	5.49
	1	72	19.637	19.6938	0.275	5.35
	2	72	19.4738	19.5334	0.276	5.33
	1	144	12.313	12.3643	0.207	8.01
	2	144	12.4386	12.4901	0.208	7.94

Cuadro No. 29: Mediciones tomadas para obtener la cantidad de aceite producido por la levadura *Lipomyces Starkeyi* provenientes de la fermentación en caldo Sabouraud.

Levadura	Peso muestra ± 0.0001 g	Peso balón ± 0.0001 g	Peso total ± 0.0001 g
<i>Lipomyces Starkeyi</i>	18.1158	108.8439	108.9697

## C. Cálculos de muestra

### 1. Cálculo de peso seco

$$\text{Ecuación No. 4} \quad P_{\text{seco}} = P_{\text{total}} - P_{\text{tara}}$$

$P_{\text{seco}}$ : peso seco obtenido al centrifugar 10mL de muestra y secar a 50°C por 48 horas (g)

$P_{\text{tara}}$ : peso constante del tubo (g)

$P_{\text{total}}$ : Peso del tubo más la biomasa (g)

Ejemplo No. 1:

Cálculo de peso seco de la muestra No. 1 de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$P_{\text{seco}} = 12.3342 - 12.3152 = 0.0190\text{g}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar el peso seco de las demás muestras.

### 2. Cálculo de biomasa obtenida por volumen

$$\text{Ecuación No. 5} \quad \text{Biomasa} = \frac{P_{\text{seco}}}{V_{\text{muestra}}}$$

Biomasa: cantidad de levadura por volumen de caldo de cultivo (g/L)

$P_{\text{seco}}$ : peso seco obtenido al centrifugar 10mL de muestra y secar a 50°C por 48 horas (g)

$V_{\text{muestra}}$ : volumen de muestra (L)

Ejemplo No. 2:

Cálculo de biomasa de la muestra No. 1 de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$\text{Biomasa} = \frac{0.0190\text{g}}{0.01\text{L}} = 1.9\text{g} / \text{L}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar la cantidad de biomasa obtenida de las demás muestras.

## 3. Cálculo de concentración de glucosa consumida

$$\text{Ecuación No. 6} \quad C_{\text{glucosa}_c} = C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}}$$

$C_{\text{glucosa}_c}$ : concentración de glucosa consumida durante la fermentación (g/L)

$C_{\text{inicial}}$ : concentración inicial presente en el medio de cultivo (g/L)

$C_{\text{final}}$ : concentración final presente en el medio de cultivo (g/L)

Se realizó una curva patrón con tendencia lineal (Gráfica No. 14). La ecuación de la regresión obtenida fue:

$$\text{Ecuación No. 7} \quad y = 0.3369x - 0.018$$

y: absorbancia a una longitud de onda de 540 nm

x: Concentración de glucosa (g/L)

$$\text{Ecuación No. 8} \quad C_{\text{final}} = \frac{[Abs - B] - b}{m}$$

$C_{\text{final}}$ : concentración final presente en el medio de cultivo (g/L)

Abs: absorbancia a una longitud de onda de 540 nm

B: Blanco, absorbancia tomada a una longitud de onda de 540 nm

b: intercepto de la regresión

m: pendiente de la regresión

Ejemplo No. 3:

Cálculo de consumo de glucosa en la muestra No. 1 de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$C_{\text{final}} = \frac{[0.448 - 0.039] - 0.018}{0.3369} = 1.2 \text{ g / L}$$

$$C_{glucosa_c} = 20.0 \frac{g}{L} - 1.2 \frac{g}{L} = 18.8 \frac{g}{L}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar la cantidad de glucosa consumida en las demás muestras.

#### 4. Cálculo de rendimiento de biomasa

Ecuación No. 9

$$Y_s = \frac{Biomasa}{Sustrato}$$

$Y_s$ : Rendimiento o conversión del sustrato en producto (g levadura/g glucosa)

Biomasa: cantidad de levadura por volumen de caldo de cultivo (g levadura/L)

Sustrato: cantidad de fuente de carbono por volumen de caldo de cultivo (g glucosa/L)

Ejemplo No. 4:

Cálculo de rendimiento de biomasa en la muestra No. 1 de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$Y_s = \frac{1.9g \text{ _levadura / L}}{18.8g \text{ _glucosa / L}} = 0.10 \frac{g_{levadura}}{g_{glucosa}}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar el rendimiento de biomasa obtenido de las demás muestras.

#### 5. Cálculo rendimiento de lípidos por biomasa

Ecuación No. 10

$$Lípidos\_m = \frac{Aceite}{M_{Biomasa}}$$

Lípidos\_m: cantidad de aceite por biomasa (g aceite/ g levadura)

$M_{Biomasa}$ : peso de la muestra de levadura (g)

Aceite: peso de aceite obtenido de la extracción (g)

Ejemplo No. 5:

Cálculo de rendimiento de lípidos de la muestra obtenida de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$\text{Lípidos}_m = \frac{0.1020 \text{g}_{\text{aceite}}}{0.3441 \text{g}_{\text{levaduras}}} = 0.2964 \frac{\text{g}_{\text{aceite}}}{\text{g}_{\text{levaduras}}}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar el rendimiento de lípidos en las demás muestras.

6. Cálculo de rendimiento de aceite obtenido por volumen de medio de cultivo

Ecuación No. 11

$$\text{Lípidos}_V = \frac{\text{Aceite}}{V_{\text{caldo}_\text{cultivo}}}$$

Lípidos<sub>V</sub>: rendimiento de aceite por volumen de caldo de cultivo fermentado (g aceite/L)

Aceite: peso de aceite obtenido de la extracción (g)

V<sub>Caldo\_cultivo</sub>: Volumen del caldo de cultivo utilizado durante la fermentación (L)

Ejemplo No. 6:

Cálculo de rendimiento de aceite obtenido por volumen de medio de cultivo en una muestra de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo sabouraud.

$$\text{Lípidos}_V = \frac{0.1020 \text{g}_{\text{aceite}}}{0.25 \text{L}} = 0.41 \text{g}_{\text{aceite}} / \text{L}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar el rendimiento de lípidos en las demás muestras.

## 7. Cálculo de rendimiento de lípidos por cantidad de fuente de carbono

$$\text{Ecuación No. 12} \qquad \text{Lípidos}_C = \frac{\text{Lípidos}_V}{\text{Sustrato}}$$

Lípidos<sub>C</sub>: rendimiento de aceite por fuente de carbono consumida (g aceite/ g glucosa)

Lípidos<sub>V</sub>: aceite por volumen de caldo de cultivo fermentado (g aceite/ L)

Sustrato: cantidad de fuente de carbono consumido por volumen de caldo de cultivo (g glucosa/L)

Ejemplo No. 7:

Cálculo de porcentaje de lípidos por cantidad de fuente de carbono obtenido de una muestra de *Lipomyces Starkeyi* del primer crecimiento en frascos utilizando caldo Sabouraud.

$$\text{Lípidos}_C = \frac{0.4080 \text{ g}_{\text{aceite}} / \text{L}}{17.4918 \text{ g}_{\text{glucosa}} / \text{L}} = 0.0233 \text{ g}_{\text{aceite}} / \text{g}_{\text{glucosa}}$$

Se realizó este mismo cálculo para determinar el porcentaje de rendimiento de lípidos en las demás muestras.

## 8. Cálculos para obtener diagrama de cajas

En este tipo de gráfica se representan los tres cuartiles y los datos mínimo y máximo en una caja rectangular alineada en sentido vertical. La caja abarca el rango intercuartílico, con el borde inferior en el primer cuartil ( $q_1$ ) y el borde superior en el tercer cuartil ( $q_3$ ). Se traza una línea a través de la caja en el segundo cuartil (que es el percentil 50 o mediana,  $q_2$ ). Una línea, o bigote, se extiende desde cada extremo de la caja. El bigote bajo es una línea que va del primer cuartil al punto correspondiente al menor de los datos dentro de 1.5 rangos intercuartílicos a partir del primer cuartil. El bigote superior es una línea que va del tercer cuartil al punto correspondiente al mayor de los datos dentro de 1.5 rangos intercuartílicos a partir del tercer cuartil.

El diagrama de cajas se realizó utilizando el diagrama de cotización en el programa Excel. Para esto se realizaron los siguientes cálculos:

Primer cuartil ( $q_1$ )	Percentil(matriz,0.25)
Segundo cuartil ( $q_2$ )=media	Percentil(matriz,0.5)
Tercer cuartil ( $q_3$ )	Percentil(matriz,0.75)
Amplitud intercuartil (AIC)	$q_3 - q_1$
FES	$1.5 * AIC$
Límite inferior	$q_1 - FES$
Límite superior	$q_3 + FES$
Adyacente inferior	Dato menor dentro de límite
Adyacente superior	Dato superior dentro de límite

Se graficó  $q_1$ , adyacente inferior, adyacente superior y  $q_3$ .

#### Ejemplo No. 8:

Cálculo para obtener el diagrama de cajas para la biomasa obtenido del crecimiento en frascos de levadura *Lipomyces Starkeyi*.

Como se explicó anteriormente se utilizaron las funciones de Excel para obtener los siguientes datos.

$q_1$	0.63
$q_2$	0.84
$q_3$	1.64
AIC	1.02
FES	1.53
Límite inferior	-0.90
Límite superior	3.17
Adyacente inferior	0.51
Adyacente superior	1.90

## 9. Cálculo de potencia

Ecuación No. 13

$$P = V * I$$

P: potencia (W)

I: Corriente (A)

V: Voltaje (V)

Ejemplo No. 9:

Potencia consumida por la incubadora con agitación

$$P = 120V * 10A = 1200W$$

## D. Datos calculados

Cuadro No. 30: Concentración de glucosa nivel reactivo para la elaboración de una curva patrón y absorbancia leída a una longitud de onda de 540 nm corregido con el blanco.

Tubo No.	Concentración glucosa (g/L)	Absorbancia
0	0	0
1	0.1017	0.0467
2	0.2034	0.0908
3	0.4068	0.1557
4	0.6102	0.2294
5	0.8136	0.2872
6	1.017	0.4985

Cuadro No. 31: Peso seco celular obtenido del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en medio con glicerina proveniente de la producción de biodiesel.

Muestra	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)
1	0.0844	8.44
2	0.0831	8.31
Promedio	0.0837	8.37

Cuadro No. 32: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras *Yarrowia Lipolytica*, *Rhodospiridium Toruloides*, *Rhodotorula Glutinis*, *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Muestra	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)	Glucosa no consumida (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Ys
<i>YL</i>	1	0.0911	9.11	0.74	19.26	47.29%
	2	0.0542	5.42	0.56	19.44	27.87%
<i>RT</i>	1	0.0301	3.01	1.39	18.61	16.17%
	2	0.0228	2.28	0.95	19.05	11.97%
<i>RG</i>	1	0.0236	2.36	1.70	18.30	12.90%
	2	0.0310	3.10	1.54	18.46	16.80%
<i>LS</i>	1	0.0190	1.90	1.16	18.84	10.09%
	2	0.0080	0.80	3.86	16.14	4.96%

Cuadro No. 33: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras *Yarrowia Lipolytica*, *Rhodospiridium Toruloides*, *Rhodotorula Glutinis*, *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	% Ys
<i>YL</i>	7.26±2.61	19.35±0.13	8.34±0.36	37.58%
<i>RT</i>	2.65±0.52	18.83±0.31	6.46±3.19	14.07%
<i>RG</i>	2.73±0.52	18.38±0.11	8.68±0.11	14.85%
<i>LS</i>	1.35±0.78	17.49±1.91	4.84±0.13	7.52%

Cuadro No. 34: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Rhodosporidium Toruloides*, *Rhodotorula Glutinis*, *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Aceite Extraído (g)	Rendimiento de lípidos g ac/g lev	% Lípidos_m	Rendimiento lípidos (g ac/g gluc)	% Lípidos_C	Rendimiento de lípidos, (g ac/L)	% Lípidos_V
<i>YL</i>	0.1234	0.0416	4.16%	0.0255	2.55%	0.4936	49.36%
<i>RT</i>	0.0982	0.2410	24.10%	0.0209	2.09%	0.3928	39.28%
<i>RG</i>	0.0140	0.0298	2.98%	0.0030	0.30%	0.0560	5.60%
<i>LS</i>	0.1020	0.2964	29.64%	0.0233	2.33%	0.4080	40.80%

Cuadro No. 35: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras *Rhodosporidium Toruloides* y *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP.

Levadura	Medio	Muestra	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)	Concentración carbono (g/L)	Carbono consumido (g/L)	% Ys
<i>LS</i>	Caldo Sabouraud	1	0.0057	0.57	1.29	18.71	3.05%
		2	0.0536	5.36	1.58	18.42	29.10%
	Glicerina USP	1	0.0204	2.04	3.28	16.72	12.20%
		2	0.0218	2.18	2.03	17.97	12.13%
<i>RT</i>	Caldo Sabouraud	1	0.0031	0.31	2.34	17.66	1.76%
		2	0.0410	4.10	3.73	16.27	25.20%
	Glicerina USP	1	0.0214	2.14	5.45	14.55	14.71%
		2	0.0509	5.09	0.00	20.00	25.45%

Cuadro No. 36: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras *Rhodospiridium toruloides* y *Lipomyces starkeyi* en caldo Sabouraud y caldo simulado con glicerina USP.

Levadura	Medio	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	% Ys
LS	Caldo Sabouraud	2.97±3.39	18.56±0.20	6.56±2.69	16.07%
	Glicerina USP	2.11±0.10	17.35±0.88	6.17±0.57	12.17%
RT	Caldo Sabouraud	2.20±2.68	16.97±0.98	7.25±2.06	13.48%
	Glicerina USP	3.62±2.09	17.27±3.86	6.88±0.69	20.08%

Cuadro No. 37: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de las levaduras *Rhodospiridium Toruloides* y *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud (CS) y caldo simulado con glicerina USP (GUSP)

Levadura	Medio	Aceite extraído (g)	Rendimiento de lípidos g ac/g lev	%Lípidos_m	Rendimiento de lípidos (g ac/g carb)	%Lípidos_C	Rendimiento de lípidos (g ac/L)	%Lípidos_V
LS	CS	0.0133	0.0376	3.76%	0.0029	0.29%	0.0532	5.3%
	GUSP	0.0116	0.0291	2.91%	0.0027	0.27%	0.0464	4.6%
RT	CS	0.0020	0.0051	0.51%	0.0009	0.09%	0.0160	1.6%
	GUSP	0.0001	0.0001	0.01%	0.0000	0.00%	0.0004	0.0%

Cuadro No. 38: Parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de cultivo de las levaduras *Yarrowia Lipolytica* y *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Muestra	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)	Concentración carbono (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Ys
<i>YL</i>	1	0.0613	6.13	0.52	19.48	31.46%
	2	0.0692	6.92	0.49	19.51	35.47%
<i>LS</i>	1	0.0051	0.51	1.15	18.85	2.71%
	2	0.0088	0.88	1.07	18.93	4.65%

Cuadro No. 39: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en frascos de las levaduras *Yarrowia Lipolytica* y *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Biomasa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	pH	% Ys
<i>YL</i>	6.52±0.56	19.50±0.02	8.10±0.11	33.47%
<i>LS</i>	0.70±0.26	18.89±0.06	4.83±0.16	3.68%

Cuadro No. 40: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del cultivo en frascos de las levaduras *Yarrowia Lipolytica* y *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud.

Levadura	Aceite extraído (g)	Rendimiento de lípidos g ac/g lev	%Lípidos_m	Rendimiento de lípidos (g ac/g carb)	%Lípidos_C	Rendimiento de lípidos (g ac/L)	%Lípidos_V
<i>YL</i>	0.0171	0.0089	0.89%	0.0018	0.18%	0.0342	3.42%
<i>LS</i>	0.0110	0.0461	4.61%	0.0012	0.12%	0.0220	2.20%

Cuadro No. 41: Parámetros obtenidos de los crecimientos en frascos de cultivo de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, durante la fase 1.

Levadura	Biomasa (g/L)	%Rendimiento Biomasa	%Lípidos (g aceite/g biomasa)	% Lípidos (gaceite/g glucosa)	Ph	Glucosa consumida (g/L)	Glucosa no consumida (g/L)
YL-1	9.11	47.29%	4.16%	2.55%	8.08	19.26	0.74
YL-1	5.42	27.87%			8.59	19.44	0.56
YL-2	6.13	31.46%	0.89%	0.18%	8.17	19.48	0.52
YL-2	6.92	35.47%			8.02	19.51	0.49
LS-1	1.90	10.09%	29.64%	2.33%	4.75	18.84	1.16
LS-1	0.80	4.96%			4.93	16.14	3.86
LS-2	0.51	2.71%	4.61%	0.12%	4.71	18.85	1.15
LS-2	0.88	4.65%			4.94	18.93	1.07
RT-1	3.01	16.17%	24.10%	2.09%	8.71	18.61	1.39
RT-1	2.28	11.97%			4.20	19.05	0.95
RG-1	2.36	12.90%	2.98%	0.30%	8.60	18.30	1.70
RG-1	3.10	16.80%			8.76	18.46	1.54

Cuadro No. 42: Parámetros obtenidos de los crecimientos en frascos de cultivo de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, durante la fase 2.

Levadura	Biomasa (g/L)	%Rendimiento Biomasa	%Lípidos (g aceite/g biomasa)	% Lípidos (gaceite/g glucosa)	Ph	Glucosa consumida (g/L)	Glucosa no consumida (g/L)
LS-3	0.57	3.05%	3.76%	0.29%	4.66	18.71	1.29
LS-3	5.36	29.10%			8.46	18.42	1.58
RT-3	0.31	1.76%	0.51%	0.09%	5.79	17.66	2.34
RT-3	4.10	25.20%			8.7	16.27	3.73

Cuadro No. 43: Media, desviación estándar y mediana de los parámetros obtenidos de las pruebas de crecimiento en frascos de cultivo de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa.

Parámetro	Levadura	YL	LS	RT	RG
Biomasa (g/L)	Media	6.89	0.69	2.42	2.73
	Desviación estándar	1.60	0.18	1.60	0.52
	<b>Mediana</b>	<b>6.52</b>	<b>0.84</b>	<b>2.65</b>	<b>2.73</b>
Glucosa consumida (g/L)	Media	19.42	18.75	17.90	18.38
	Desviación estándar	0.11	0.20	1.23	0.11
	<b>Mediana</b>	<b>19.46</b>	<b>18.77</b>	<b>18.14</b>	<b>18.38</b>
pH	Media	8.22	4.80	6.85	8.68
	Desviación estándar	0.26	0.13	2.24	0.11
	<b>Mediana</b>	<b>8.13</b>	<b>4.84</b>	<b>7.25</b>	<b>8.68</b>
Porcentaje Rendimiento (Ys)	Media	35.53%	5.09%	13.77%	14.85%
	Desviación estándar	8.44%	2.96%	9.73%	2.76%
	<b>Mediana</b>	<b>33.47%</b>	<b>4.80%</b>	<b>14.07%</b>	<b>14.85%</b>
Porcentaje rendimiento lípidos (lípidos/biomasa)	Media	2.53%	4.19%	12.30%	nsd
	Desviación estándar	2.32%	0.60%	16.68%	nsd
	<b>Mediana</b>	<b>2.53%</b>	<b>4.61%</b>	<b>12.30%</b>	<b>2.98%</b>
Porcentaje rendimiento lípidos (lípidos/fuente carbono)	Media	1.36%	0.20%	1.09%	nsd
	Desviación estándar	1.68%	0.12%	1.41%	nsd
	<b>Mediana</b>	<b>1.36%</b>	<b>0.29%</b>	<b>1.09%</b>	<b>0.30%</b>

nsd: no se determinó

Cuadro No. 44: Percentil de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa.

BIOMASA								
Muestra (x)	YL	Percentil	LS	Percentil	RT	Percentil	RG	Percentil
1	5.42	5.95	0.51	0.63	0.31	1.79	2.36	2.54
2	6.13	6.52	0.57	0.84	2.28	2.65	3.10	2.73
3	6.92	7.47	0.80	1.64	3.01	3.28	---	2.91
4	9.11	---	0.88	---	4.10	---	---	---
5	---	---	1.90	---	---	---	---	---
6	---	---	5.36	---	---	---	---	---
RENDIMIENTO (Y <sub>s</sub> )								
1	27.87%	0.31	2.71%	0.03	1.76%	0.09	12.90%	0.14
2	31.46%	0.33	3.05%	0.05	11.97%	0.14	16.80%	0.15
3	35.47%	0.38	4.65%	0.09	16.17%	0.18	---	0.16
4	47.29%	---	4.96%	---	25.20%	---	---	---
5	---	---	10.09%	---	---	---	---	---
6	---	---	29.10%	---	---	---	---	---
%LÍPIDOS (p líp/p lev)								
1	0.89%	0.0171	3.76%	0.0419	0.51%	0.0640	2.98%	nsd
2	4.16%	0.0253	4.61%	0.0461	24.10%	0.1230	---	---
3	---	0.0334	29.64%	0.1713	---	0.1820	---	---
%LÍPIDOS (p líp/p glucosa)								
1	0.18%	0.0077	0.12%	0.0020	0.09%	0.0059	0.30%	nsd
2	2.55%	0.0136	0.29%	0.0029	2.09%	0.0109	---	---
3	---	0.0196	2.33%	0.0131	---	0.0159	---	---

Cuadro No. 45: Análisis estadístico para trazado de diagrama de cajas de los datos de biomasa obtenida en los crecimientos a nivel frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa.

BIOMASA				
Análisis	YL	LS	RT	RG
Amplitud intercuartil	1.51	1.02	1.50	0.37
FES	2.27	1.53	2.24	0.555
Límite inf	3.68	-0.90	-0.46	1.99
Límite sup	9.74	3.17	5.53	3.47
Adyacente inf	5.42	0.51	0.31	2.36
Adyacente sup	9.11	1.90	4.10	3.10
Mediana	6.52	0.84	2.65	2.73
Media	6.89	0.69	2.42	2.73
Desviación estándar	1.60	0.18	1.60	0.52
RENDIMIENTO (Y <sub>s</sub> )				
Amplitud intercuartil (AIC)	0.08	0.05	0.09	0.02
1.5 AIC	0.12	0.08	0.14	0.03
Límite inf	18.77%	-4.59%	-4.11%	10.95%
Límite sup	50.22%	16.84%	31.95%	18.75%
Adyacente inf	27.87%	2.71%	1.76%	12.90%
Adyacente sup	47.29%	10.09%	25.20%	16.80%
Mediana	33.47%	4.80%	14.07%	14.85%
Media	35.53%	5.09%	13.77%	14.85%
Desviación estándar	8.44%	2.96%	9.73%	2.76%
%LÍPIDOS (p líp/p lev)				
Amplitud intercuartil (AIC)	0.02	0.13	0.12	nsd
1.5 AIC	0.02	0.19	0.18	nsd
Límite inf	-0.75%	-15.22%	-11.29%	nsd
Límite sup	5.80%	36.54%	35.89%	nsd
Adyacente inf	0.89%	3.76%	0.51%	nsd
Adyacente sup	4.16%	29.64%	24.10%	nsd

Continuación cuadro No. 46: Análisis estadístico para trazado de diagrama de cajas de los datos de biomasa obtenida en los crecimientos a nivel frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa.

Análisis	YL	LS	RT	RG
Mediana	2.53%	4.61%	12.30%	nsd
Media	2.53%	4.19%	12.30%	nsd
Desviación estándar	2.32%	0.60%	16.68%	nsd
%LÍPIDOS (p líp/p glucosa)				
Amplitud intercuartil (AIC)	0.01	0.01	0.01	nsd
1.5 AIC	0.02	0.02	0.01	nsd
Límite inf	-1.01%	-1.46%	-0.90%	nsd
Límite sup	3.74%	2.97%	3.08%	nsd
Adyacente inf	0.18%	0.12%	0.09%	nsd
Adyacente sup	2.55%	2.33%	2.09%	nsd
Mediana	1.36%	0.29%	1.09%	nsd
Media	1.36%	0.20%	1.09%	nsd
Desviación estándar	1.68%	0.12%	1.41%	nsd

Cuadro No. 47: Prueba Q de puntos atípicos de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, utilizada para obtener medias y desviaciones estándar.

BIOMASA				
Dato	Prueba Q	Q crítico	No. Observaciones	Decisión
LS-x6	0.713	0.625	6	Rechazo
LS-x5	0.734	0.710	5	Rechazo
YL-x4	0.593	0.829	4	No rechazo
RT-x1	0.520	0.829	4	No rechazo
RENDIMIENTO (Y <sub>s</sub> )				
YL-x4	0.609	0.829	4	No rechazo
LS-x6	0.720	0.625	6	Rechazo

Continuación cuadro No. 48: Prueba Q de puntos atípicos de parámetros obtenidos en los crecimientos a nivel frascos de *Yarrowia Lipolytica*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis* utilizando Caldo Sabouraud al 2% de glucosa, utilizada para obtener medias y desviaciones estándar.

LS-x5	0.695	0.710	5	No rechazo
RT-x1	0.436	0.829	4	No rechazo
RT-x4	0.385	0.829	4	No rechazo
%LÍPIDOS (p líp/p lev)				
LS-x3	0.967	0.71	3	Rechazo
%LÍPIDOS (p líp/p glucosa)				
LS-x3	0.923	0.710	3	Rechazo
pH				
YL-x4	0.737	0.829	4	No rechazo
LS-x6	0.926	0.625	6	Rechazo
RT-x1	0.353	0.829	4	No rechazo
Glucosa consumida (g/L)				
LS-x1	0.818	0.625	6	Rechazo
RT-x1	0.500	0.829	4	No rechazo

Cuadro No. 49: Parámetros obtenidos del crecimiento en un fermentador de *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud durante 144 horas.

Levadura	Muestra No.	Tiempo (h)	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)	Concentración glucosa (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Ys
Lipomyces Starkeyi	1	0	0.0065	0.65	20.33	0.00	0.00%
	2	0	0.0045	0.45	20.48	0.00	0.00%
	1	48	0.0483	4.83	0.55	19.45	24.84%
	2	48	0.0471	4.71	0.58	19.42	24.25%
	1	72	0.0568	5.68	0.65	19.35	29.35%
	2	72	0.0596	5.96	0.65	19.35	30.80%
	1	144	0.0513	5.13	0.45	19.55	26.23%
	2	144	0.0515	5.15	0.45	19.55	26.34%

Cuadro No. 50: Media y desviación estándar de los parámetros obtenidos del crecimiento en un fermentador de *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud durante 144 horas.

Levadura	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Glucosa no consumida (g/L)	pH	% Ys
LS	0	0.55±0.14	0.00	20.41±1.05E-01	5.79±0.47	0
	48	4.22±0.08	19.43±1.89E-02	0.57±1.89E-02	5.50±0.01	21.7%
	72	5.27±0.20	19.35±2.10E-03	0.65±2.10E-03	5.34±0.01	27.2%
	144	4.59±0.01	19.55±2.10E-03	0.45±2.10E-03	7.98±0.05	23.5%

Cuadro No. 51: Rendimiento de aceite extraído de la biomasa obtenida del crecimiento en un fermentador de *Lipomyces Starkeyi* en caldo Sabouraud durante 144 horas.

Levadura	Aceite extraído (g)	Rendimiento de lípidos (g ac/g lev)	%Lípidos_m	Rendimiento de lípidos (g ac/g carb)	%Lípidos_C	Rendimiento de lípidos (g ac/L)	%Lípidos_V
LS	0.1258	0.0069	0.69%	0.0018	0.18%	0.0359	3.59%

Cuadro No. 52: Potencia consumida y costo eléctrico de una fermentación en el reactor de 5 L.

Equipo	Tiempo (h)	Potencia (Kw)	P (Kw/h)	KW-h	Costo total
Incubadora	48	0.26	5.42E-03	12.48	Q11.98
Autoclave	0.5	1.75	3.50	0.875	Q0.84
Incubadora con agitación	72	1.2	1.67E-02	86.4	Q82.94
Fermentador	144	1.2	8.33E-03	172.8	Q165.89
Baño de enfriamiento	144	1.15	7.99E-03	165.6	Q158.98
Centrífuga	0.8	1.3	1.6	1.083	Q1.04
Compresor	30	4.103	1.4E-01	123.1	Q118.17
Balanza	0.2	0.004	0.02	7E-04	Q0.0006
Manta de calentamiento	2.67	0.08	0.03	0.213	Q0.20
TOTAL				562.5	Q540.04

Cuadro No. 53: Costo total de producción de aceites microbianos en utilizando un fermentador de 5 L.

Descripción	Cantidad	Costo	Costo unitario	Consumo	Costo total
Caja petri (unidad)	500	Q647.78	Q1.30	1.0	Q1.30
Agar Patata Dextrosa (g)	500	Q830.00	Q1.66	1.0	Q1.62
Caldo Sabouraud (g)	500	Q1,180.00	Q2.36	135.0	Q318.60
Agua (L)	18.9	Q18.00	Q0.95	4.5	Q4.29
Hexano (L)	3.78	700	Q185.19	0.2	Q37.04
Energía eléctrica (kW-h)	1	Q0.96	Q0.96	562.5	Q540.04
Vapor (m <sup>3</sup> )	1	Q200.00	Q200.00	0.004	Q0.80
Mano de obra (hH)	60	Q1,800.00	Q11.25	12.0	Q135.00
Total					Q1,038.68

## E. Análisis de error

Media

Ecuación No. 14

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

$\bar{x}$  :media

$x_i$ : valores de x que componen el conjunto

N: número medidas de las réplicas

Ejemplo No. 10:

Media de biomasa obtenida del crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* en todos los crecimientos en frascos utilizando Caldo Sabouraud.

$$\bar{x} = \frac{0.51 + 0.57 + 0.80 + 0.88}{4} = 0.69 \text{ g / L}$$

Desviación estándar

Ecuación No. 15

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$x_i$  : valor que se está evaluando

$\bar{x}$  : media

N-1: número de grados de libertad

Ejemplo No. 11:

Desviación estándar del promedio de la biomasa obtenida del crecimiento en frascos con Caldo Sabouraud de *Lipomyces Starkeyi*.

$$s = \sqrt{\frac{(0.51 - 0.69)^2 + (0.57 - 0.69)^2 + (0.80 - 0.69)^2 + (0.88 - 0.69)^2}{3}} = 0.18$$

Se utilizó la función Desvest de Excel para obtener todas las desviaciones estándar de todos los promedios.

Mediana

La mediana es el resultado medio cuando los datos se escriben en orden creciente o decreciente. Hay números de resultados iguales mayores o menores que la mediana. Para un número de resultados impar, la mediana se evalúa de manera directa. Si es par, se usa la media del par central.

Número de resultados impar:

Ecuación No. 16

$$\text{mediana} = \text{valor}_{\text{medio}}$$

Número de resultados par:

$$\text{Ecuación No. 17} \quad \text{mediana} = \frac{\text{valores}_{\text{medios}}}{2}$$

Ejemplo No. 12:

Mediana para la biomasa obtenida del crecimiento en frascos de *Lipomyces Starkeyi* con Caldo Sabouraud, sin eliminar datos discordantes.

Los datos ordenados de menor a mayor obtenidos de seis pruebas realizadas fueron:

Datos	Biomasa (g/L)
x <sub>1</sub>	0.51
x <sub>2</sub>	0.57
x <sub>3</sub>	0.80
x <sub>4</sub>	0.88
x <sub>5</sub>	1.90
x <sub>6</sub>	5.36

$$\text{mediana} = \frac{0.80 + 0.88}{2} = 0.84$$

Prueba o Test Q

$$\text{Ecuación No. 18} \quad Q = \frac{|x_q - x_n|}{w}$$

x<sub>q</sub>: valor discordante

x<sub>n</sub>: valor más cercano al discordante

w: dispersión del todo el conjunto de datos

El valor  $Q$  se compara con  $Q_{\text{crit}}$  (véase el Cuadro No. XX en la sección de antecedente). El dato discordante se rechaza si  $Q > Q_{\text{crit}}$ . Se utilizó 95% de confianza.

Ejemplo No. 13:

Prueba  $Q$  para la biomasa obtenida del crecimiento en frascos de *Lipomyces Starkeyi* con Caldo Sabouraud.

Los datos ordenados de menor a mayor obtenidos de seis pruebas realizadas fueron:

Datos	Biomasa (g/L)
$x_1$	0.51
$x_2$	0.57
$x_3$	0.80
$x_4$	0.88
$x_5$	1.90
$x_6$	5.36

Al observar los datos se detecta que los dos últimos datos ( $x_5$  y  $x_6$ ) son valores altos en comparación a los demás. Por lo tanto, se procedió a aplicar la prueba  $Q$  primero para el  $x_6$ .

$$Q = \frac{|5.36 - 1.90|}{(5.36 - 0.51)} = 0.713$$

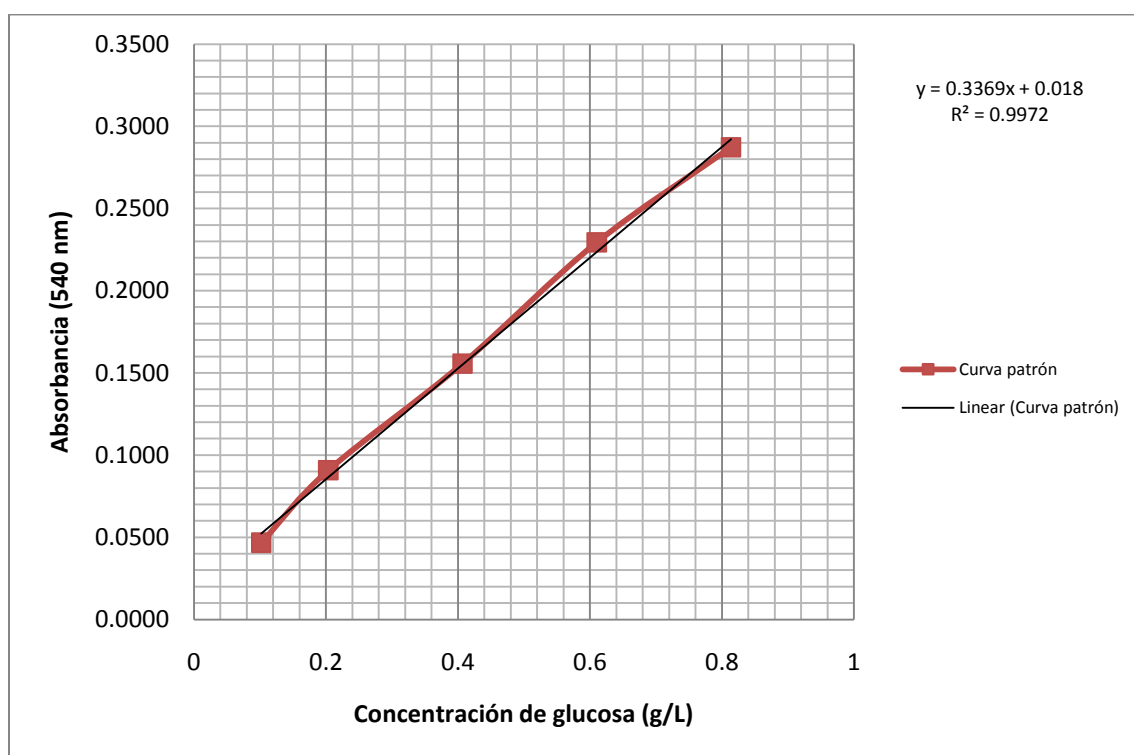
$Q_{\text{crítico}}$  para 6 observaciones es de 0.625.

Debido a que  $Q=0.713 > Q_{\text{crítico}}=0.625$  se rechaza  $x_6$ . El mismo procedimiento se realizó con el dato  $x_5$  que también se rechazó.

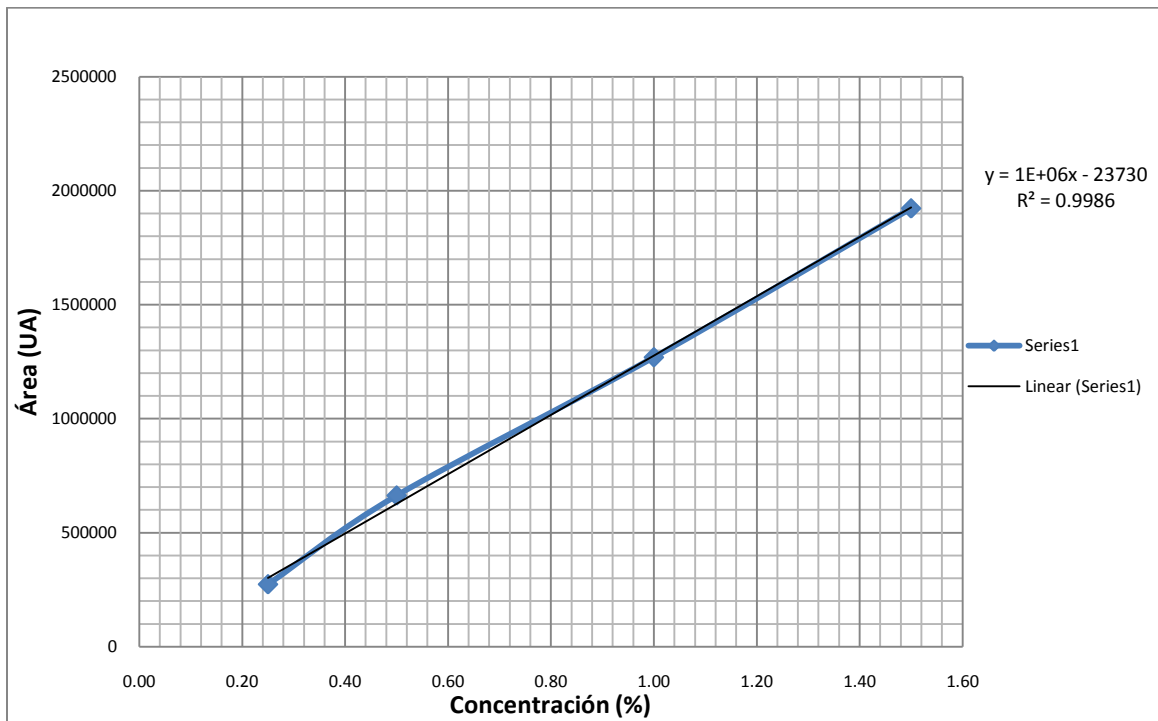
Este mismo procedimiento se llevó a cabo con los resultados que parecían discordantes para comprobar si se rechazaban o no. Se aplicó para las pruebas realizadas en frascos para obtener medias y desviaciones estándar de todas las pruebas realizadas durante la investigación.

## F. Gráficas

Gráfica No. 14. Curva patrón a base de glucosa para ser utilizada en el Método de ácido dinitrosalicílico



Gráfica No. 15. Curva patrón a base de glicerina USP para identificar cantidad de glicoles no consumidos



## G. Ilustraciones

Fase preliminar: Pruebas de crecimiento en glicerina proveniente de la producción de biodiesel y USP de *Yarrowia lipolytica*.

Figura No. 10: Crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.



Figura No. 11: *Yarrowia lipolytica* vista microscópica, crecimiento en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.

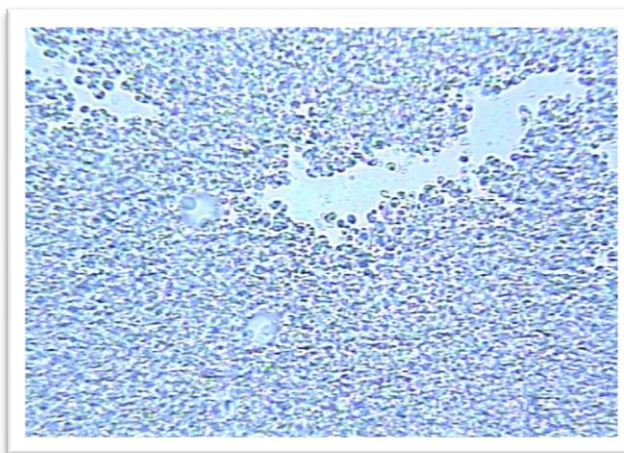


Figura No. 12: *Yarrowia lipolytica* vista microscópica

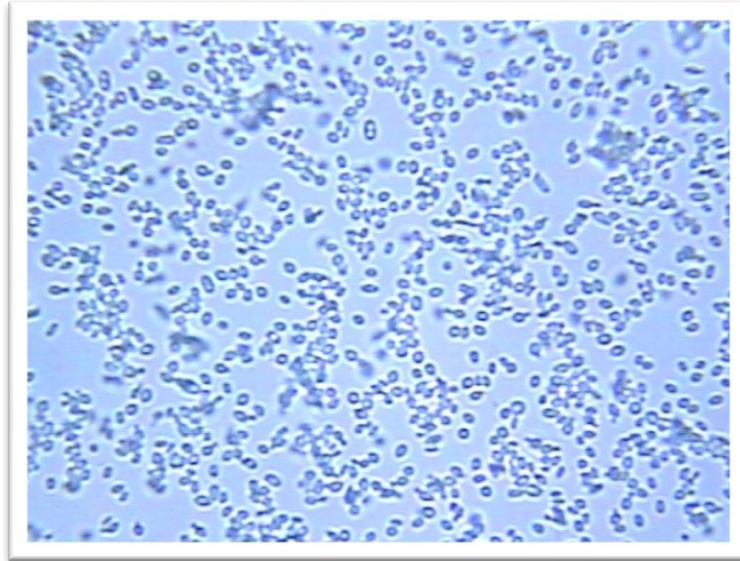


Figura No. 13: *Yarrowia lipolytica* vista microscópica, crecimiento en glicerina USP

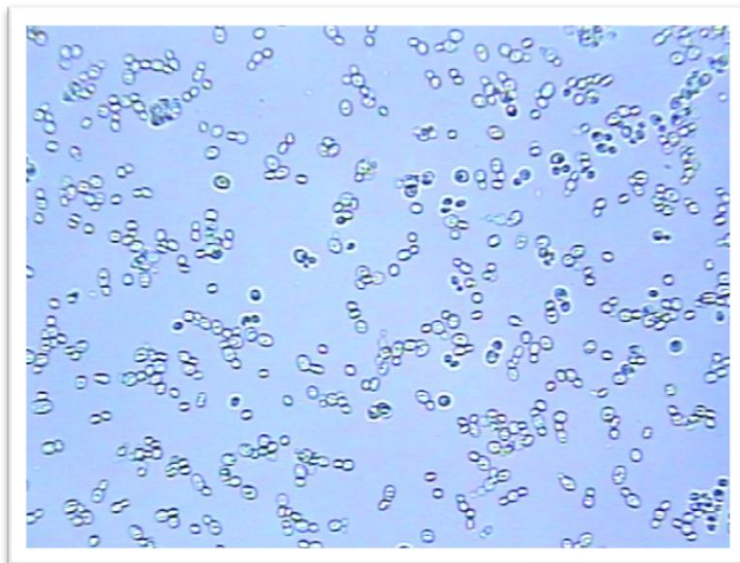
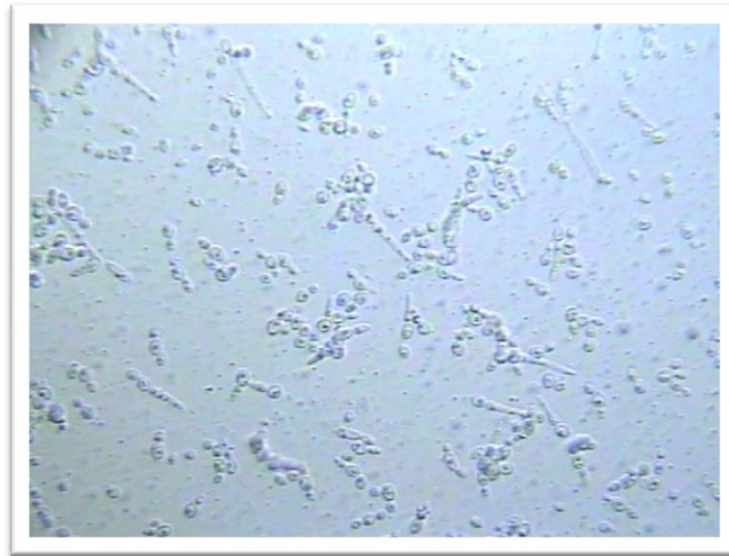


Figura No. 14: *Yarrowia lipolytica* vista microscópica, crecimiento en glicerina proveniente de la producción de biodiesel.



Fase 1. Crecimiento de 4 levaduras en Caldo Sabouraud 2% glucosa

Figura No. 15: Crecimiento de *Yarrowia Lipolytica* en Caldo Sabouraud durante 144 horas.

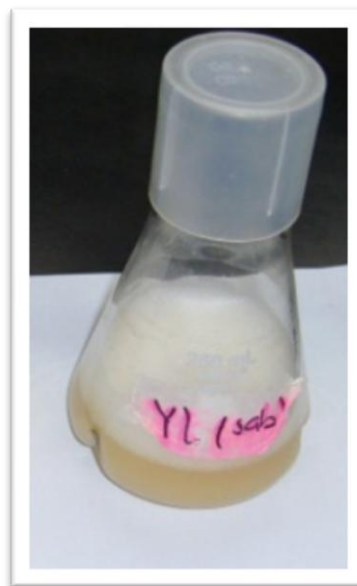


Figura No. 16: Crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* en Caldo Sabouraud durante 144 horas.

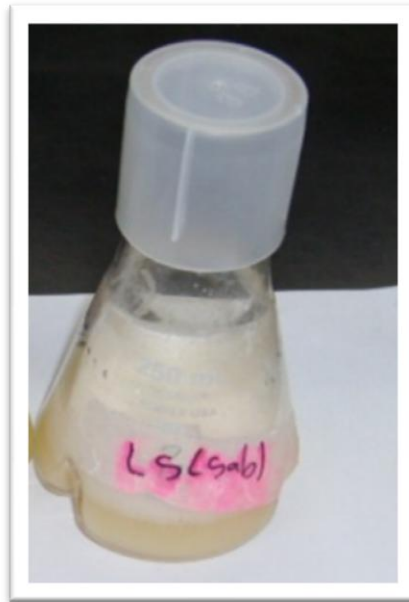


Figura No. 17: Crecimiento de *Rhodospiridium Toruloides* en Caldo Sabouraud durante 144 horas.



Figura No. 18: Crecimiento de *Rhodotorula Glutinis* en Caldo Sabouraud durante 144 horas.



Fase 2: Crecimiento de 2 levaduras en Caldo Sabouraud 2% glucosa y glicerina USP

Figura No. 19: Crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* en Caldo Sabouraud 2% glucosa



Figura No. 20: Crecimiento de *Rhodosporidium toruloides* en Caldo Sabouraud 2% glucosa



Figura No. 21: Crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* y *Rhodospiridium Toruloides* en medio que contenía glicerina USP.



Fase 3: Crecimiento en un fermentador de 5L

Figura No. 22: Esterilización del fermentador de 5 L



Figura No. 23: Crecimiento de *Lipomyces Starkeyi* en un fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa.

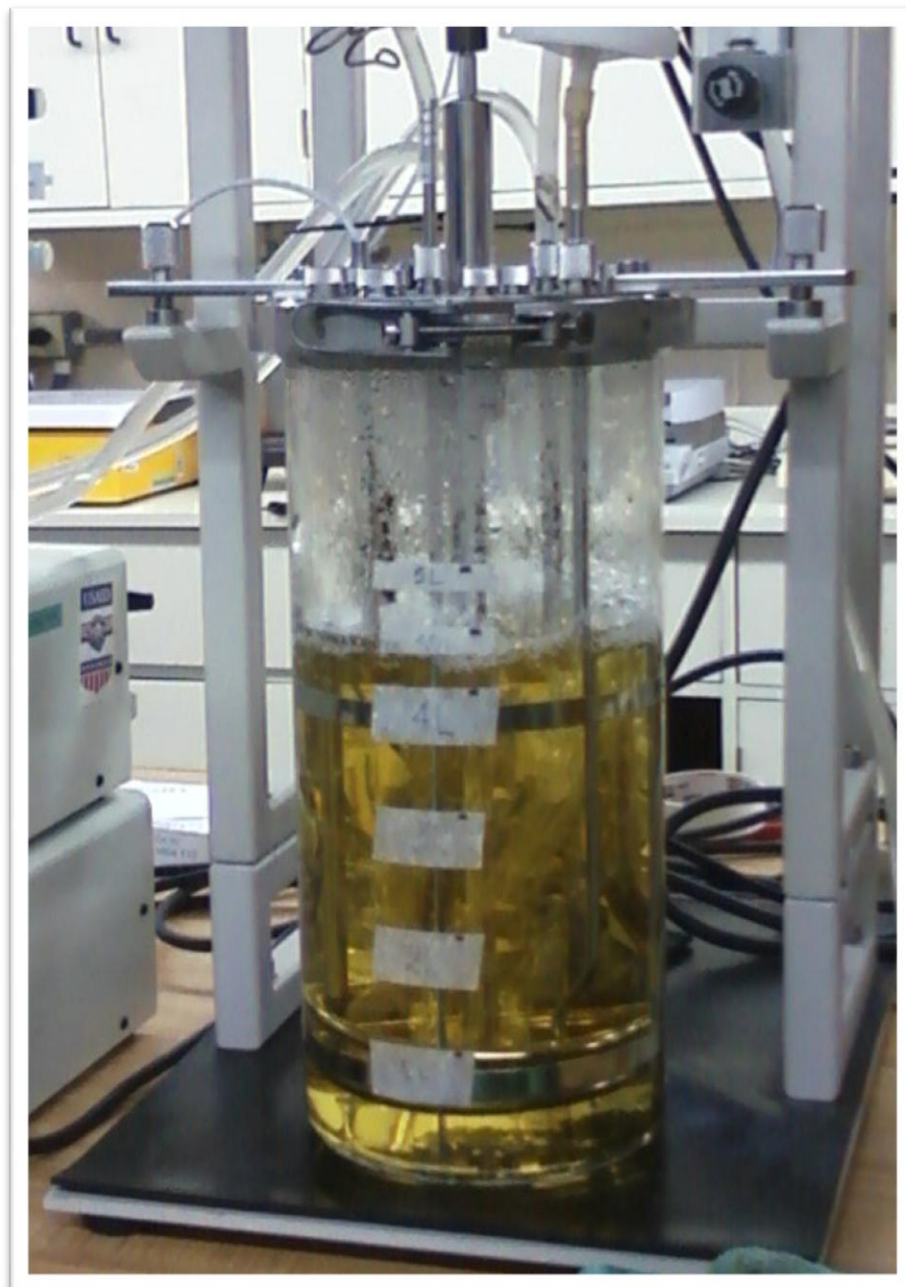


Figura No. 24: Biomasa seca de *Lipomyces Starkeyi* obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa.



Figura No. 25: Trituración manual de la biomasa de *Lipomyces Starkeyi* obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa.



Figura No. 26: Extracción de aceite de la levadura *Lipomyces Starkeyi* obtenida del crecimiento en el fermentador de 5L con Caldo Sabouraud al 2% glucosa., utilizando el sistema Soxhlet



Fase 4: Crecimiento en glicerina USP y glicerina proveniente de la producción de biodiesel

Figura No. 27: Crecimiento en frascos de *Lipomyces Starkeyi* utilizando en el medio glicerina USP



Figura No. 28: Crecimiento en frascos de *Lipomyces Starkeyi* utilizando en el medio glicerina proveniente de la producción de biodiesel

