

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la fermentación aerobia a escala laboratorio de  
glicerol crudo de la industria de biodiésel a través de  
*Lactobacillus plantarum* para la síntesis de ácido láctico

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por Christian  
René Álvarez Jiménez para optar al grado académico de Licenciado en  
Ingeniería Química

Guatemala, 24 de octubre de 2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería




Evaluación de la fermentación aerobia a escala laboratorio de  
glicerol crudo de la industria de biodiésel a través de  
*Lactobacillus plantarum* para la síntesis de ácido láctico

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por Christian  
René Álvarez Jiménez para optar al grado académico de Licenciado en  
Ingeniería Química


Guatemala, 24 de octubre de 2023




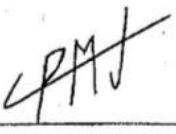
Vo. Bo.

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Roberto Martínez

Terna examinadora

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ing. Carmen Ortiz, M.A.

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Roberto Martínez

Fecha de aprobación: Guatemala, 24 de octubre de 2023

## Prefacio

Quiero agradecer principalmente a mis padres, Carlos y Claudia que fueron la pieza fundamental para lo que soy. Me criaron, me dieron la educación necesaria y sé que siempre cuento con su apoyo y amor. Este trabajo y todo lo que soy es más suyo que mío. Los amo.

Le agradezco a Dios por darme todas las oportunidades y herramientas para desarrollarme como profesional y especialmente como ser humano. Le agradezco a mi abuelita Josefina por todo su amor y apoyo incondicional. A mis dos abuelos Carlos debido a que ellos sembraron las bases en mi infancia y adolescencia y a mi abuela Amelie por siempre ser la unión de la familia. Gracias a mis hermanas, Christa y Clara por ser mis primeras amigas y darme el lugar para crecer, jugar y mejorar.

Quiero agradecerle a la universidad por acogerme y darme lugar para educarme. Le agradezco al Ing. Zambrano, a Melisa, Vero, el Ing. Núñez y la Lic. Ana Luisa por su aporte y ayuda constante. Un especial agradecimiento a mi asesor y amigo, Carlo Martínez, por darme una amistad y un tutelaje muy importante tanto en la vida como en este proyecto.

Gracias al laboratorio Global Quality por el apoyo en el análisis del glicerol crudo. Muchas gracias a Cristina por su apoyo profesional y constante apoyo e interés en la finalización de este trabajo. Me ayudaste mucho a ordenar mis pensamientos y, por ende, este trabajo. Gracias a la Lic. Natali Gramajo debido a su ayuda en la corrección de formato y forma.

Gracias principalmente a todas las amistades que hice en esta casa de estudios: Mish, Julis, Neto, Ayci, Esteban, Gale, David, Rodrigo, Oscar, Xime, entre muchos otros. Ustedes hicieron de este viaje profesional y académico uno más ameno. También a mis amistades ajenas a la universidad que me dieron el apoyo de siempre.

Y te agradezco, Brenda, por ser parte fundamental durante estos últimos años y en mis sueños, tanto profesionales como personales. Aunque dudo que alguna vez leas esto, aquí queda enmarcado todo el cariño y apoyo que me diste. Espero que sigas logrando tus sueños. Gracias.

Por último, me agradezco mucho a mí. Solo vos sabés lo mucho que pusiste en esto y en todo lo que has hecho. Lo lograste y vas a lograr muchas cosas. Lo mirabas difícil, pero lo lograste. Seguí soñando. Seguí esperando. Y lo más importante, seguí trabajando porque sos capaz de todo lo que querés en esta vida. Mucho amor y respeto hacia vos, Christian.

## Tabla de contenidos

Prefacio .....	i
Lista de tablas .....	iii
Lista de figuras.....	vi
Resumen .....	ix
Abstract.....	x
I. Introducción .....	1
II. Justificación .....	2
III. Objetivos.....	3
IV. Marco teórico .....	4
V. Antecedentes .....	32
VI. Metodología .....	39
VII. Resultados.....	58
VIII. Análisis de resultados.....	69
IX. Conclusiones .....	76
X. Recomendaciones.....	77
XI. Referencias.....	78
XII. Anexo A. Balances de masa y energía del proceso.....	85
XIII. Anexo B. Datos originales .....	89
XIV. Anexo C. Datos calculados .....	103
XV. Anexo D. Cálculo de muestra.....	117
XVI. Anexo E. Análisis de error .....	119
XVII. Anexo F. Ilustraciones .....	123

## Lista de tablas

Tabla 1 Producción mundial en millones de toneladas de biodiésel por país. ....	4
Tabla 2 Especificaciones para los distintos grados de glicerina .....	7
Tabla 3 Aplicaciones típicas de la cromatografía de partición de alta resolución.....	27
Tabla 4 Ventajas y desventajas de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).....	29
Tabla 5 Resumen de las técnicas actuales para la utilización de glicerol crudo .....	32
Tabla 6 Proporciones de preparación para la tolerancia de <i>Lactobacillus plantarum</i> a diferentes concentraciones de glicerina.....	45
Tabla 7 Receta de caldo MRS .....	46
Tabla 8 Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo .....	58
Tabla 9 Compuestos identificados presentes en el glicerol crudo .....	59
Tabla 10 Resultados de la prueba ANOVA en las diferentes variables evaluadas durante la fermentación de glicerol crudo por medio de una cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico .....	61
Tabla 11 Resultados de la prueba t en las muestras de diferentes concentraciones de glicerina evaluadas durante la fermentación de glicerol crudo por medio de una cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico .....	62
Tabla 12 Ecuaciones de los modelos cinéticos realizados en el software Berkeley-Madonna para el análisis de la fermentación láctico por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo .....	62
Tabla 13 Parámetros cinéticos del modelo establecido para el uso de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico ajustados a los datos experimentales obtenidos a una fermentación a una temperatura de 37 °C y una concentración inicial del 2. ....	66
Tabla 14 Balance de masa de un sistema de fermentación láctica de <i>L. plantarum</i> usando glicerina como sustrato a una concentración de 2.0 % (v/v).....	85
Tabla 15 Medición de la densidad del glicerol crudo a 24 °C .....	89
Tabla 16 Medición del pH de una solución del glicerol crudo .....	89
Tabla 17 Medición del porcentaje de agua en el glicerol crudo.....	89
Tabla 18 Medición de los compuestos presentes en el glicerol crudo por medio de HPLC.....	90
Tabla 19 Medición de la viscosidad del glicerol crudo .....	90
Tabla 20 Datos de la primera corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	93
Tabla 21 Datos de la primera corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	93
Tabla 22 Datos de la segunda corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	93
Tabla 23 Datos de la segunda corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	94
Tabla 24 Datos de la tercer corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	94

Tabla 25 Datos de la tercer corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo .....	95
Tabla 26 Datos de la primer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	97
Tabla 27 Datos de la segunda concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	98
Tabla 28 Datos de la tercer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	99
Tabla 29 Datos de la primera corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	99
Tabla 30 Datos de la primera corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	100
Tabla 31 Datos de la segunda corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	100
Tabla 32 Datos de la segunda corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	101
Tabla 33 Datos de la tercer corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	101
Tabla 34 Datos de la tercer corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	102
Tabla 35 Estadística descriptiva de los parámetros fisicoquímicos medidos para la caracterización del glicerol crudo.....	103
Tabla 36 Datos calculados de la primera corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	103
Tabla 37 Datos calculados de la segunda corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	104
Tabla 38 Datos calculados de la tercer corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	104
Tabla 39 Promedio de los datos calculados para determinar la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo.....	104
Tabla 40 Datos calculados de la primer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	105
Tabla 41 Datos calculados de la segunda concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	105
Tabla 42 Datos calculados de la tercer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	106

Tabla 43 Análisis ANOVA de un factor para la variable de la concentración de glicerina en la fermentación de glicerol crudo por medio de <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico.....	107
Tabla 44 Análisis ANOVA de un factor para la variable de la temperatura en la fermentación de glicerol crudo por medio de <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico ....	107
Tabla 45 Análisis ANOVA de un factor para la variable del tiempo en la fermentación de glicerol crudo por medio de <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico .....	107
Tabla 46 Prueba F para varianza de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico.....	108
Tabla 47 Prueba t suponiendo varianzas iguales de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico .....	108
Tabla 48 Prueba t suponiendo varianzas desiguales de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando <i>Lactobacillus plantarum</i> para la síntesis de ácido láctico .....	109
Tabla 49 Datos calculados para la primera corrida de la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	109
Tabla 50 Datos calculados para la segunda corrida de la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	110
Tabla 51 Datos calculados para la tercer corrida de la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	110
Tabla 52 Promedio de datos de la curva de crecimiento de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	110
Tabla 53 Datos pronosticados obtenidos por medio del modelo cinético de la fermentación por medio de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para la síntesis de ácido láctico .....	116
Tabla 54 Suma de errores al cuadrado para cada modelo generado para las especies presentes en la fermentación láctica de glicerol crudo usando la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	116
Tabla 55 ANOVA de un factor para el efecto de la concentración de glicerol crudo por medio de la conversión de glicerol crudo a ácido láctico .....	120
Tabla 56 Prueba t con una significancia del 0.05 para determinar la muestra de la concentración de glicerol crudo que tiene una diferencia significativa en su conversión a ácido láctico.....	121

## Lista de figuras

Figura 1 Esquema general de la producción de biodiésel .....	6
Figura 2 Estructura química del glicerol .....	6
Figura 3 Estequiometría de la reacción de transesterificación .....	9
Figura 4 Proceso de purificación de glicerina cruda.....	10
Figura 5 Curva de crecimiento microbiano .....	11
Figura 6 Crecimiento celular .....	12
Figura 7 Crecimiento celular con una velocidad específica de crecimiento constante .....	12
Figura 8 Velocidad específica de crecimiento (Modelo de Monod) .....	12
Figura 9 Tiempo de duplicación.....	13
Figura 10 Velocidad específica de crecimiento (Modelo de Contois y Fujimori) .....	13
Figura 11 Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial .....	14
Figura 12 Efecto de la temperatura en la velocidad de una fermentación alcohólica .....	15
Figura 13 Efecto de la concentración inicial de sustrato en la producción de bioetanol en una fermentación alcohólica .....	16
Figura 14 Efecto del tiempo en la concentración de levadura de una fermentación alcohólica .....	16
Figura 15 Microfotografías de <i>Bifidobacterium</i> (izquierda) y <i>Lactobacillus</i> (derecha).....	17
Figura 16 Diagrama de una fermentación homoláctica .....	19
Figura 17 Diagrama de una fermentación heteroláctica .....	20
Figura 18 Micrografía electrónica de barrido (SEM) de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	21
Figura 19 Ruta metabólica usando glicerol por medio de bacterias ácido-lácticas .....	23
Figura 20 Balance de masa teórico de un sistema de fermentación láctica de <i>L. plantarum</i> usando glicerina como sustrato .....	24
Figura 21 Balance de energía teórico de un sistema de fermentación láctica de <i>L. plantarum</i> usando glicerina como sustrato .....	24
Figura 22 Velocidades de producción de producto (P) y biomasa (x) y velocidad de consumo de sustrato (S) .....	25
Figura 23 Diagrama que ejemplifica los componentes de un equipo de HPLC .....	26
Figura 24 Diagrama que ejemplifica los componentes de un equipo de un cromatógrafo de gases.....	28
Figura 25 Diagrama de flujo de la metodología .....	56
Figura 26 Porcentaje de conversión de glicerol.....	57
Figura 27 Porcentaje de rendimiento.....	57
Figura 28 Productividad volumétrica .....	57
Figura 29 Curva de crecimiento de la fermentación láctica a una temperatura de 37 °C de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo .....	59
Figura 30 Variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo contra el tiempo para el análisis de las fases de la curva de crecimiento para la curva de crecimiento promedio de la fermentación a 37 °C con la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada.....	60

Figura 31 Curva de crecimiento del modelo cinético de la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico .....	67
Figura 32 Variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo contra el tiempo para el análisis de las fases de la curva de crecimiento para la curva de crecimiento promedio de la fermentación a 37 °C con la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada.....	68
Figura 33 Balance de masa de un sistema de fermentación láctica de <i>L. plantarum</i> usando glicerina como sustrato a una concentración de 2.0 % (v/v).....	86
Figura 34 Balance de energía de un sistema de fermentación láctica de <i>L. plantarum</i> usando glicerina como sustrato a una concentración de 2.0 % (v/v).....	87
Figura 35 Identificación de componentes del glicerol crudo por medio de cromatografía de gases.....	91
Figura 36 Cromatograma de masas del glicerol crudo .....	92
Figura 37 Curva de crecimiento de la primera corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo .....	95
Figura 38 Curva de crecimiento de la segunda corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo .....	96
Figura 39 Curva de crecimiento de la tercer corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo .....	97
Figura 40 Curva de crecimiento para la primera corrida de la fermentación por medio de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	111
Figura 41 Curva de crecimiento para la segunda corrida de la fermentación por medio de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción .....	112
Figura 42 Curva de crecimiento para la tercer corrida de la fermentación por medio de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	112
Figura 43 Curva de crecimiento para el promedio de los datos de la fermentación por medio de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción.....	113
Figura 44 Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del sustrato (glicerina) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico.....	113
Figura 45 Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del microorganismo (biomasa) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico.....	114
Figura 46 Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del producto (ácido láctico) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico.....	114

Figura 47 Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del subproducto (ácido acético) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico.....	115
Figura 48 Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del subproducto (etanol) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada para la síntesis de ácido láctico.....	115
Figura 49 Determinación de la densidad de una medición del volumen de glicerol crudo a una temperatura de 24 °C.....	117
Figura 50 Concentración de glicerina presente en la muestra de glicerol crudo analizada ....	117
Figura 51 Determinación la concentración de glicerol en % (m/v) partiendo de su porcentaje % (v/v).....	117
Figura 52 Porcentaje de conversión de glicerol crudo durante la fermentación usando la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	118
Figura 53 Rendimiento de glicerol crudo durante la fermentación usando la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	118
Figura 54 Variación del logaritmo natural de la concentración de microorganismos presentes en el medio de fermentación respecto al tiempo .....	118
Figura 55 Promedio de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado	119
Figura 56 Varianza de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado.	119
Figura 57 Desviación estándar de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado .....	120
Figura 58 Incertidumbre de la concentración de glicerina en el glicerol crudo utilizado.....	122
Figura 59 Muestra de glicerol crudo utilizado para las fermentaciones.....	123
Figura 60 Cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> utilizada para la adaptación y fermentación .....	124
Figura 61 Evaluación de la tolerancia de la cepa utilizada contra la presencia de glicerol crudo en un medio de agar MRS.....	125
Figura 62 Adaptación de la cepa utilizada a diferentes concentraciones de glucosa y de glicerol crudo en caldo MRS.....	126
Figura 63 Preparación de las muestras tomadas para ser enviadas a HPLC y la evaluación del crecimiento microbiano por medio del peso seco.....	127
Figura 64 Crecimiento en caja Petri de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada a glicerol crudo .....	128
Figura 65 Preparación del caldo a ser utilizada para la fermentación láctico de glicerol crudo medidas a diferentes variables de concentración de sustrato, tiempo de fermentación y temperatura de fermentación utilizando la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada.....	129
Figura 66 Fermentación final a 37 °C a una concentración de 2 % v/v de glicerol crudo utilizando <i>Lactobacillus plantarum</i> adaptada.....	130

## Resumen

El objetivo del trabajo era la evaluación de la fermentación aerobia de glicerol crudo para la síntesis de ácido láctico con la cepa *Lactobacillus plantarum*. Primero, se caracterizó el glicerol crudo a utilizar y se determinó la concentración de glicerina en 55.775 % (v/v), metanol en 5.4 % (v/v) y agua en 1.117 % (v/v). Se identificó la presencia de compuestos en la mezcla: heptano, ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos. Posteriormente, se adaptó la cepa *L. plantarum* al glicerol. Se realizó una prueba de tolerancia donde se observó un mejor crecimiento a concentraciones bajas, por lo que se realizó una adaptación con repiques continuos en medio MRS modificado con una concentración de 1.0 % (v/v). La cepa adaptada fue evaluada en un experimento controlado donde variaron tres parámetros: temperatura de la fermentación, concentración del glicerol crudo en el medio y tiempo de fermentación. Se encontró la variable que causaba una diferencia significativa en la conversión de glicerol crudo a ácido láctico era la concentración de glicerol crudo, específicamente una diferencia entre las concentraciones 0.5 % (v/v) y 2.0 % (v/v). Se escogieron los parámetros de una concentración de 2.0 % (v/v) de glicerol para la fermentación final a una temperatura de 37 °C y un tiempo de fermentación de 48 horas. El modelo cinético generado logra realizar un pronóstico válido del comportamiento de la reacción, pues los valores de la suma de errores cuadrados presentan un valor bajo y un valor por debajo de la magnitud obtenida de los datos de la curva de crecimiento. Se recomienda cuantificar el consumo de peptonas durante la fermentación para poder establecer un mejor comportamiento en el crecimiento de la cepa durante el proceso.

*Palabras clave: ácido láctico, Lactobacillus plantarum, glicerol crudo, biodiésel, fermentación*

## Abstract

The goal of the project was to evaluate the aerobic fermentation of crude glycerol for the synthesis of lactic acid using the *Lactobacillus plantarum* strain. First, the crude glycerol to be used was characterized, and the concentration of glycerin was determined to be 55.775% (v/v), methanol 5.4% (v/v), and water 1.117% (v/v). Compounds in the mixture were identified: heptane, fatty acids, and methyl esters of fatty acids. Subsequently, the *L. plantarum* strain was adapted to glycerol. A tolerance test was performed, where better growth was observed at low concentrations, leading to an adaptation with continuous subcultures in modified MRS medium with a concentration of 1.0% (v/v). The adapted strain was evaluated in a controlled experiment where three parameters were varied: fermentation temperature, crude glycerol concentration in the medium, and fermentation time. It was found that the variable causing a significant difference in the conversion of crude glycerol to lactic acid was the concentration of crude glycerol, specifically the difference between concentrations of 0.5% (v/v) and 2.0% (v/v). The parameters were selected with a glycerol concentration of 2.0% (v/v) for the final fermentation at a temperature of 37 °C and a fermentation time of 48 hours. The kinetic model generated successfully provides a valid prediction of the reaction behavior, as the values of the sum of squared errors are low and below the magnitude obtained from the growth curve data. It is recommended to quantify the consumption of peptones during fermentation to better understand the growth behavior of the strain during the process.

*Keywords: lactic acid, Lactobacillus plantarum, crude glycerol, biodiesel, fermentation*



## I. Introducción

El glicerol es un subproducto de la industria del biodiésel producido por el uso de aceites vegetales y equivale a un 10% en peso del aceite en los productos finales. Su sobreproducción ha generado un aumento de la oferta, mientras la demanda se ha mantenido estable y esto ha llevado a que su precio descienda a valores tan mínimos que se considera un desecho del proceso. En consecuencia, se buscan alternativas para agregarle valor al glicerol crudo; por ejemplo, su purificación, aunque es un proceso muy caro para la mayoría de los productores pequeños y medianos de la industria (Yang et al. 2017).

También se ha buscado utilizar al glicerol crudo como materia prima para otros procesos. Uno de los procesos es la conversión a ácido láctico. La bioconversión permite transformar el glicerol crudo en ácido láctico y otros productos. El ácido láctico se considera una materia prima de alto valor debido a sus aplicaciones en la industria de plásticos. El principal sustrato utilizado para la producción de ácido láctico es la glucosa y otros azúcares. Por esto, utilizar el glicerol crudo es una aplicación atractiva para sustituir el uso de la glucosa y otros azúcares que se obtienen de productos alimenticios (Liu et al., 2018).

La cepa *Lactobacillus plantarum* es una bacteria láctica que se encuentra en una variedad de alimentos fermentados. Es una bacteria versátil que logra adaptarse a una gama amplia de condiciones de crecimiento. En el presente trabajo se busca utilizar esta cepa para ser adaptada a consumir el glicerol como sustrato (González et al., 2015). Se busca evaluar la fermentación del glicerol crudo como sustrato para la síntesis de ácido láctico a escala laboratorio. Se va a caracterizar el glicerol crudo para determinar sus principales propiedades fisicoquímicas que puedan afectar el crecimiento del microorganismo. Las condiciones de reacción se analizarán para determinar cuáles generan los mayores rendimientos de producción de ácido láctico usando glicerol crudo como sustrato. Por último, se monitorearán las concentraciones de las especies involucradas en la reacción con el tiempo para generar un modelo cinético de la fermentación de glicerol crudo para la síntesis de ácido láctico. Los metabolitos de la fermentación fueron analizados por HPLC y la curva de crecimiento del microorganismo se realizó por medio del método de peso seco.

## II. Justificación

A nivel mundial, la producción de biocombustibles (biodiésel y bioetanol) mostró un crecimiento acumulado del 26% del 2011 al 2020 (Torroba, 2021). En Guatemala, no se ha llegado a obtener una producción a nivel industrial. De acuerdo con la Asociación de Combustibles Renovables de Guatemala (s.f.), algunas plantas del país utilizan el aceite reciclado de frituras, pero a una escala piloto. Tomando en cuenta las variaciones de producción de biodiésel, se obtiene en promedio un 10% en peso de glicerina. El avance de producción ha convertido al glicerol crudo en un residuo. Esto permite que tenga un gran potencial como materia prima en procesos debido a su sobreproducción y bajo precio comercial. Asimismo, la generación de productos biotecnológicos a partir de material considerado como residuo puede representar una oportunidad de alto valor económico para el país (Posada et al. 2012).

Actualmente, el glicerol es refinado por métodos de filtración, adición de químicos y destilación fraccionada al vacío para remover sus impurezas y llevarlo a varios grados industriales. Sin embargo, todo este proceso incrementa su costo de producción. Una alternativa es transformar el glicerol crudo en productos con mayor valor industrial y con baja toxicidad ambiental (Johnson y Taconi, 2007). Algunos microorganismos pueden usar el glicerol crudo como fuente de carbono para producir ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético; alcoholes como etanol; aldehídos, hidrógenos y otros compuestos (Prada et al. 2012). Por este motivo, en este trabajo de graduación se busca evaluar la fermentación del glicerol crudo como sustrato para la síntesis de ácido láctico y determinar un modelo cinético de reacción que permite predecir los sistemas de operación de dicha reacción.

El ácido láctico es usado en varios procesos químicos, farmacéuticos, alimenticios y en la industria de plástico. El presente trabajo presentaría una alternativa para la actual producción de ácido láctico que utiliza compuestos alimenticios como la papa, yuca y cebada para obtener los sustratos. El uso de una materia considerada desecho sería atractiva económicamente para la síntesis del ácido láctico. La fermentación láctica es un proceso sostenible que no solo reduce la generación de residuos, sino que también utiliza fuentes de carbono como la glicerina y otros recursos en lugar de recursos no renovables (Prada et al. 2012).

### III. Objetivos

#### Objetivo general

Evaluar la fermentación aerobia a escala laboratorio de glicerol crudo de la industria de biodiésel a través de *Lactobacillus plantarum* para la síntesis de ácido láctico.

#### Objetivos específicos

- Caracterizar el glicerol crudo por medio de pruebas fisicoquímicas para su uso como sustrato en la síntesis de ácido láctico.
- Evaluar la adaptación del microorganismo en un medio aerobio con glicerol crudo como sustrato por medio de pruebas de viabilidad para determinar si este puede soportar sus necesidades nutricionales.
- Medir la síntesis de ácido láctico, por medio de HPLC, al variar el tiempo de fermentación, concentración de sustrato y temperatura del medio para encontrar las condiciones que favorecen su formación
- Monitorear la concentración en el tiempo de ácido láctico para generar el modelo cinético de la fermentación utilizando glicerol crudo como sustrato.

## IV. Marco teórico

### Alternativas a combustibles fósiles

Los combustibles fósiles han sido la base para el desarrollo socioeconómico desde el siglo XX. Esto se debe a que han sido una fuente de energía barata y abundante. Sin embargo, su uso tiene impactos ambientales y es un recurso no renovable. En respuesta, ha elevado ha llevado a elevar la eficiencia energética de su uso y la búsqueda de nuevas alternativas de energía renovables y menos contaminantes. Una de esas alternativas es el uso de biocombustibles (Morales, 2012).

Los biocombustibles son fuentes de energía producidos a partir de fuentes renovables como cultivos, residuos agrícolas y biomasa forestal. Ofrecen una serie de ventajas sobre los combustibles fósiles. Generalmente, tienen el potencial de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y son menos contaminantes. Se puede destacar que, debido a la naturaleza de su origen, se pueden denominar una fuente de energía renovable, lo contrario a los combustibles fósiles. Sin embargo, estos también tienen inconvenientes. La producción de los biocombustibles puede llegar a competir con la producción de alimentos en el sector agrícola y llegar a tener impactos ambientales negativos, como lo es el monocultivo y la deforestación. En los últimos años, se han realizado importantes inversiones en el desarrollo de tecnologías de producción de biocombustibles. Las tecnologías están mejorando constantemente, lo que hace que los biocombustibles sean cada vez más competitivos con los combustibles fósiles (International Energy Agency, 2022). Estos tomarán relevancia dentro de las ofertas energéticas al buscar reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y aumentar la eficiencia energética. El biodiésel forma parte de estos biocombustibles alternativos como se observa en la Tabla 1 (Morales, 2012).

**Tabla 1**

*Producción mundial en millones de toneladas de biodiésel por país.*

País	2022 (Estimado)	2021	Promedio de cinco años	Varianza interanual	Varianza vs. Promedio
Unión Europea	15.10	14.75	14.60	2.4%	3.5%
Estados Unidos	9.00	8.49	7.41	6.0%	21.5%
Indonesia	7.50	7.47	6.13	0.4%	22.4%
Brasil	5.35	5.91	5.02	-9.5%	6.5%
Singapur	1.83	1.80	1.60	1.7%	14.4%
China	1.80	1.80	1.24	0.0%	45.4%
Argentina	1.71	1.72	2.07	-0.6%	-17.2%
Tailandia	1.52	1.60	1.47	-5.0%	3.1%

<b>Resto del mundo</b>	4.13	3.96	3.90	4.3%	5.8%
<b>Total</b>	<b>47.94</b>	<b>47.5</b>	<b>43.44</b>	<b>0.9%</b>	<b>10.4%</b>

*Nota.* Adaptado del D'Angelo, Ferrari, Terré y Calzada (2022).

### ***Biodiésel***

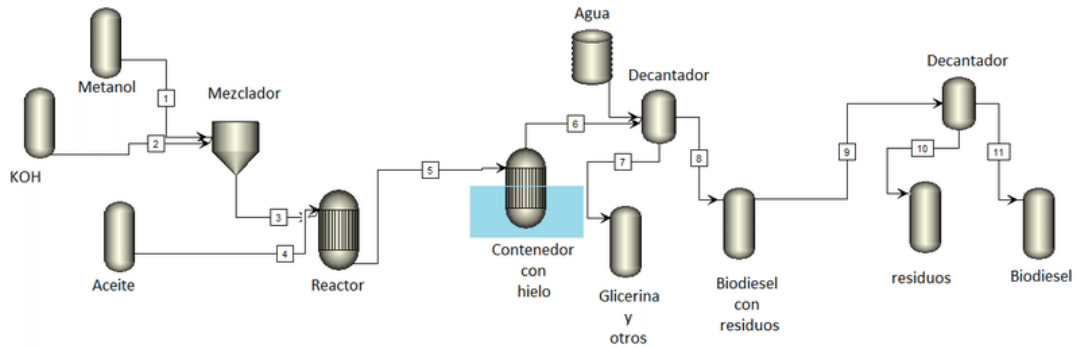
El biodiésel es un combustible para motores diésel que se obtiene principalmente por una reacción de transesterificación de un triglicérido (presentes en ácidos vegetales o grasas animales) con un alcohol. La reacción requiere de un catalizador, que puede ser ácido o básico; heterogéneo u homogéneo, obteniéndose una mezcla de ésteres (con largo variante de cadenas de carbono dependiendo el alcohol que se haya empleado) (Morales, 2012). El proceso de producción de biodiésel se puede dividir en las siguientes etapas:

- **Pretratamiento:** Se eliminan las impurezas, agua, sólidos y sales presentes en el aceite o grasa utilizada.
- **Transesterificación:** Se mezcla un alcohol (metanol o etanol) en presencia de un catalizador, como hidróxido de sodio, junto con el aceite o grasa para producir el biodiésel y la glicerina.
- **Separación:** El biodiésel y la glicerina se separan por medio de una decantación o centrifugación.
- **Purificación.** El biodiésel se puede purificar adicionalmente mediante lavados, destilación o deshidratación para eliminar cualquier impureza remanente.

Este proceso es sencillo y se puede aplicar a gran escala o a escala laboratorio. El rendimiento se ve afectado generalmente por la calidad del aceite utilizado, el tipo de alcohol y el catalizador usado como se observa en la Figura 1 (International Energy Agency, 2022).

**Figura 1**

*Esquema general de la producción de biodiésel*



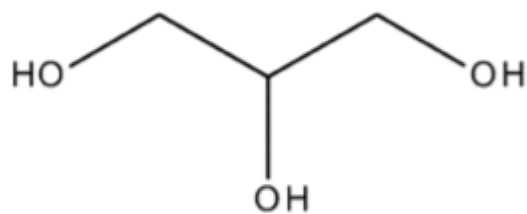
*Nota.* Adaptado de Reina, Jiménez y Pedraza (2014). El producto secundario obtenido de la transesterificación es el glicerol que aproximadamente es un 10% en peso del aceite utilizado para la reacción (Morales, 2012).

### ***Glicerol***

El glicerol es un compuesto obtenido principalmente como subproducto en la industria oleoquímica, mientras que la glicerina es el nombre comercial dado a las mezclas con alto contenido de glicerol. El glicerol es un trialcohol muy versátil ya que posee dos grupos hidroxilos primarios y uno secundario, los cuales permiten que tenga varias posibilidades para realizar reacciones químicas como se observa en la Figura 2 (Posada y Cardona, 2010).

**Figura 2**

*Estructura química del glicerol*



*Nota.* Adaptado de Pérez y Redondo (2014).

El glicerol es un componente estable a las condiciones estándar de almacenamiento, no es irritante a la piel, tiene bajo grado de toxicidad sobre el medio ambiente y, además, es compatible con otros productos químicos, lo cual le da una buena versatilidad para utilizarlo

como materia prima (Pérez y Redondo, 2014). A continuación, se describirán los tipos de glicerol obtenidos por diferentes procesos.

Por un lado, el glicerol obtenido en las reacciones de transesterificación tiene bastantes impurezas por lo que se le llega a denominar “glicerol crudo” o “glicerina cruda”, conteniendo alrededor de entre 50% y 60% de glicerol puro. El resto del porcentaje se divide entre agua, el alcohol utilizado para la reacción, restos del catalizador utilizado, sales inorgánicas, materiales orgánico no glicerol (MONG), jabones, ácido grasos libres, residuos de materias primas y ésteres (Machado, 2010).

Por otra parte, la glicerina de grado técnico es un producto de alta pureza con la mayoría de sus contaminantes completamente removidos. La glicerina grado técnico está libre de metanol, jabones, sales y otros componentes contaminantes. La concentración de glicerol presente en este grado varía, pero se puede establecer en un rango del 85% al 98% como mínimo (Posada y Cardona, 2010).

Por último, la glicerina refinada o glicerina USP es un producto de calidad farmacéutica adecuado para ser usado en procesos alimenticios, de cuidado personal, cosméticos, productos farmacéuticos y otras aplicaciones. Debe contener una concentración del 99% que es la que cumple las especificaciones de la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) y del “Código de sustancias químicas para alimentos” (FCC) (Posada y Cardona, 2010). A continuación, se presenta la Tabla 2 para poder clasificar a la glicerina acorde a sus propiedades.

**Tabla 2**

*Especificaciones para los distintos grados de glicerina*

<b>Propiedades</b>	<b>Glicerina cruda</b>	<b>Glicerina grado técnico</b>	<b>Glicerina refinada grado USP</b>
<b>Contenido de glicerol</b>	40% - 80%	85% - 98%	>99%
<b>Ceniza</b>	2% máx.	N/A	N/A
<b>Contenido de humedad</b>	N/A	2% máx.	0.3% máx.
<b>Cloruros</b>	N/A	10 ppm máx.	10 ppm máx.
<b>Color</b>	N/A	40 máx. (Pt-Co)	10 máx. (APHA)
<b>Gravedad específica</b>	N/A	1.262 (a 25 °C)	1.262 mín.
<b>Sulfato</b>	N/A	N/A	20 ppm máx.
<b>Análisis</b>	N/A	N/A	99% - 101% (base seca)
<b>Metales pesados</b>	N/A	5 ppm máx.	5 ppm máx.
<b>Componentes clorados</b>	N/A	30 ppm máx.	30 ppm máx.
<b>Residuos de ignición</b>	N/A	N/A	100 ppm máx.
<b>Ácidos grasos y ésteres</b>	N/A	1 máx.	1.000 máx.

<b>Agua</b>	12 % máx.	5 % máx.	0.5 % máx.
<b>pH (solución 10%)</b>	4 – 9.0	4 – 9.1	N/A
<b>Residuos orgánicos</b>	2 % máx.	2 % máx.	N/A

*Nota.* Adaptado de SRS Engineering Corporation (2008).

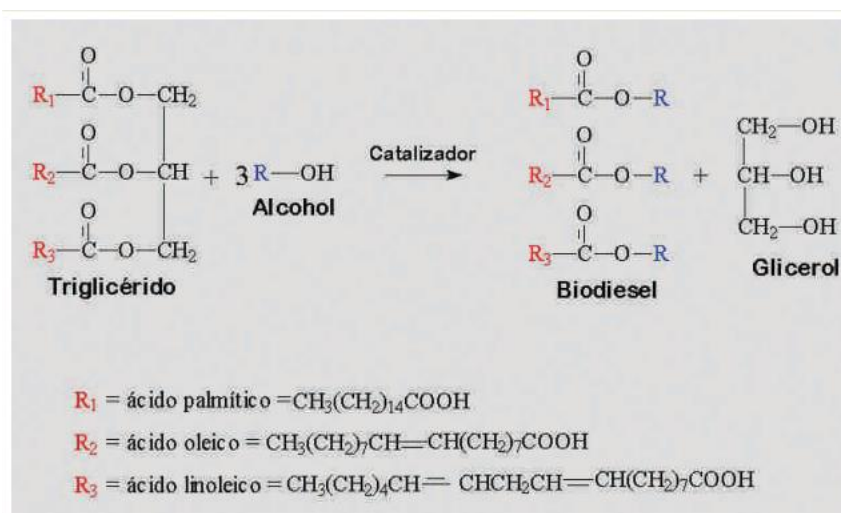
### **Usos de la glicerina.**

La glicerina USP se utiliza en muchos productos, debido a su baja toxicidad y a las propiedades que puede aportar al producto final como la estabilidad y compatibilidad con otros compuestos químicos. Se uso principalmente como ingrediente en cosméticos, artículos de tocador o de cuidado personal, farmacéuticos y en productos alimenticios. Otros usos son como humectante, plastificante, emoliente, espesante, disolvente, medio de dispersión, lubricante, edulcorante y anticongelante. Para todas estas aplicaciones, la calidad y la pureza de la glicerina es de gran importancia (Posada y Cardona, 2010).

En la Figura 3, la reacción de transesterificación genera glicerina como subproducto. La pureza de la glicerina obtenida por este método depende del proceso, la naturaleza de la materia prima, el tipo de catalizador, el exceso de alcohol y la conversión de reacción (Machado, 2010). El aumento en la producción de biodiésel ha llegado a aumentar la disponibilidad de glicerina cruda en el mercado hasta el punto de duplicar la oferta de este producto, mientras que la demanda se ha mantenido estable. El exceso de oferta y la ausencia de un aumento de demanda ha hecho que el precio de la glicerina cruda se mantenga bajo. La producción y los precios han llegado al punto que se llega a considerar un desecho (Posada, Rincón y Cardona, 2012). La mayor parte de la glicerina comercializada en la actualidad es la glicerina refinada para satisfacer los estrictos requisitos de la USP y el FCC. En el mercado también se llega a disponer de glicerina de grado técnico por sus muchas aplicaciones industriales (Posada y Cardona, 2010).

**Figura 3**

*Estequiometría de la reacción de transesterificación*

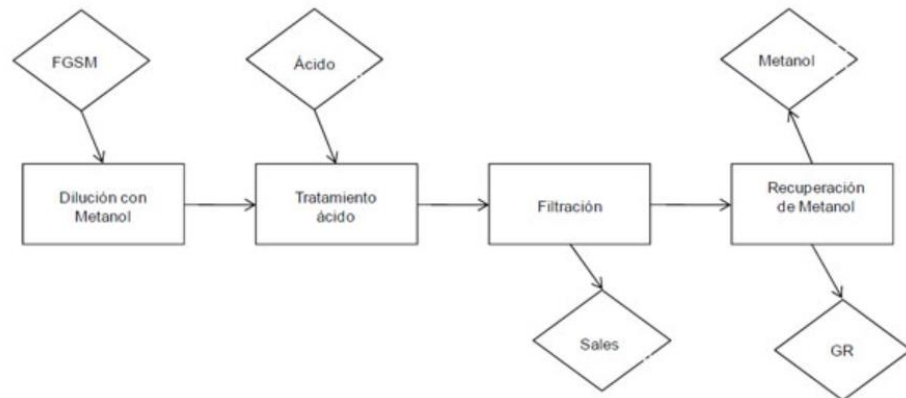


*Nota.* Adaptado de Maldonado, Rolz y Zambrano (2010).

Como se observa en la Figura 3, para poder utilizar la glicerina cruda obtenida como subproducto de la producción de biodiésel, es necesario someterla a procesos de purificación para obtener una glicerina de grado técnico como mínimo. Algunos de estos procesos pueden incluir tratamientos químicos, cristalización, filtración convencional, microfiltración, ultrafiltración con membranas poliméricas, tratamiento con resinas de intercambio iónico, electrodiálisis y destilación a vacío. La combinación de dos o más de las técnicas mencionadas anteriormente permiten obtener una glicerina de elevada pureza (Buenemann, et al., 1991; Veiga, 2014). Esta es una buena solución para transformar un producto con bajo valor económico en un producto con alto valor económico. Sin embargo, estos procesos de purificación son muy costosos para los productores pequeños y medianos de biodiésel.

**Figura 4**

*Proceso de purificación de glicerina cruda*



*Nota.* Adaptado de Cardeño, Gallego y Ríos (2011).

Actualmente, al ser considerado un desecho, el glicerol crudo puede ser usado como materia prima en otros procesos. Sin contar los procesos de purificación descritos anteriormente, el glicerol crudo puede ser utilizado para su combustión, producción de biogás a partir de digestión anaerobia y en procesos biotecnológicos en los cuales se da la bioconversión del glicerol crudo, con la obtención de metabolitos como el 1,3-pronanodiol, ácido cítrico, etanol, butanol, ácido acético, ácido láctico, entre otros (Prada et al. 2012).

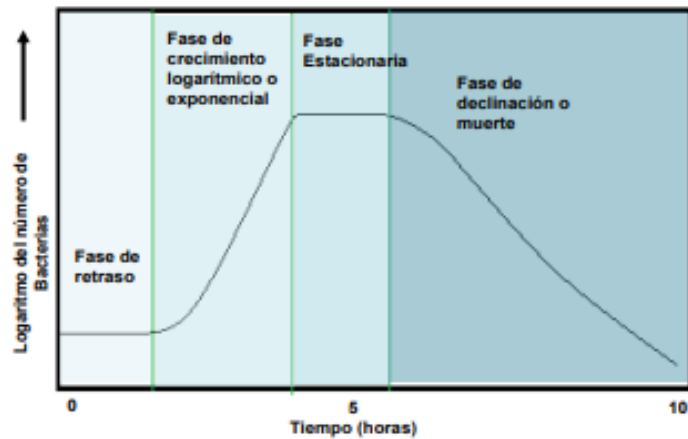
### **Fermentación como bioconversión**

Los procesos microbiológicos se basan en el uso de microorganismos cultivados generalmente a gran escala, para obtener productos industriales de gran valor agregado a partir de procesos fermentativos. La fermentación se entiende como la transformación de compuestos orgánicos por medio de microorganismos apoyados por enzimas. Esta se lleva a cabo en un biorreactor, donde los sustratos se transforman en biomasa y metabolitos por medio del cuidado de las condiciones de operación (Ertola et al. 2007).

Los microorganismos empleados en los procesos de fermentación deben ser no patógenos, que tengan una fermentación rápida, consuman completamente los sustratos y sinteticen el producto deseado en un tiempo corto (Serna, 2005). Como se observa en la Figura 5, la curva de crecimiento presenta cuatro etapas claras: fase de retraso o adaptación, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular (Tortora, 2007).

**Figura 5**

*Curva de crecimiento microbiano*



*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

Según Totorra (2007) y como se puede observar en la Figura 5, la curva de crecimiento microbiano incorpora cuatro fases en el ciclo de vida de estos organismos.

- Fase lag o de retraso: Esta fase evidencia un retraso en el crecimiento celular. Durante esta fase, los microorganismos se están adaptando a las nuevas condiciones presentes en el medio de cultivo.
- Fase exponencial: Esta fase representa un crecimiento exponencial de las células bacterianas. Durante esta fase, los microorganismos crecen rápidamente y el número de células se duplica cada cierto tiempo.
- Fase estacionaria: Esta fase se caracteriza por una estabilización en el número de microorganismos. Durante esta fase, el crecimiento de los microorganismos se mantiene constante debido a las limitaciones del medio de cultivo que los nutrientes son limitados y a la acumulación de productos de desecho que se generan.
- Fase de muerte: Esta fase representa una disminución del número de microorganismos. Los microorganismos empiezan a morir por la falta de nutrientes, la acumulación de productos de desecho e incluso puede ocurrir un ataque de otros microorganismos debido al cambio de condiciones del medio de cultivo.

La curva de crecimiento bacteriano es una herramienta que permite el estudio de microorganismos. Esta se puede utilizar para determinar el tiempo de crecimiento de las células bacterianas, su tasa de crecimiento y la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo. Los microorganismos se pueden representar por las Figuras 6, 7.

## Figura 6

### *Crecimiento celular*

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde:  
x = concentración celular  
 $\mu$  = velocidad específica de crecimiento  
t = tiempo de crecimiento

*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

El crecimiento se considera como una reacción autocatalítica de primer orden. Al analizar un sistema cerrado, se puede considerar que el único proceso que afecta el crecimiento de microorganismos. Si se considera que la velocidad específica de crecimiento es constante, la ecuación se puede representar en la Figura 7:

## Figura 7

### *Crecimiento celular con una velocidad específica de crecimiento constante*

$$x = x_0 e^{\mu t}$$
$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Donde:  
x = concentración celular  
 $x_0$  = concentración celular inicial  
 $\mu$  = velocidad específica de crecimiento  
t = tiempo de crecimiento  
e = constante de Euler

*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento se relaciona con los nutrientes que hay en el medio por medio de la ecuación en la Figura 8:

## Figura 8

### *Velocidad específica de crecimiento (Modelo de Monod)*

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S}$$

Donde:

$\mu$ = velocidad específica de crecimiento

$\mu_{max}$  = velocidad máxima

S= cantidad de sustrato

$k_s$  = constante de afinidad del sustrato

*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

Se puede determinar el tiempo que tarda el microorganismo en duplicarse. Este se le denomina el tiempo de generación, el cual es el tiempo que le toma a una célula para que se población se llegue a duplicar. Este se calcula con la ecuación en la Figura 9:

### Figura 9

*Tiempo de duplicación*

$$t = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

$\mu$ = velocidad específica de crecimiento

*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

Para obtener los datos para realizar la curva de crecimiento de un microorganismo se pueden utilizar varios métodos. Los métodos directos que existen son los gravimétricos, espectrofotométricos, microscópicos de conteo celular en cámaras y de siembra y por peso seco (Tortora, 2007).

### Figura 10

*Velocidad específica de crecimiento (Modelo de Contois y Fujimori)*

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{k_s * X + S}$$

Donde:

$\mu$ = velocidad específica de crecimiento

$\mu_{max}$  = velocidad máxima

S= cantidad de sustrato

$k_s$  = constante de afinidad del sustrato

X = cantidad de biomasa

*Nota.* Adaptado de Tortora (2007).

La Figura 10 es un modelo cinético de crecimiento microbiano que se basa en la idea de que el crecimiento de las células es limitado por la disponibilidad de sustrato.

### Peso seco

El *L. plantarum* debe de crecer en un ambiente donde las condiciones sean adecuadas para su crecimiento. Los medios comunes para esta cepa generalmente incluyen leche, suero, caldo de lactosa y caldo de peptona. También se puede utilizar caldo MRS que tiene los componentes necesarios para su crecimiento tales como carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales (Alves et al. 2018).

El crecimiento de la cepa se puede observar por el término de peso seco. El peso seco es una técnica común para determinar el crecimiento de las bacterias. En esta metodología, se seca una muestra de cultivo y se pesa para determinar el contenido de materia seca. El aumento de la masa seca se puede correlacionar con el aumento de la cantidad de microorganismos en el medio. Las muestras del cultivo se deben tomar en intervalos regulares para evaluar el crecimiento. Las muestras se deben de tomar del centro del medio, ya que esta es la zona con mayor densidad de microorganismos. Asimismo, esto se debe de hacer en un ambiente estéril con instrumentos estériles para evitar la contaminación del medio fermentativo. Las muestras después se centrifugan para separar las células (sólidos) del medio líquido. Generalmente, la centrifugación debe realizarse a una velocidad de 5,000 a 10,000 rpm durante 10 a 15 minutos. El contenido de sólidos secos se puede determinar pesando todos los sólidos secos. Por medio de una diferencia, se puede determinar la cantidad de microorganismos presentes en una cantidad del volumen de muestra tomado y extrapolar al medio de cultivo completo (Alves et al. 2018). Es posible observar esto en la Figura 11.

**Figura 11**

*Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial*



*Nota.* Adaptado de Seguí (s.f.).

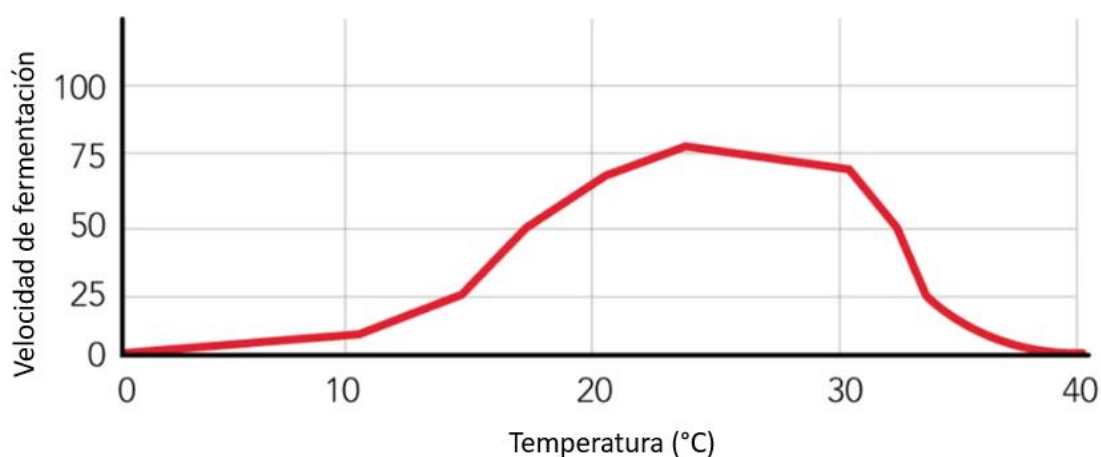
Las principales variables en un proceso fermentativo son la temperatura, el pH, la concentración de especies y el tiempo de fermentación los cuales se explican a continuación.

### ***Efecto de la temperatura***

Como se observa en la Figura 12, la temperatura es una variable que no afecta solamente el crecimiento del microorganismo utilizado, también tiene un efecto en la producción de metabolitos. La mayoría de los microorganismos industriales tienen su temperatura óptima de crecimiento y producción entre los 20 °C y 40 °C (Greasham, 1993).

**Figura 12**

*Efecto de la temperatura en la velocidad de una fermentación alcohólica*



*Nota.* Adaptado de Torija et al. (2003).

### ***Efecto del pH***

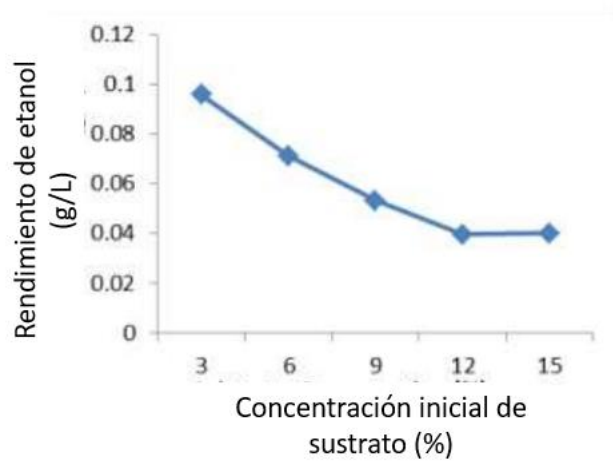
Esta variable también afecta el crecimiento y la producción de metabolitos. Esto influye en la toma de nutrientes y otras actividades fisiológicas. Dependiendo del tipo de fermentación pueden variar los rangos de operación: las enzimas trabajan en un rango de 4 a 9; el crecimiento bacteriano óptimo se da entre 6.5 y 7.5, los hongos y levaduras en pHs de 4.5 a 5.5. Asimismo, cabe recalcar que el pH de crecimiento óptimo puede ser diferente al pH de formación óptima de metabolitos (Greasham, 1993).

### ***Efecto del sustrato***

Un microorganismo requiere de ciertos nutrientes elementales y específicos como lo son una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y oxígeno. Como fuente de carbono se utilizan compuestos de carbono reducidos para construir masa celular, formar producto y actuar como una fuente de energía para el microorganismo. Sin embargo, a ciertas concentraciones elevadas, la fuente de carbono puede actuar como inhibidor; es decir frenar el crecimiento (Greasham, 1993). Esto se observa en la Figura 13.

**Figura 13**

*Efecto de la concentración inicial de sustrato en la producción de bioetanol en una fermentación alcohólica*



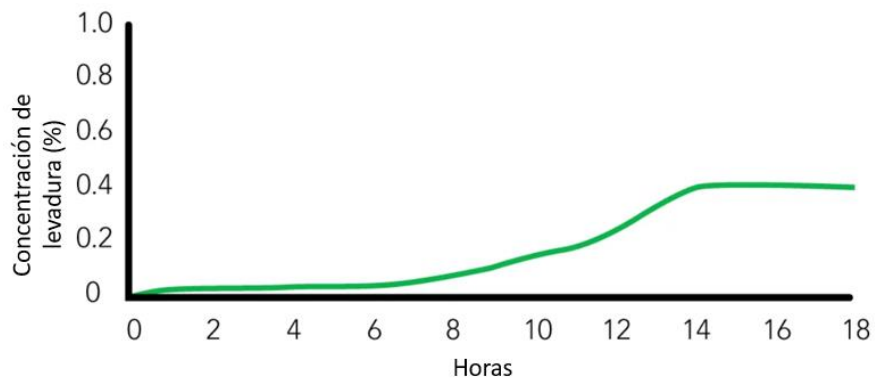
*Nota.* Adaptado de Torija et al. (2003).

### ***Efecto del tiempo***

Es una variable que afecta directamente el crecimiento de un microorganismo debido a que este requiere de un tiempo específico para llevar a cabo su actividad. Generalmente, una fermentación más larga permite una mayor descomposición de los sustratos, lo que puede resultar en una mayor cantidad de productos, productos más desarrollados o incluso productos secundarios. Asimismo, el tiempo también es un factor importante en el desarrollo de microorganismos no deseados o de estos subproductos. El tiempo permite realizar pruebas regulares para evaluar el progreso de la fermentación y establecer parámetros de operación como se observa en la Figura 14 (Greasham, 1993).

**Figura 14**

*Efecto del tiempo en la concentración de levadura de una fermentación alcohólica*



*Nota.* Adaptado de Torija et al. (2003).

Los requerimientos minerales de los microorganismos son logrados por medio de la adición al medio sales de fosfato, sulfato, magnesio, hierro, potasio y cloro. Y los elementos traza requeridos (cobre, zinc, cobalto, molibdeno y calcio) usualmente se satisfacen por los contaminantes presentes en el agua y otras especies presentes en el medio. La transferencia de oxígeno se logra por medio de la agitación del fermentador. Los procesos fermentativos hacen uso de dos medios, uno para el desarrollo del inóculo y otro para la producción de metabolitos. El primer medio permite al microorganismo crecer con la menor formación de producto posible y el segundo medio fomenta la producción de metabolitos (Greasham, 1993).

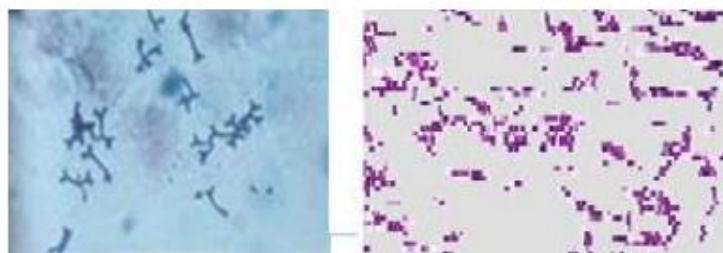
### **Producción de ácido láctico**

Dentro de estos procesos, la producción de ácido láctico se presenta como una opción innovadora y competitiva, debido a la vastedad de aplicaciones que presenta el ácido orgánico dentro de la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y química. Además, el bajo precio del glicerol crudo comparado con la glucosa pura (el sustrato más común utilizado para la mayoría de los procesos fermentativos para producir ácido láctico) hacen de gran interés los procesos biotecnológicos que involucren este tipo de sustratos a nivel económico (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

Los microorganismos productores de ácido láctico son las bacterias ácido lácticas (BAL), que se caracterizan por no formar esporas, ser bacterias gram-positivas, en ausencia de porfirinas, son catalasa negativa, son tolerantes al oxígeno y a los ácidos, son organotróficas y principalmente con morfología cilíndrica o con forma de coco (Madigan et al. 2004). En general, las células son inmóviles y necesitan compuestos complejos para el crecimiento tales como vitaminas y aminoácidos. Su producto principal es el ácido láctico el cual pueden volver a asimilar (König y Fröhlich, 2009). Las microfotografías de ambos organismos se observan en la Figura 15 a continuación.

### **Figura 15**

*Microfotografías de Bifidobacterium (izquierda) y Lactobacillus (derecha)*

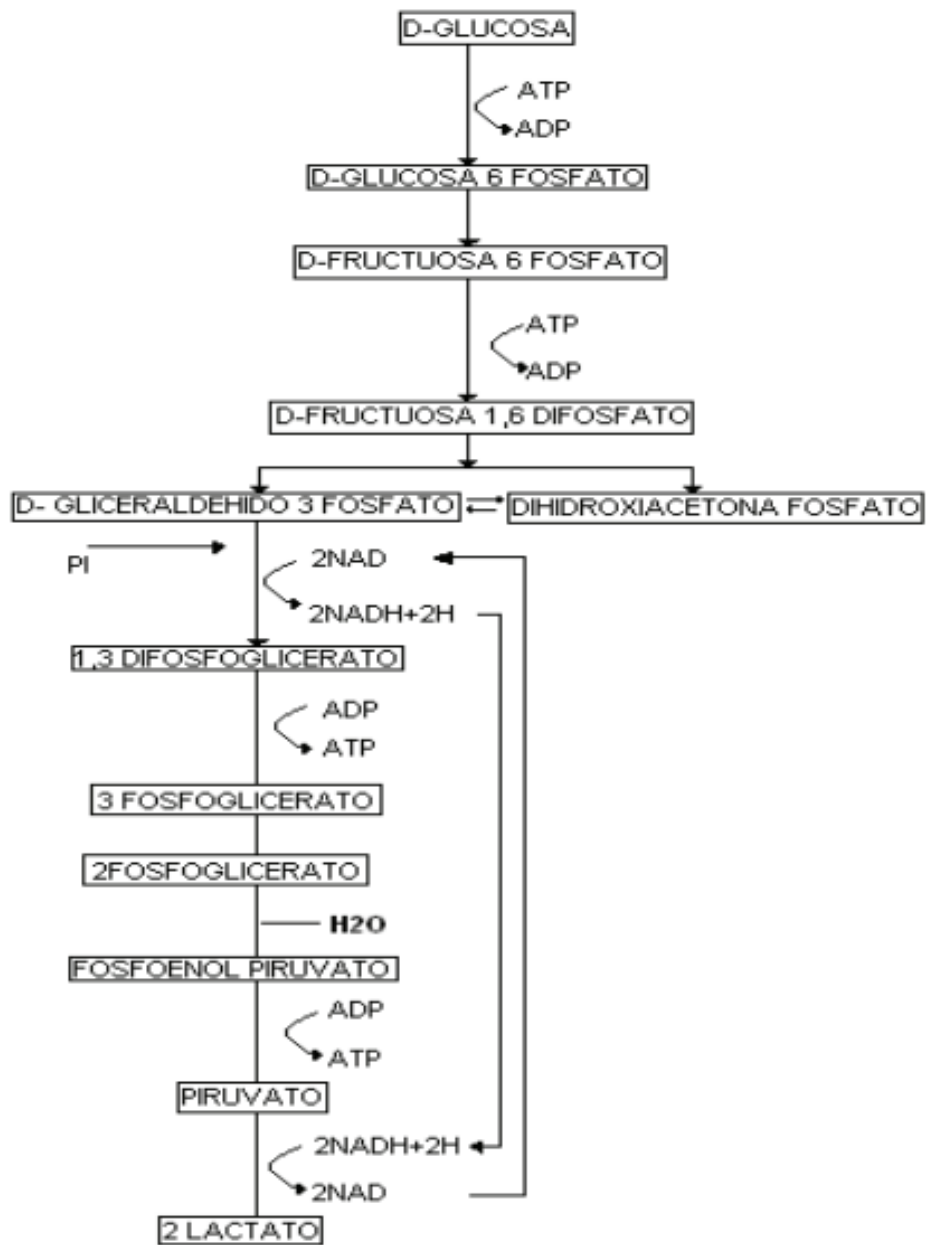


*Nota.* Adaptado de Prescott et al. (2000).

Las BAL pueden ser homofermentativas y heterofermentativas. El ácido láctico se llega a producir al ser heterofermentativas, junto con la producción de dióxido de carbono y etanol o acetato (König y Fröhlich, 2009). Actualmente, se conocen distintos géneros que pertenecen al grupo de las BAL, entre ellos están: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Madigan et al. 2004). A continuación, se presenta la fermentación homoláctica y la fermentación heteroláctica en las Figura 16 y Figura 17, respectivamente.

Figura 16

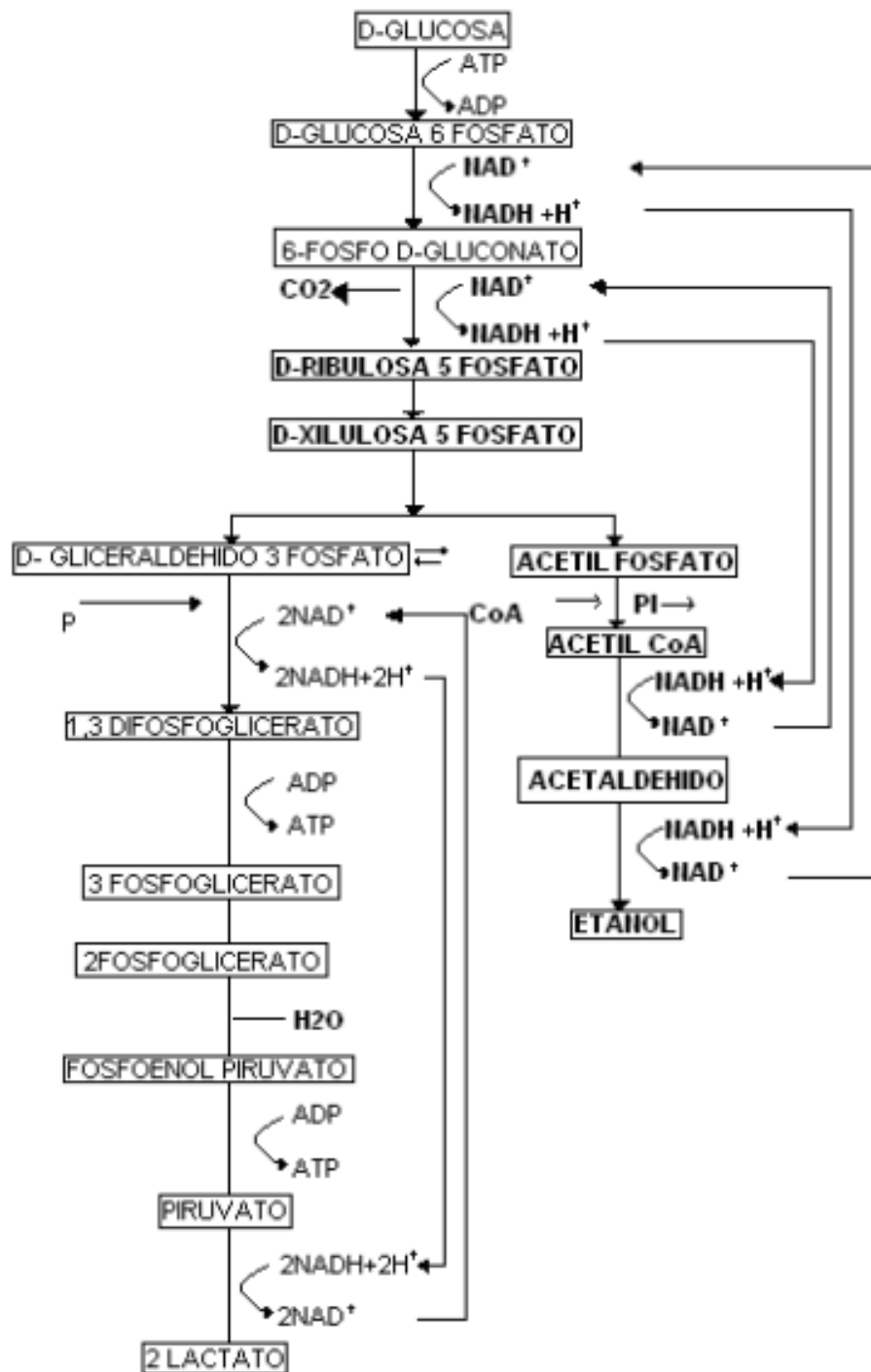
Diagrama de una fermentación homoláctica



Nota. Adaptado de Parra (2010).

Figura 17

Diagrama de una fermentación heteroláctica



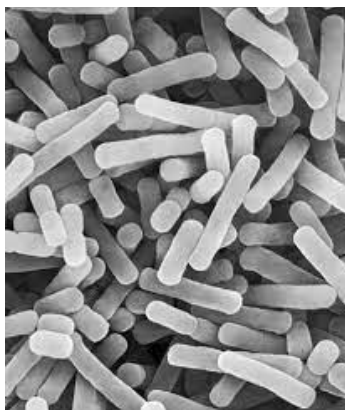
Nota. Adaptado de Parra (2010).

Las bacterias del género *Lactobacillus* pueden presentar una forma cilíndrica y permanecer tanto en solitario o llegar a formar cadenas cuando se cultivan en glucosa. Al ser utilizadas en fermentaciones anaerobias, pueden ser homofermentativas o heterofermentativas.

Sin embargo, las fermentaciones aerobias, son únicamente heterofermentativas. En ambas fermentaciones se puede sintetizar el isómero D-, L- o la mezcla racémica DL del ácido láctico (König y Fröhlich, 2009; Madigan et al. 2004). En la Figura 18 a continuación, se muestra una micrografía electrónica de barrido de *Lactobacillus delbrueckii*.

### Figura 18

Micrografía electrónica de barrido (SEM) de *Lactobacillus delbrueckii*



Nota. Adaptado de König y Fröhlich (2009).

Una ventaja de utilizar bacterias *Lactobacillus* es que son estrictamente fermentativas, lo cual significa que su crecimiento se relaciona directamente a la producción de metabolitos (Hoang, s.f.). Debido a esto, la fermentación del glicerol usando *Lactobacillus* puede seguir tres vías metabólicas diferentes:

1. Vía de la glicerol quinasa
2. Vía de la glicerol deshidrogenasa
3. Vía de la glicerol deshidratasa

Las dos primeras rutas convergen en el gliceraldehído-3-fosfato, una sustancia intermedia de la glucólisis. La tercera vía tiene como producto final el 1,3-propanodiol, el ácido-3-hidroxi-propanoico y/o la acroleína. Las tres vías pueden darse al mismo tiempo durante una fermentación, pero existen diferentes condiciones que pueden inhibir la presencia de alguna de las rutas. La primera ruta necesita de un aceptor externo de electrones. Este usualmente es el oxígeno, por lo que en condiciones anaeróbicas se inhibe esta vía, mientras la segunda predomina. La tercera vía se favorece en detrimento de las otras dos cuando en el medio de fermentación hay una mezcla de glucosa y glicerol como fuentes de carbono y se favorece en condiciones aerobias (Garai-Ibabe, 2010; Sauvageot et al. 2000).

**Cepa *Lactobacillus plantarum***

La bacteria *Lactobacillus plantarum* pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, que son capaces de realizar una fermentación láctica. Es comúnmente encontrado en varios productos fermentados al igual que está presente en la saliva. Su genoma es uno de los más conocido dentro de las bacterias ácido-lácticas. Son bacterias Grampositivas, anaerobia facultativa y no esporulada (Zheng et al. 2020). La producción de ácido láctico por parte de *L. plantarum* es un proceso importante, especialmente en la salud del intestino. Este permite tener un pH saludable en el cuerpo, lo que inhibe el crecimiento de patógenos y mantiene una función intestinal estable. La inhibición ocurre debido a la producción del ácido láctico que genera un ambiente hostil a los patógenos. Otras formas de inhibición son por medio de la secreción de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas y péptidos antimicrobianos (Liu, Xu y Zhang, 2021).

La síntesis de ácido láctico por *L. plantarum* se puede optimizar mediante el control de la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y nutrientes y la concentración de oxígeno presente. La temperatura óptima de fermentación es de 37 °C, pero puede crecer en un rango de temperaturas de 20 °C y 45 °C. Su pH óptimo suele estar entre 5.5 y 6.5. Cabe destacar que puede utilizar una amplia gama de fuentes de carbono para la síntesis de ácido láctico. Las principales fuentes de carbono usadas por *L. plantarum* son glucosa, sacarosa, lactosa y almidón. Sin embargo, la cepa se puede adaptar a fuentes de carbono más complejas como lo es la glicerina. La glicerina es un sustrato prometedor para la producción de ácido láctico debido a su abundancia y que también cuenta como un recurso renovable (Alves et al. 2018).

El rendimiento de la fermentación láctica usando glicerina como sustrato por *L. plantarum* depende de la cepa de la bacteria, la concentración de glicerina presente, la temperatura y el pH. La cepa influye debido a que hay algunas cepas de *L. plantarum* que son más eficientes usando la glicerina como sustrato que otras. La concentración de glicerina es un factor que tomar en cuenta. A concentraciones bajas de glicerina, la síntesis de ácido láctica es lenta. A concentraciones altas de glicerina en el medio, la síntesis de ácido láctico puede disminuir debido a la presión osmótica que se genera en el medio fermentativo. La temperatura óptima para la síntesis de ácido láctico es de 37 °C, sin embargo, también se puede generar ácido láctico a temperaturas más bajas. Asimismo, la síntesis de ácido láctico disminuye a pH bajos. El pH óptimo para una fermentación láctica usando glicerina como sustrato se encuentra entre 6.0 y 6.5 (Gao et al. 2019).

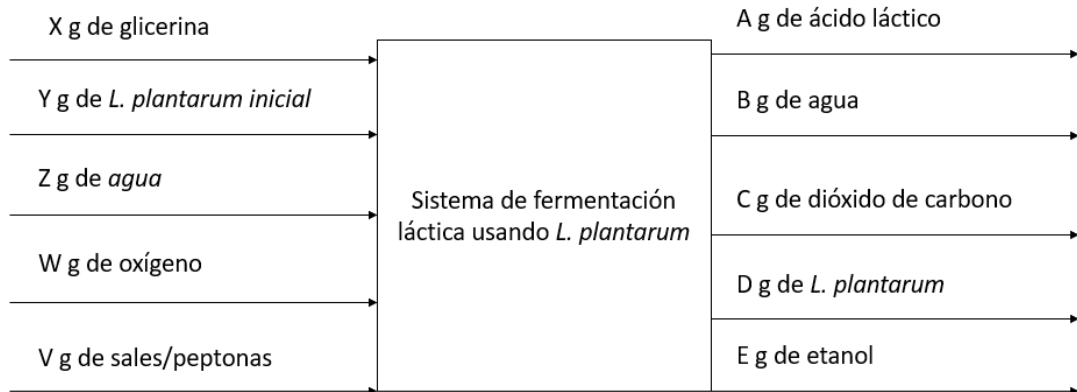
### **Fermentación heterogénea**

El proceso heterofermentativo de *L. plantarum* ocurre cuando se produce en condiciones de bajo oxígeno. Esto hace que la bacteria utilice la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para descomponer la glicerina. En esta vía, la glicerina se convierte en glucosa-6-fosfato, que luego se convierte en fructosa-6-fosfato. La fructosa-6-fosfato se convierte en



### Figura 20

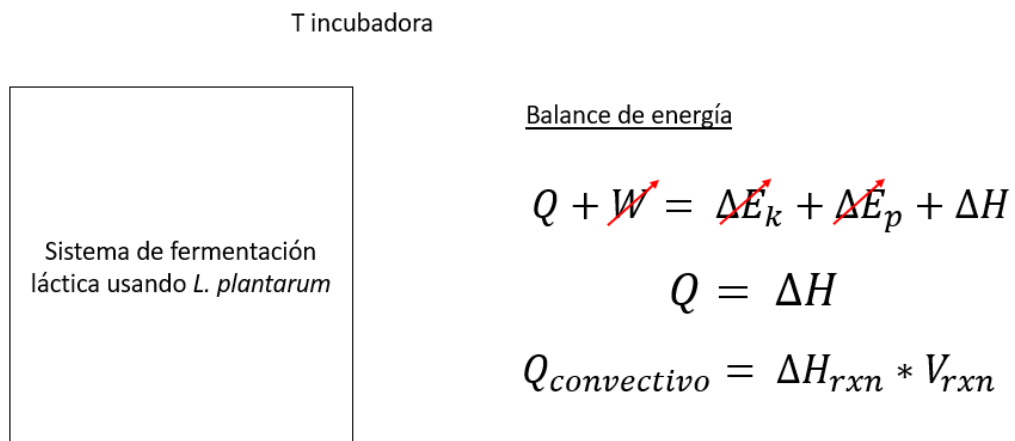
Balance de masa teórico de un sistema de fermentación láctica de *L. plantarum* usando glicerina como sustrato



Nota. Elaboración propia.

### Figura 21

Balance de energía teórico de un sistema de fermentación láctica de *L. plantarum* usando glicerina como sustrato



Nota. Elaboración propia.

### Modelos cinéticos

Para comprender un sistema fermentativo como un bioproceso, se requiere del planteamiento de modelos cinéticos microbianos para describir y predecir las concentraciones de sustratos, biomasa y productos durante la reacción (Gamboa y Lizcano, 2013). Estos modelos se pueden clasificar en diferentes categorías, dependiendo si se considera el segregamiento de las células y su funcionamiento estructural. El segregamiento de las células se refiere a un

comportamiento individual y diferenciado. El funcionamiento estructural contempla en el modelo los mecanismos metabólicos, enzimáticos y genómicos de la célula. Entonces, se pueden determinar tres tipos de modelos (Sunhoon et al. 2000):

1. Modelos segregados y estructurados
2. Modelos no segregados y estructurados
3. Modelos no segregados y no estructurados

Los modelos segregados y estructurados pueden generar un buen ajuste. Sin embargo, tienen un costo computacional y experimental relativamente alto. Los modelos no segregados y no estructurados son una opción con uso más amplio para describir diferentes tipos de sistemas fermentativos con un alto grado de ajuste a partir de poca información (Gamboa y Lizcano, 2013). Pero, la aplicación de un modelo no segregado y no estructurado puede darse solamente si se da un crecimiento balanceado dentro de la célula. Esto significa que todos los componentes internos como las proteínas, ADN, lípidos, etc, crecen a una velocidad constante. Esta fase se conoce como la de crecimiento exponencial (Gamboa y Lizcano, 2013).

En un cultivo discontinuo, las velocidades de producción de los metabolitos y la biomasa, así como el consumo del sustrato para un modelo no segregado y no estructurado, se pueden representar mediante la ecuación expuesta en Figura 22:

**Figura 22**

*Velocidades de producción de producto (P) y biomasa (x) y velocidad de consumo de sustrato (S)*

$(1) \frac{dx}{dt} = \mu * x$	$(2) \frac{dS}{dt} = -q_s * x$	$(3) \frac{dP}{dt} = q_p * x$
$q_s = \left( \frac{\mu}{y_{x/S}} + \frac{q_p}{y_{P/x}} + m_s \right) \quad q_p = \mu * y_{P/x} + m_p$		
<p>(1) Velocidad de producción de biomasa</p> <p>(2) Velocidad de consumo de sustrato</p> <p>(3) Velocidad de producción de producto</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>Y_{P/x}</math> es el rendimiento teórico producto-biomasa (masa/masa)</li> <li>• <math>Y_{x/S}</math> es el rendimiento teórico biomasa-sustrato (masa/masa)</li> <li>• <math>m_P</math> es la constante de mantenimiento celular</li> <li>• <math>m_S</math> es la constante específica de formación de producto debido a la actividad celular</li> <li>• <math>\mu</math> es la velocidad específica de crecimiento (<math>\text{tiempo}^{-1}</math>), que puede ajustarse a diferentes funciones, dependiendo del comportamiento del microorganismo</li> </ul>		

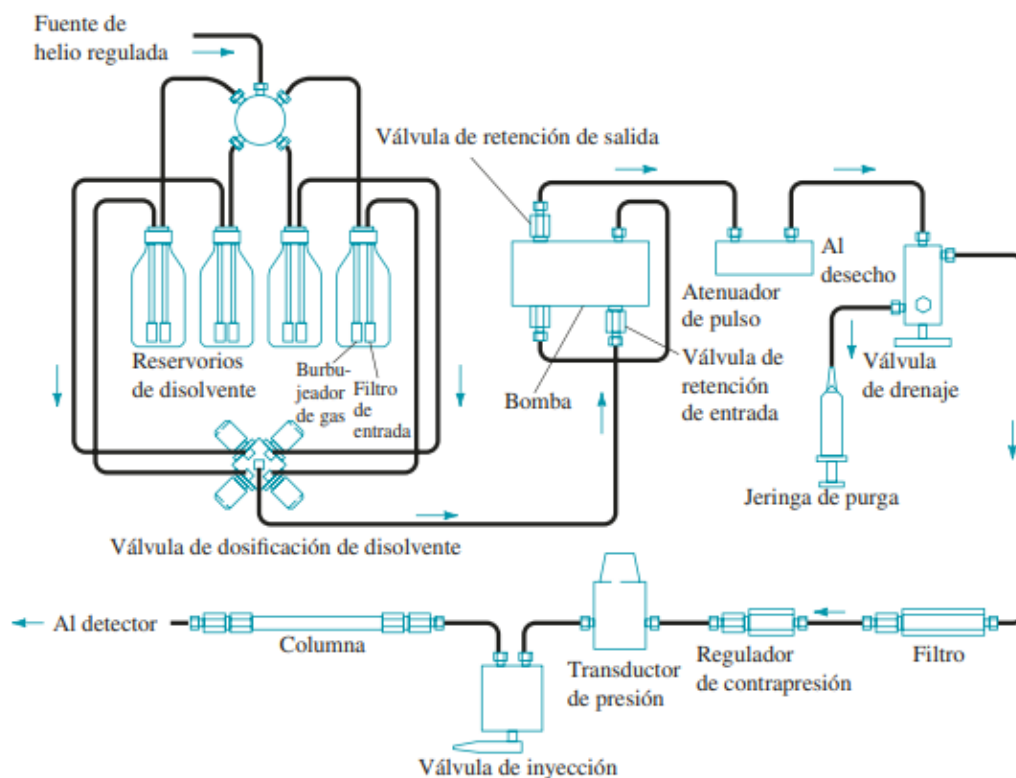
Nota. Adaptado de Gamboa y Lizcano (2013).

### Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Chromatography*) se basa en la separación de los componentes de una mezcla según su afinidad entre una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria es un material sólido o líquido que está colocado en una columna cromatográfica. La fase móvil es un fluido que se mueve a través de la columna. La separación de los componentes de una mezcla en HPLC se produce por la interacción entre los compuestos de las dos fases y la muestra. Los compuestos que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven más lento a través de la columna, mientras que los compuestos que tienen menor afinidad por la fase estacionaria se mueven más rápido (Skoog et al. 2015). Esto se ve ejemplificado en el diagrama en la Figura 23.

Figura 23

Diagrama que ejemplifica los componentes de un equipo de HPLC



Nota. Adaptado de Skoog et al. (2015).

Hay dos tipos de cromatografía HPLC según Skoog et al. (2015):

- **Cromatografía de fase normal:** En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es un material polar, como la sílice o la alúmina, y la fase móvil es un líquido no polar, como el hexano o el éter de petróleo.
- **Cromatografía de fase inversa:** En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un material no polar, como la sílice modificada con grupos hidrofílicos, y la fase móvil es un líquido polar, como el agua o el metanol.

Hay tres modos principales de separación en HPLC según Skoog et al. (2015):

- **Cromatografía de adsorción:** En la cromatografía de adsorción, los compuestos de la muestra se adhieren a la fase estacionaria por fuerzas intermoleculares, como la atracción electrostática o las fuerzas de Van de Waals.
- **Cromatografía de reparto:** En este tipo de cromatografía, los compuestos de la muestra se distribuyen en la fase estacionaria y en la fase móvil. Los compuestos que tienen una mayor solubilidad en la fase estacionaria se mueven más lento a través de la columna, mientras que los compuestos que tienen una mayor solubilidad en la fase móvil se moverán más rápidamente en ella.
- **Cromatografía de intercambio iónico:** En este tipo de cromatografía, los compuestos de la muestra se intercambian con los iones de la fase estacionaria. Los compuestos con mayor afinidad por los iones de la fase estacionaria se mueven más lentamente a través de la columna, mientras que los compuestos que tienen una menor afinidad por los iones de la fase estacionaria se mueven más rápidamente.

**Tabla 3**

*Aplicaciones típicas de la cromatografía de partición de alta resolución*

<b>Campo</b>	<b>Mezclas típicas separadas</b>
Farmacéuticos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos alimenticios	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Químicos industriales	Aromáticos condensados, surfactantes, agentes propulsores, colorantes
Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, fenoles, bifenilos policlorados (BPPS)
Ciencias forenses	Fármacos, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Química clínica	Ácidos biliares, metabolitos de fármacos, extractos de orina, estrógenos

*Nota.* Adaptado de Skoog et al. (2015).

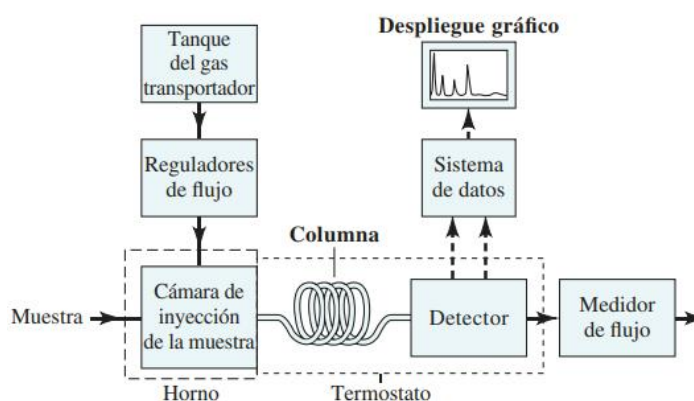
### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se fundamenta en el principio de separación de los componentes de una mezcla según su afinidad por una fase

estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria es un material sólido o líquido que está unido en la columna cromatográfica. La fase móvil es generalmente un gas inerte, como el helio o el nitrógeno. La separación de los componentes de una mezcla en este tipo de cromatografía sucede por la interacción de los compuestos con ambas fases. Los compuestos con mayor afinidad a la fase estacionaria se moverán más lentamente a través de la columna, mientras que los que tienen menor afinidad por esta fase se mueven más rápido a través de ella (Skoog et al. 2015). Esto se ve ejemplificado en la Figura 24.

**Figura 24**

*Diagrama que ejemplifica los componentes de un equipo de un cromatógrafo de gases*



*Nota.* Adaptado de Skoog et al. (2015).

El espectrómetro de masas descompone los compuestos en iones por una variedad de métodos que incluyen, según Skoog et al. (2015):

- Ionización por impacto electrónico (EI): Es el método de ionización más utilizado en GC-MS. Este produce iones de alta energía que se fragmentan al impactar en otros iones más pequeños.
- Ionización química (CI): Esta ionización produce iones con menor cantidad energética que la ionización por impacto electrónico. Este método también produce iones menos fragmentados que por impacto electrónico, lo que puede ser útil para identificar compuestos.
- Ionización por electrospray (ESI): Los iones producidos por este tipo de método son de alto peso molecular y llegan a ser estables en solución. Este método es muy útil para analizar compuestos polares o grandes.

Estos iones que se producen por el espectrómetro de masas se analizan en función de su masa y su carga. Se separan en función de su masa-carga ( $m/z$ ) en un analizador de masas. El analizador de masas más utilizado en GC-MS es el cuadrupolo (Skoog et al. 2015).

La GC-MS es una técnica que permite analizar compuestos volátiles y semivolátiles. Esta se utiliza en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo, según Skoog et al. (2015):

- Análisis de alimentos y bebidas
- Análisis farmacéutico
- Análisis ambiental
- Análisis biomédico

Este método es versátil y preciso por lo que permite identificar y cuantificar una amplia gama de compuestos. Sin embargo, este método tiene sus ventajas y desventajas que son las que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Ventajas y desventajas de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)*

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta resolución: Esta permite separar compuestos con estructuras similares con una alta resolución.</li> <li>• Alta sensibilidad: Esta permite detectar compuestos con muy bajas concentraciones.</li> <li>• Amplia gama de aplicaciones: Se puede utilizar para analizar un gran rango de compuestos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costo: Esta cromatografía es cara en términos de equipo como de los consumibles a utilizar.</li> <li>• Tiempo: Esta técnica puede llegar a ser lenta, especialmente en muestra de alta complejidad.</li> <li>• Experiencia: Se requiere de bastante experiencia para poder realizarla de forma correcta.</li> </ul>

*Nota.* Adaptado de Skoog et al. (2015).

### **Análisis de varianza (ANOVA)**

Esta es una técnica estadística cuya función es poder comparar las medias de tres o más grupos de muestreo. La ANOVA, según sus siglas en inglés que quieren decir *Analysis of Variance*, se fundamenta en la idea de que la varianza total de una variable se puede atribuir a dos principales fuentes: la varianza que existe entre grupos y la varianza que existe dentro de cada grupo. Hay varios tipos de ANOVA que se pueden utilizar que se diferencian por el tipo de diseño experimental utilizado (Gravetter y Wallnau, 2022). De acuerdo con Gavetter y Wallnau (2022), los tipos más comunes de esta técnica son:

- ANOVA de un factor: Este es el ANOVA más simple. Se utiliza cuando hay un solo factor independiente con dos o más niveles.

- ANOVA de dos factores: Este es un ANOVA más complejo. Se utiliza cuando hay dos factores independientes, cada uno con dos o más niveles.
- ANOVA de medidas repetidas: Este tipo de ANOVA se utiliza cuando los datos provienen de los mismos sujetos que fueron sometidos a diferentes condiciones.
- ANOVA de dos vías: Este es un tipo de ANOVA que se utiliza cuando hay dos factores independientes, cada cual tiene dos o más niveles.
- ANOVA de tres vías: Este es un tipo de ANOVA que se utiliza cuando hay tres factores independientes, cada cual tiene dos o más niveles.

### ***Parámetros de la prueba ANOVA***

La finalidad de una prueba ANOVA es evaluar si dos o más grupos son estadísticamente iguales o si existe una diferencia significativa entre ellos. Se debe establecer una hipótesis nula al momento de comenzar la prueba donde se establece la creencia inicial que se tiene sobre los grupos a evaluar. Al hacer un análisis estadístico, esta hipótesis indica que las medias de todos los grupos evaluados son estadísticamente iguales o que no hay diferencia significativa entre los grupos. Esta hipótesis se evalúa por medio de la prueba F. Esta es la prueba que se realiza por medio de la tabla ANOVA para verificar si se cumple la hipótesis nula, es decir, verificar que si existe diferencia significativa entre las medias de los grupos evaluados o no (Gravetter y Wallnau, 2022).

### ***Supuestos de la prueba ANOVA***

Para realizar la prueba ANOVA, se requiere que los datos a evaluar cumplan con ciertos supuestos para que los resultados obtenidos por esta sean válidos. Según Gravetter y Wallnau (2002), los supuestos son:

- Normalidad: Los datos deben de estar normalmente distribuidos.
- Homocedasticidad: La varianza de los datos debe ser igual en los grupos a evaluar.
- Independencia: Los datos deben de ser independientes entre sí.

### ***Interpretación de los resultados de la prueba ANOVA***

Según Gravetter y Wallnau (2022), el resultado de una prueba ANOVA se presenta en una tabla ANOVA que muestra los siguientes parámetros:

- Grados de libertad (GL): Los grados de libertad son una medida de la cantidad de valores independientes en una muestra de datos.
- Estadístico F: El valor estadístico F es una medida de la magnitud de la diferencia entre las medias de los grupos evaluados.

- Valor p: El valor p es la probabilidad de obtener un valor estadístico F al menos de la misma magnitud como el que se observó, si la hipótesis nula no se puede rechazar.

Para poder interpretar los resultados de una tabla ANOVA, se debe comparar el valor p con el nivel de significancia usado. Si el valor p es menor al nivel de significancia utilizado, entonces se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay diferencias significativas en las medias de los grupos evaluados (Gravetter y Wallnau, 2022).

### ***Post hoc***

Al momento de rechazar una hipótesis nula, el análisis ANOVA no nos indica cuál es el grupo (o grupos) que son distinto(s) y tampoco nos indica si la media es mayor o menor que el resto de los grupos. Para esto se pueden realizar diferentes pruebas para ver cada par de grupos y si sus medias son iguales o distintas. Según Gravetter y Wallnau (2022), algunos métodos post hoc comunes son:

- Tukey HSD
- Bonferroni
- Scheffe
- Prueba t

## V. Antecedentes

Debido a los altos costos para la refinación del glicerol crudo, este no es utilizado para su purificación debido a que no es atractivo económicamente. Esto hace que el glicerol crudo esté disponible a un costo relativamente bajo y a un volumen alto de un subproducto de un proceso y se considere un residuo. Su utilización es necesaria para revalorizar la producción de biodiésel y el uso de aceites desechados como materia prima de este proceso de producción. El glicerol no es tóxico, es comestible, biodegradable y tiene más cualidades funcionales que lo hacen ser uno de los bloques fundamentales para la síntesis orgánica (Samudrala, 2019). Debido a esto, se busca utilizar la molécula de glicerina como sustrato o iniciador para una variedad de químicos intermediarios. Tradicionalmente, una de las tecnologías más comunes para el uso del glicerol crudo era la combustión directa de este material. Esto no era recomendado debido a la generación de acroleína, un producto muy nocivo que proviene de la combustión del glicerol crudo. Este compuesto tiene un punto de ebullición de 53 °C y una temperatura de autoignición de 234 °C junto con un alto contenido de sales (Gupta y Kumar, 2012). Al compararlo con otros compuestos usados como combustibles, la emisión de compuestos orgánicos volátiles era mucho mayor. Asimismo, este aprovechamiento del glicerol crudo no permitía hacer uso de todo su valor (Hejna et al. 2016).

Por esta razón, se ha aumentado la experimentación e investigación durante la última década para la conversión del glicerol crudo en compuestos de alto valor comercial (Kenar, 2007). La glicerina es el precursor para la síntesis de una variedad de compuestos químicos muy utilizados tales como alquenos, alcoholes, dioles, éteres, ácidos, esterres, acrilatos y hasta poligliceroles haciendo uso de una variedad de procesos que incluyen procesos termoquímicos como la pirolisis, técnicas biológicas como la fermentación, métodos fisicoquímicos como la eterificación, transesterificación, electrolización, deshidratación, halogenación, polimerización y acetificación (Zheng et al. 2020). En la Tabla 5 se enlistan las técnicas actuales para el uso de glicerol crudo.

**Tabla 5**

*Resumen de las técnicas actuales para la utilización de glicerol crudo*

<b>Técnica de utilización</b>	<b>Mecanismo de reacción</b>	<b>Productos finales</b>	<b>Condición de proceso</b>	<b>Ventajas del proceso</b>	<b>Desventajas del proceso</b>
<b>Técnicas bioquímicas</b>					
Fermentación microbiana	Digestión aeróbica y anaeróbica	Bioetanol, dioles, dihidroxiacetona	Catálisis enzimática con hongos,	Alta selectividad del producto	Preparación compleja de microorganismo

		s, hidrógeno, entre otros	bacterias, temperaturas medias, pH relativamente neutro y velocidad de agitación de 200-400 rpm. Duración del proceso: 0.5 a 5 días	(<70%), promueve la catálisis, bajo costo de producción	s, largos periodos de reacción (días), baja energía cinética de reacción, riesgo de patógenos
Fermentación bioelectroquímica	Reacción anaerobia	1,3-propanodiol, ácido hidroxipropionico e hidrógeno	Proceso fed-batch en un reactor de celda de hidrógeno, temperatura media, tiempo (1-10 días)	Mayor producción en comparación con la fermentación tradicional	Mayor costo y tiempo de reacción
<b>Técnicas termoquímicas</b>					
Pirolisis gaseosa	Deshidratación	Acetaldehído, acroleína, hidroxiketona e hidrógeno	Reactor de lecho fijo, temperatura (600-800°C), catalizador de zeolitas, tiempo de residencia de >7s	Altas temperaturas favorecen la síntesis de gas, bajas temperaturas la de líquidos. Menor tiempo	Produce monóxido de carbono
Pirolisis rápida	Hidrogenación, deshidratación	Biobenceno, dioles, propilenglicol	Temperatura (400 – 800 °C), ausencia de oxígeno, tiempo de residencia (0.3 – 3s), catalizadores	Alto rendimiento de hidrocarburos	Generación de coque, desactivación irreversible, alto coste para el hidrotratamiento.
Fluidos supercríticos	Hidrocrackeo, deshidratación	Metano, hidrógeno, dióxido de carbono y otros gases	Reactor batch, 300 °C, 1-4 hrs, 10 – 30 MPa, agua desionizada	No se forma char, 90% de producción de gas a 380 °C	Baja selectividad y rendimiento, alto costo de solventes orgánicos

			como solvente		
	Carbonilación	GC	Temperatura (>150°C), presión (50 atm), metanol como solvente	100% de selectividad	N/A
	Deshidrogenación, tautomerización keto-enol, rearreglo de ácido bencílico	Ácido láctico, propilenglicol	Temperatura > 290 °C, 50 atm, agua como solvente, tiempo de 3 hrs, óxido de calcio como catalizador	Otra alternativa para producir ácido láctico, alta conversión del glicerol	Bajo rendimiento de ácido láctico
SR	Deshidrogenación y deshidratación	Hidrógeno y otros gases	Reactor de lecho fijo, 350- 800 °C, catalizador de platino/níquel	Alta conversión y selectividad	Se requieren de catalizadores específicos, algunos arreglos llevan tiempos de reacción largos > 8hrs
APR	Deshidrogenación	Hidrógeno, etilenglicol	Temperatura (150 – 265 °C), 15 – 70 bar, catalizador, tiempo (1-56 hrs)	Bajo consumo energético, Alta conversión de glicerol	Desactivación de catalizador a temperaturas elevadas, mayor tiempo de reacción para mayor conversión
Pirolisis asistida por microondas	Gasificación	Hidrógeno y dióxido de carbono	Temperatura (300 – 900 °C), catalizador de carbón activado, flujos de gas de 100 – 2000 mL/min	Mayor producción de gas a bajas temperaturas	Alto consumo de energía
<b>Técnicas fisicoquímicas</b>					

Emulsificación	Microemulsión	Microemulsión de glicerol en diésel, combustible en emulsión	Surfactantes, cosurfactantes, 45 – 60 °C, tiempos de 12 hrs.	Uso directo de combustible	Mayor tiempo de reacción y se puede usar con bajo concentración de residuos
Transesterificación	Carbonilación	GC	Catalizador, temperatura (90 – 120 °C), tiempo 1 hr, baja presión (30 – 50 mbar)	Alto rendimiento de gases, remoción de agua, incremento de su estabilidad	Bajo rendimiento de productos finales
Esterificación catalítica	Esterificación, condensación de glicerol	Éter terbutílicos, poligliceroles	Proceso batch, temperatura (90 – 260 °C), catalizador, tiempo de 2 - 24 hrs, 0.1 MPa	Alta conversión de gas a mayores tiempos de reacción	Sistema complejo, baja conversión
<b>Técnicas electroquímicas</b>					
Electrolisis	Electrooxidación, hidrogenación y desoxigenación	Dihidroxiacetona, dióxido de carbono, ácido láctico, acetona, isopropanol	Temperatura y presión ambiente, catalizador, tiempo de 4 hrs	Alta selectividad y producción, bajo costo de operación	Baja oxidación del segundo grupo de alcohol, tiempo largo de electrolisis

*Nota.* Adaptado de Moklis, Cheng y Cross (2023)

El uso de glicerol crudo en procesos fermentativos ha sido estudiado con varios microorganismos como la levadura, hongos, bacteria, mezclas con aguas de desecho y microalgas bajo circunstancias aerobias y anaerobias para producir una diversidad de compuestos químicos. Estudios recientes se han enfocado en el uso del glicerol crudo como una fuente de carbono en las fermentaciones microbianas para producir compuestos amigables con el ambiente (Rodrigues *et al*, 2020). Así, estas conversiones con la ayuda de microorganismos prometen ser un recurso valioso y mejorar el valor biotecnológico en la industria del biodiésel. Algunas ventajas de las fermentaciones se deben a su mayor rendimiento, selectividad y recuperación del producto (Pradma y Kulkarni, 2017). Sin embargo, también tiene desventajas como el riesgo de patógenos, contaminantes en el sustrato y menor energía cinética de reacción que resulta en tiempos más largos de reacción, lo cual impacta el crecimiento y tasa de

conversión. Cabe recalcar que la capacidad de producir estos microorganismos a escala industrial también podría afectar la aplicación de estas técnicas. A continuación, se explicará el uso de algunos microorganismos que pueden utilizar el glicerol crudo para diferentes procesos biológicos:

### **Bacterias**

Algunas de las bacterias más utilizadas que logran procesar el glicerol y sintetizar productos con alto valor comercial en fermentaciones aerobias, anaerobias o microaerobias son *Clostridium*, *Klebsiella*, *Komagataella*, *Lactobacillus*, *Lipomyces*, *Escherichia*, *Candida* y *Raoultella* (Pradma y Kulkarni, 2017). El metabolismo oxidativo y reductivo son usados para consumir el glicerol que resulta en la formación de ácido orgánicos y alcoholes. De los estudios realizados con las bacterias mencionadas anteriormente, se puede decir que varias han sido utilizadas para la conversión de glicerol en 1,2- y 1,3-propanodiol. Los rendimientos altos de este compuesto han sido obtenidos alrededor de 0.62 a 1.09 mol/mol de glicerol, con una productividad inconsistente de 0.92 a 10.3 g/L/h. Cabe destacar el trabajo de Tang *et al* donde se modificó una cepa de *E. coli* con genes adicionales para la producción de 1,3-propanodiol. El rendimiento final de propanodiol, su productividad y su tasa de conversión fueron de 1.09 mol/mol, 2.61 g/L/h, y 90.2% (g/g), respectivamente. Johnson y Rehman (2016) lograron investigar el efecto de disminuir el pH durante la fermentación de glicerol crudo usando *C. pasteurianum*, lo que conllevó a un decrecimiento de células, producción de dióxido de carbono y fermentaciones más lentas que resultaron en una alta producción de butanol y propanodiol en procesos continuos (Tan et al. 2009; Johnson y Rehman, 2016).

Por otro lado, para la síntesis de ácido láctico, se ha usado *E. coli* modificada como una alternativa a la regeneración de NAD<sup>+</sup> en la ausencia de aceptadores de electrones externos. La ruta biológica de síntesis de ácido láctico por medio de glicerol crudo asistida por microorganismos es altamente selectiva en generar D- o L- ácido láctico, debido a la alta selectividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Basado en el trabajo de Mazumdar et al. (2013), la *E. coli* ha sido modificada para mejorar su eficiencia en la conversión de glicerol a D- y L- ácido láctico bajo condiciones microaerobias y anaerobias. El rendimiento se encuentra entre 0.85 y 0.93 mol por mol de glicerol y con una concentración de 34 g/L y 50 g/L al final de cada concentración, respectivamente (Mazumdar et al. 2013). En el estudio de Hong et al. (2009) se utilizó la cepa de *E. coli* AC-521 para transformar el glicerol a ácido láctico en condiciones aerobias con condiciones de fermentación de 42 °C, pH 6.5 y 0.85 min<sup>-1</sup> (K<sub>L</sub>A). La concentración general de ácido láctico y el consumo de glicerol tuvo su pico a las 88 horas de fermentación, resultando en un rendimiento de 86 g/L con una productividad de 0.97 g/L/h (Hong et al. 2009). También se han utilizados otras cepas diferentes al *E. coli* como el

*Lactobacillus casei* NCIM 2125, *K. phaffii* Glpard, y la levadura *S. cerevisiae* bajo condiciones de fermentación *fed-batch* para la síntesis de ácido láctico (Baek et al. 2016).

El *C. pasteurianam* ha sido investigado como un potencial productor de butanol. Bajo condiciones óptimas, puede generar hasta 0.43 mol/mol de butanol con una productividad de 0.074 g/L/h durante 120 horas usando glicerol crudo como sustrato (Jensen et al. 2012). En otro estudio realizado por Saini et al. (2017) el *E. coli* fue usado para asistir la fermentación de glicerol crudo a butanol obteniendo un rendimiento de butanol de 0.35 mol/mol (Saini et al. 2017). Otros tipos de bacterias se utilizan para la generación de bioetanol usando glicerol crudo como sustrato como *E. coli* SS1, *E. aerogenes* TISTR 1468, *Pachysolen tannophilus*, y *K. pneumonia* modificada, los cuales resultaron en rendimientos de producto de 1.00, 0.59, 0.56, y 0.89 mol/mol, respectivamente. También existe un estudio sobre el uso de la levadura *S. cerevisiae* con un rendimiento de 2.4 g/L de etanol lo que evidencia que también se pueden utilizar estos microorganismos para la síntesis de etanol (Yu et al. 2010).

#### **Mezclas de colonias y otras bacterias**

Se ha probado que, usando una mezcla de diversas comunidades de microorganismos, es posible procesar el glicerol crudo en compuestos de alto valor tales como el hidrógeno y los polihidroxicanoatos. De acuerdo con Mabutyana y Pott (2021), se ha demostrado que la producción de H<sub>2</sub> es la dominante al momento de hacer fermentaciones con una mezcla de microorganismos extraídos de aguas de desecho o la mezcla de varias cepas. Teóricamente, la fermentación del glicerol tiene una mejor capacidad para generar gas hidrógeno al final de la reacción si se compara con una fermentación usando glucosa. Esto se debe a que se genera una mayor cantidad de NADH en una base de tres carbonos. Un estudio realizado por Mabutyana y Pott (2021) evalúa la producción de gas hidrógeno en una homofermentación anaerobia de glicerol con compuestos fenólicos asistida por *Rhodopseudomonas palustris* a una temperatura de 35 °C con la presencia de luz de tungsteno. El estudio revela que la producción de biohidrógeno por *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 se ve significativamente mejorada por compuestos como el siringaldehído, que aumentó la producción total de hidrógeno a 960 mL durante el periodo de cultivo.

De acuerdo con Varrone et al. (2012) y Chen et al. (2021), la aplicación de lodos de aguas o mezclas de cepas mejora la conversión de glicerol crudo, pues produce hidrógeno gaseoso en un rendimiento aproximado de 0.52 a 0.96 mol/mol de glicerol. Asimismo, el glicerol se puede utilizar como sustrato para la producción de biogás. En las fases de acidogénesis y acetogénesis, se degrada a ácidos grasos volátiles y en la etapa final de la metanogénesis, el metano se produce del ácido acético, dióxido de carbono, o el hidrógeno gaseoso (Nomanbhay et al. 2020).

## **Hongos**

Los hongos forman un biocatalizador prometedor para mejorar la conversión de glicerol crudo en productos de alto valor comercial como aceites. De acuerdo con Chatzifragkou et al. (2011), durante la fermentación, los hongos tienden a almacenar lípidos dentro del micelio. El mayor rendimiento de lípidos producidos fue de 3.5 g/L con 0.1 g/g de biomasa. El aceite producido estuvo compuesto principalmente de ácidos oleicos. *Galactomyces geotrichum* y *ascomycetous fungus* fueron utilizados para dicha fermentación.

## **Levaduras**

Se ha evaluado el uso de levaduras que prometen un alto potencial de catabolizar el glicerol crudo para la producción de ácido cítrico y ácido succínico. Entre ellas, *Yarrowia lipolytica* demuestra la habilidad de usar glicerol crudo y sintetizar ácido cítrico por medio de una ruta aeróbica con parámetros de proceso óptimos (Morgunov et al. 2018). En el estudio de Li et al. (2018), se realizó una investigación para evaluar el efecto de la co-fermentación de glicerol crudo con residuos agrícolas para formar ácido succínico en condiciones aerobias usando *Y. lipolytica*. Al final de la reacción, se obtuvo una concentración de ácido succínico de 53.6 g/L, una productividad del proceso de 1.5 g/L/h, y un rendimiento general de 0.5 mol/mol producidos (Li et al, 2018).

## VI. Metodología

La caracterización del glicerol crudo es fundamental para poder determinar su calidad y su uso para aplicaciones industriales o como materia prima en otros procesos. Esta caracterización se realiza por medio de distintas técnicas analíticas que permiten evaluar su composición química y pureza. Algunos de los métodos utilizados son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y pruebas fisicoquímicas para obtener información sobre la concentración de glicerol, la presencia de impurezas y sus características físicas y químicas permitiendo entender cómo utilizar el glicerol de una manera más eficiente.

### Caracterización del glicerol

#### Equipo

- Balanza analítica Ohaus Pioneer Series modelo PA114, con un rango de medición de 0 – 110 g.y una incertidumbre de  $\pm 0.0001$  g.
- Viscosímetro B-ONE PLUS con aguja R-2 a R-7.
- Titulador Karl Fisher HI933.
- Potenciómetro Hanna Instruments.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción con columna de cromatografía Hi-Plex H 300 x 7.7 mm y filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Cromatógrafo de gases con detector de masas (GC/MS).
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV.

#### Cristalería

- Probeta graduada Kimax de 100 mL.
- Tubos de ensayo.

#### Reactivos

- Glicerol crudo de la producción de biodiésel.
- Soluciones buffer de 4.0, 7.0 y 10.0 pH.
- Glicerina USP.

### *Metodología*

#### **Densidad.**

La densidad del glicerol crudo es un parámetro clave que refleja su composición y pureza, y sirve como un indicador importante para evaluar su calidad y ajustar los procesos en la industria del biodiésel.

1. Se aseguró que la balanza analítica estuviera calibrada y funcionara correctamente. Se limpiaron y secaron las herramientas utilizadas.

2. Se aseguró que la balanza analítica estuviera calibrada y funcionara correctamente. Se limpiaron y secaron las herramientas utilizadas.
3. Se calibró la probeta graduada con un volumen conocido de agua destilada a una temperatura conocida. Se pesaron el agua y la probeta en la balanza para determinar su masa. Esto permitió calibrar el volumen presentado en la probeta para medir volúmenes precisos de líquidos.
4. Se vertió un volumen conocido de glicerol en la probado y se anotó el dato exacto corregido con la calibración.
5. Se pesó el líquido en la balanza analítica. Se aseguró que la probeta estuviera seca en su exterior para su medición.
6. Se determinó la densidad del líquido. Se registró la temperatura a la cual fue determinada la densidad.
7. Se realizó la medición en triplicado.

### **Viscosidad.**

La viscosidad del glicerol crudo es una propiedad fundamental que influye en su manipulación y procesamiento, y su medición proporciona una visión crítica de la calidad del producto y su comportamiento en aplicaciones industriales.

1. Para empezar a utilizar el viscosímetro, se realizó una nivelación, para ello se montó el soporte para laboratorio y se colocó la barra vertical dentro de la base. La cremallera y abrazadera de ensamble quedaron dando la cara hacia el frente de la base. La barra se mantuvo en su lugar con un tornillo en la parte inferior de la base. Se apretó el tornillo para que el equipo estuviera estable.
2. Se aseguró que el tornillo de la abrazadera estuviera lo suficientemente flojo. Luego, se insertó la varilla de montaje en la parte posterior. Se apretó el tornillo de la abrazadera y se ajustó el viscosímetro para que estuviera lo más cerca posible mientras se apretaba la abrazadera.
3. Se conectó el sensor de temperatura RTD al puerto en la parte trasera del viscosímetro.
4. Se comprobó que el viscosímetro estuviera nivelado. El nivel se ajustó usando los tornillos de nivelación en la base. Este se ajustó hasta que la burbuja de nivel que se encuentra en la parte superior del viscosímetro se hubiera centrado dentro del círculo. Este nivel se verificó periódicamente.
5. Se verificó que el interruptor estuviera apagado. Se conectó el cable al tomacorriente y a la línea apropiada de corriente. Se encendió el interruptor.
6. Antes de realizar alguna lectura, el viscosímetro fue autocerado. Esta acción se realizó cada vez que se encendió el instrumento.

7. Se removió el tapón de montaje de la aguja girando a favor del sentido del reloj.
8. Se seleccionó la aguja con la cual se realizó la prueba de viscosidad, tomando en cuenta la que produjera el mayor porcentaje de torque y velocidad (el porcentaje de torque deberá estar entre el 10% y 100%).
9. Se presionó la tecla de cambio de aguja y se indicó la aguja que se introdujo. Se presionó nuevamente para dejar registro.
10. Se colocaron 600 mL de glicerol en un vaso de precipitado. Antes de colocar la aguja, se introdujo de forma inclinada en el fluido y después se atornillo presionando hacia arriba y girándola en sentido del reloj.
11. Se colocó el vaso de precipitado de forma que quedara centrada la aguja y el líquido alcanzara el nivel de la muesca.
12. Se seleccionó la velocidad de operación a la cual se inició la prueba.
13. Se presionó el botón de “Encendido de motor” y después se verificó que las lecturas del torque estuvieran en el rango adecuado.
14. Si los valores no se encontraban entre 10% - 100%, se modificaría la velocidad. Si no se lograban esos rangos, se paraba el motor y se cambiaba la aguja.
15. Realizar la medición en triplicado.

#### **Porcentaje de agua.**

El porcentaje de agua en el glicerol crudo es un factor determinante para evaluar su pureza y calidad, ya que niveles elevados de humedad pueden afectar negativamente sus propiedades y su rendimiento en aplicaciones industriales.

1. Se llenó el vaso de titulación con la solución de anolito, generalmente yoduro de hidrógeno en un solvente adecuado.
2. Se colocaron los electrodos de referencia y de medida dentro del vaso.
3. Se preparó el electrodo de generación (ánodo) y se sumergió en la solución.
4. Se lleno la celda de titulación con el electrolito externo para mantener la conductividad eléctrica.
5. Se aseguró que el equipo estuviera limpio y calibrado para realizar el trabajo.
6. Se pesaron alrededor de 1 o 2 gramos de muestra de glicerol en un vaso de titulación limpio y seco.
7. Se agregó solvente para disolver la muestra y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.
8. Se introdujeron los electrodos en el vaso de titulación.
9. Se inició la titulación y se agitó la muestra por medio de un agitador magnético.

10. Se aplicó una corriente eléctrica conocida constante al electrodo de generación. La corriente liberó el yodo a partir del yoduro de hidrógeno presente en la solución anolito, y este reaccionó con el agua presente en la muestra.
11. La cantidad de electricidad utilizada se correlacionó directamente con la cantidad de agua presente en la muestra.
12. Se detuvo la titulación cuando la cantidad de electricidad usada alcanzó un valor constante. Esto indicó que la reacción terminó y se ha llegado al punto de equivalencia.
13. Se registró la cantidad de electricidad (generalmente en coulombs) utilizada durante la titulación.
14. Se utilizó la fórmula proporcionada por el fabricante del equipo Karl Fischer para calcular el contenido de agua presente en la muestra. Los cálculos hacen uso de la cantidad de electricidad y el factor de titulación.
15. Se realizó la medición en triplicado

### **pH.**

El pH del glicerol crudo es una característica esencial que influye en su estabilidad y reactividad, proporcionando información valiosa sobre la acidez o alcalinidad del producto y su adecuación para diversas aplicaciones industriales.

1. Se verificó que el electrodo del potenciómetro estuviera limpio y en buen estado.
2. Se tomaron las soluciones buffer para calibrar el potenciómetro. Estas soluciones buffer fueron de pH 4.0, 7.0 y 10.0 para calibrar.
3. Se encendió el potenciómetro y se seleccionó la opción de calibrar. El equipo indicó el pH a medir y se sumergió en la solución buffer que correspondiera a dicho pH. Se repitió el proceso para las tres soluciones buffer.
4. Se limpió y secó el electrodo antes de sumergirlo en la muestra de glicerol.
5. Se sumergió el electrodo en el glicerol y se esperó a que la lectura en el potenciómetro estuviera estable.
6. Se leyó y apuntó la lectura del pH.
7. Después de cada medición, se enjuagó el electrodo con agua destilada para eliminar restos de la muestra.
8. Se realizó la medición en triplicado.

### **Porcentaje de glicerina.**

El porcentaje de glicerina en el glicerol crudo es un indicador crucial de la pureza del producto, ya que refleja la concentración de glicerina en comparación con otros componentes e impurezas presentes en la muestra.

1. Se preparó una dilución 1:100 mL de la muestra de glicerol

2. Se preparó una curva de calibración de estándar de glicerina USP con los siguientes valores: 0.00 % (v/v), 2.00%, 4.00%, 6.00%, 8.00% y 10.00%.
3. Se enviaron las muestras a un análisis de cromatografía líquida (HPLC) para una determinación cuantitativa de la cantidad de glicerina presente en la muestra.
4. Se identificó la cantidad de glicerina presente en la solución por medio del reporte de cromatografía y la curva de calibración preparada.
5. Se transformó el valor obtenido por medio de la disolución realizada para encontrar la cantidad original de glicerina presente en la muestra sin diluir.
6. Se realizó la medición en triplicado

#### **Presencia de otros compuestos en la mezcla.**

La determinación de otros compuestos en el glicerol crudo mediante espectrometría de masas permite identificar y cuantificar con alta precisión las impurezas y subproductos presentes, proporcionando una comprensión detallada de su perfil químico y facilitando la optimización del proceso de producción.

1. Se tomó una muestra del glicerol utilizado y se colocó en un tubo de ensayo rotulado.
2. Se verificó que la muestra de glicerol no tuviera presente ni un material sólido.
3. Se enviaron las muestras a un análisis de identificación cualitativa de los compuestos presentes por medio del equipo de cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS).
4. Se identificaron los compuestos presentes por medio del cromatograma.

#### **Adaptación de la cepa al glicerol**

La adaptación de una cepa de *Lactobacillus plantarum* para utilizar glicerol crudo como sustrato implica la modificación metabólica de la cepa para que pueda utilizar eficientemente el glicerol crudo, que generalmente contiene impurezas y componentes diversos. La adaptación permite la conversión de glicerol crudo en productos de valor añadido, optimizando así el uso de recursos y contribuyendo a la sostenibilidad del proceso industrial.

#### **Equipo**

- Estufa eléctrica.
- Shaker MaxQ Mini 4450.
- Shaker Barnstead International Lab Companion SI-600.
- Incubadora.
- Micropipeta de 5 ML.
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV.

### Cristalería

- 5 cajas Petri.
- 20 tubos de ensayo.
- 5 pipetas graduadas de 10 mL.
- 18 Erlenmeyers de 150 mL.
- 5 Erlenmeyers de 50 mL.
- 5 Beakers de 150 mL.

### Reactivos

- Agar MRS.
- Agua destilada.
- Glicerol crudo.
- Peptona.
- Peptona de carne.
- Extracto de levadura.
- Glucosa.
- Fosfato dipotásico.
- Acetato de sodio.
- Citrato de amonio – hierro (III).
- Sulfato de magnesio heptahidratado.
- Sulfato de manganeso (II) monohidratado.
- *Lactobacillus plantarum*.

### ***Tolerancia de la cepa a la presencia de glicerol***

La tolerancia de la cepa *Lactobacillus plantarum* al glicerol crudo como sustrato es crucial para su capacidad de crecer y metabolizar eficientemente este sustrato al estar presente en el medio de cultivo.

1. Se rotularon 5 Erlenmeyer de 50 mL y 5 Cajas Petri con los siguientes porcentajes de glicerol: 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.5% y 5.0%
2. Se prepararon 25 mL de agar MRS. Los 25 mL de volumen deben de estar compuestos por el agar MRS y el volumen necesario del glicerol (concentración de glicerina del 55.775% v/v) para obtener las concentraciones escogidas de glicerina de cada uno.
3. Las proporciones de preparación se observan en la Tabla 6 a continuación:

**Tabla 6**

*Proporciones de preparación para la tolerancia de Lactobacillus plantarum a diferentes concentraciones de glicerina*

Concentración de glicerina (% v/v)	Cantidad de agar MRS (g)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de glicerol crudo (mL)
5.0%	1.65 g	22.75 mL	2.25 mL
3.5%	1.65 g	23.4 mL	1.6 mL
2.0%	1.65 g	24.1 mL	0.9 mL
1.0%	1.65 g	24.5 mL	0.5 mL
0.5%	1.65 g	24.75 mL	0.25 mL

*Nota.* Elaboración propia.

4. Luego de tener preparados las cinco proporciones, se llevó a ebullición en una estufa eléctrica la solución con agitación constante.
5. Después de ebullición, se retiró el material y se colocó en la autoclave para su esterilización a 121 °C durante 15 minutos.
6. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol al 95% y se encendió un mechero en el área de trabajo.
7. Al terminar la esterilización, se esperó a que el agar disminuyera ligeramente su temperatura. Luego, se llenaron las cajas Petri con el medio de agar MRS estéril, cada una correspondiendo al porcentaje de glicerina asignado.
8. Se esperó a que el agar solidificara en el área de trabajo.
9. Para inocular, se tomó un hisopo de la cepa *Lactobacillus plantarum* y se abrió la caja Petri de manera cuidadosa en el área de trabajo estéril.
10. Se utilizó el hisopo para transferir la cepa al agar estéril. Se debe utilizar un movimiento suave y ligero para esparcirlo en toda la superficie.
11. Se cerró la caja Petri y se selló con una tira de Parafilm.
12. Se colocó la caja Petri en una incubadora ajustada a la temperatura de 37°C.
13. Se repitió este procedimiento hasta haber inoculado todas las cajas.
14. Se incubó las cajas durante 2 a 3 días.
15. Después del período de incubación, se retiraron las cajas Petri de la incubadora y se examinó el crecimiento de las colonias de *Lactobacillus plantarum* en las diferentes concentraciones de glicerina añadida.
16. Se escogió el porcentaje de glicerina donde hubo un crecimiento más homogéneo de la cepa, siendo este el del 1.0 % v/v.

***Adaptación de la cepa al glicerol como sustrato en caldo MRS modificado***

La adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* a un caldo MRS modificado con glicerol crudo en lugar de glucosa representa una estrategia para explorar la capacidad de este probiótico de crecer y prosperar en medios de cultivo alternativos por medio de repiques consecutivos para adaptar el microorganismo a un nuevo sustrato.

1. Para adaptar la cepa, se tuvo que preparar un caldo MRS modificado a diferentes concentraciones de glucosa y una misma concentración de glicerol para hacer los repiques continuos hasta llegar a una cepa adaptada al glicerol como sustrato.
2. Se tomó la siguiente receta de caldo MRS para hacer las modificaciones:

**Tabla 7**

*Receta de caldo MRS*

Reactivos	Fórmula (en gramos por litro)
Peptona	10 g/L
Peptona de carne	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Fosfato dipotásico	2 g/L
Acetato de sodio	5 g/L
Citrato de amonio – hierro (III)	2 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g/L
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	0.05 g/L

*Nota.* Elaboración propia.

3. Debido a la naturaleza de los repiques, se debió modificar la glucosa necesaria en la receta para ir disminuyéndola en su concentración desde 20 g/L (equivalente a 0.2g/mL) hasta una concentración de 0 g/L. Esto se hizo mediante una disminución gradual de la concentración con las siguientes proporciones: 0.2 g/mL, 0.16 g/mL, 0.12 g/mL, 0.08 g/mL, 0.04 g/mL y 0.0 g/mL.
4. Los repiques se realizaron en seis tubos de ensayo con capacidad de 10 mL. Se rotularon los seis tubos con las proporciones de glucosa indicadas anteriormente. Se prepararon 60 mL de caldo MRS modificado con glicerol crudo y sin glucosa. Este caldo se separó en seis partes iguales de 10 mL y se les agregó la cantidad de glucosa necesaria a cada uno para obtener las proporciones indicadas.
5. Luego de tener preparadas las seis proporciones, se llevó a ebullición en una estufa eléctrica la solución con agitación constante.
6. Después de ebullición, se retiró el material y se colocó en la autoclave para su esterilización a 121 °C durante 15 minutos.

7. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol al 95% y se encendió un mechero en el área de trabajo.
8. Posteriormente, se procedió a realizar el inoculado del tubo de ensayo con la concentración original de glucosa (0.2 g/mL).
9. Se tomó un asa de metal y se tomó una colonia de la caja Petri preparada en la etapa de tolerancia de la cepa al glicerol al 1% (v/v).
10. La colonia se inoculó en el tubo de ensayo con la concentración original y se dejó en incubación a 37 °C durante un período de dos días. Los demás tubos de ensayo con caldo estéril fueron almacenados en un refrigerador a 4 °C.
11. Se dejó en observación durante dos días hasta obtener un crecimiento de la cepa en el caldo estéril. Al obtener el crecimiento, se realizó el repique de 0.2 g/mL a 0.16 g/mL en las mismas condiciones de trabajo.
12. Este proceso se repitió hasta llegar a obtener una cepa adaptada en caldo MRS modificado con glicerina al 1.0% (v/v) y con una concentración de glucosa de 0.0 g/mL.
13. Esta cepa fue repicada en 100 mL de caldo MRS modificado y en 2 cajas Petri con agar MRS modificado para su conservación y posterior uso.

#### ***Curva de crecimiento de la cepa adaptada***

La realización de una curva de crecimiento de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada a un medio de cultivo con glicerol crudo en lugar de glucosa permite evaluar detalladamente cómo esta adaptación afecta el desarrollo y la viabilidad de la cepa, proporcionando información importante para optimizar las condiciones de cultivo y mejorar la eficiencia del proceso de fermentación.

1. Se estableció una curva de crecimiento con los tiempos de muestreo de: 3 horas, 6 horas, 7.5 horas, 9 horas, 10.5 horas y 24 horas.
2. Posteriormente, se rotularon 18 Erlenmeyers de 150 mL con los tiempos de muestreo. El muestreo se hizo en triplicado.
3. Se prepararon 2000 mL de caldo MRS modificado con 1% de glicerina (v/v).
4. Luego de tener el caldo MRS modificado, se llevó a ebullición en una estufa eléctrica la solución con agitación constante.
5. Después de ebullición, se retiró el material y se colocó en la autoclave para su esterilización a 121 °C durante 15 minutos.
6. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol al 95% y se encendió un mechero en el área de trabajo.
7. Se dividió el caldo en proporciones de 100 mL para cada uno de los 18 Erlenmeyer y se retiraron 200 mL del caldo preparado para preparar el inóculo de 24 horas para comenzar la fermentación.

8. Se esterilizó el área de trabajo e inocular los 200 mL de caldo estéril con 18 mL del caldo inoculado previamente conservado de la adaptación de la cepa.
9. Se dejaron incubando los 200 mL de caldo MRS modificado inoculado por 24 horas a 37 °C.
10. Se agregaron 10 mL del inóculo inicial de 24 horas a cada uno de los Erlenmeyers y se colocaron dentro de la incubadora para empezar la curva de crecimiento.
11. Los 20 mL restantes del inóculo de 24 horas fueron utilizados para determinar por peso seco la concentración inicial de la curva de crecimiento.
12. Se tomaron muestras de 10 mL respetando el tiempo de muestreo establecido. Cada muestra fue centrifugada durante 15 min a 3400 rpm.
13. El sobrenadante fue dividido en dos y guardados en tubos de ensayo debidamente rotulados y el pellet fue pesado para obtener la cantidad de biomasa formada durante la fermentación.
14. La primera mitad del sobrenadante fue tratado con un exceso de carbonato de calcio, se dejó reposar por 24 horas con agitación constante de 100 rpm y después fue centrifugado nuevamente durante 15 min a 3400 rpm para eliminar el exceso de carbonato de calcio y el precipitado formado.
15. El sobrenadante tratado y el sobrenadante de la fermentación fue enviado a HPLC para determinar la concentración de glicerina, ácido láctico, ácido acético y etanol generados durante la fermentación.

### **Efecto de las variables fisicoquímicas en el crecimiento de la cepa**

La aplicación de una cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada a glicerol crudo debe ser evaluada para obtener los parámetros que optimicen la síntesis del producto deseado, en este caso el ácido láctico. Por eso, se realiza el estudio del efecto de variables tales como la temperatura, la concentración de sustrato inicial y el tiempo de fermentación para obtener el mayor rendimiento de síntesis de ácido láctico.

#### **Equipo**

- Estufa eléctrica.
- Shaker MaxQ Mini 4450.
- Shaker Barnstead International Lab Companion SI-600.
- Incubadora.
- Micropipeta de 5 mL.
- Centrifugadora Fischer Scientific Modelo 228.
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV.

### Cristalería

- 1 caja Petri.
- 65 tubos de ensayo.
- 5 pipetas graduadas de 10 mL.
- 54 Erlenmeyers de 150 mL.
- 1 Erlenmeyer de 5000 mL.
- 2 Erlenmeyers de 50 mL.
- 2 Beakers de 150 mL.

### Reactivos

- Agar MRS.
- Agua destilada.
- Glicerol crudo.
- Peptona.
- Peptona de carne.
- Extracto de levadura.
- Fosfato dipotásico.
- Acetato de sodio.
- Citrato de amonio – hierro (III).
- Sulfato de magnesio heptahidratado.
- Sulfato de manganeso (II) monohidratado.
- Carbonato de calcio.
- *Lactobacillus plantarum* adaptado a glicerina.

### **Preparación**

1. Se establecieron las tres variables a medir y sus variaciones
  - Temperatura: 30 °C, 37 °C y 42 °C
  - Tiempo de fermentación: 24 horas y 48 horas
  - Concentración de glicerina: 0.5%, 1.0% y 2.0% (v/v)
2. Posteriormente, se rotularon 54 Erlenmeyers de 150 mL con las nueve variaciones que existían entre las combinaciones de concentración de glicerina y temperatura de operación. Para el tiempo se utilizó el mismo Erlenmeyer debido a la naturaleza de esta variable en la fermentación.

3. Se prepararon 2000 mL de caldo MRS modificado con 0.5% de glicerina (v/v), 2000 mL de caldo MRS modificado con 1.0% de glicerina (v/v) y 2000 mL de caldo MRS modificado con 2.0% de glicerina (v/v).
4. Luego de tener el caldo MRS modificado, se llevó a ebullición en una estufa eléctrica la solución con agitación constante.
5. Después de ebullición, se retiró el material y se colocó en la autoclave para su esterilización a 121 °C durante 15 minutos.
6. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol al 95% y se encendió un mechero en el área de trabajo.
7. Se dividió el caldo en proporciones de 100 mL para cada uno de los 18 Erlenmeyer por cada una de las concentraciones y se retiraron 200 mL de cada caldo preparado a distintas concentraciones para preparar el inóculo de 24 horas para comenzar la fermentación.
8. Se esterilizó el área de trabajo para inocular los 200 mL de caldo estéril con 20 mL del caldo inoculado previamente conservado de la adaptación de la cepa.
9. Se dejaron incubando los 200 mL de cada caldo MRS modificado inoculado por 24 horas a 37 °C.
10. Se agregaron 10 mL del inóculo inicial de 24 horas a cada uno de los Erlenmeyers y se colocaron dentro de las distintas incubadoras a diferentes temperaturas para empezar la fermentación.
11. Los 20 mL restantes del inóculo de 24 horas de cada caldo a diferente concentración fueron utilizados para determinar por peso seco la concentración inicial de la curva de crecimiento.
12. Se tomaron muestras de 10 mL respetando a las 24 horas y a las 48 horas de la fermentación. Cada muestra fue centrifugada durante 15 min a 3400 rpm.
13. El sobrenadante fue dividido en dos y guardados en tubos de ensayo debidamente rotulados y el pellet fue pesado para obtener la cantidad de biomasa formada durante la fermentación.
14. La primera mitad del sobrenadante fue tratado con un exceso de carbonato de calcio, se dejó reposar por 24 horas con agitación constante de 100 rpm y después fue centrifugado nuevamente durante 15 min a 3400 rpm para eliminar el exceso de carbonato de calcio y el precipitado formado.
15. El sobrenadante tratado y el sobrenadante de la fermentación fue enviado a HPLC para determinar la concentración de glicerina y ácido láctico presentes después de la fermentación.

### **Fermentación con las condiciones óptimas para la síntesis de ácido láctico**

Al evaluar la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada a glicerol crudo al respecto de los parámetros establecidos que optimicen la síntesis del producto deseado, ya se realiza un estudio de la curva de crecimiento para poder llegar a establecer un modelo cinético de la fermentación láctica.

#### Equipo

- Estufa eléctrica.
- Shaker MaxQ Mini 4450.
- Incubadora.
- Micropipeta de 5 mL.
- Centrifugadora Fischer Scientific Modelo 228.
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV.

#### Cristalería

- 1 caja Petri.
- 18 tubos de ensayo.
- 2 pipetas graduadas de 10 mL.
- 3 Erlenmeyers de 150 mL.
- 1 Erlenmeyer de 500 mL.
- 1 Erlenmeyers de 50 mL.
- 1 Beakers de 150 mL.

#### Reactivos

- Agar MRS.
- Agua destilada.
- Glicerol crudo.
- Peptona.
- Peptona de carne.
- Extracto de levadura.
- Fosfato dipotásico.
- Acetato de sodio.
- Citrato de amonio – hierro (III).
- Sulfato de magnesio heptahidratado.
- Sulfato de manganeso (II) monohidratado.
- Carbonato de calcio.
- *Lactobacillus plantarum* adaptado a glicerina.

La estadística por medio de la prueba ANOVA permite determinar las variables que tienen un efecto significativo en la síntesis de ácido láctico y así establecer la variable de mayor importancia al momento de realizar la fermentación láctica y optimizar la producción de ácido láctico.

1. Después del análisis ANOVA para determinar la combinación de variables que tuviera la mayor conversión de glicerol en la fermentación donde se evidenció que la concentración era la variable que mostraba varianza significativa en la experimentación.
2. Se decidió utilizar entonces la concentración del 2.0% que presentaba la mayor varianza y se mantuvieron constante la temperatura de 37 °C debido a que es la temperatura estándar de operación.
3. Se estableció una curva de crecimiento con los tiempos de muestreo de: 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas.
4. Posteriormente, se rotularon 3 Erlenmeyers de 150 mL. El triplicado consistía en las mismas condiciones de operación: 2% de concentración de glicerina (v/v) y una temperatura de 37 °C.
5. Se prepararon 350 mL de caldo MRS modificado con 2% de glicerina (v/v).
6. Luego de tener el caldo MRS modificado, se llevó a ebullición en una estufa eléctrica la solución con agitación constante.
7. Después de ebullición, se retiró el material y se colocó en la autoclave para su esterilización a 121 °C durante 15 minutos.
8. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol al 95% y se encendió un mechero en el área de trabajo.
9. Se dividió el caldo en proporciones de 100 mL para cada uno de los 3 Erlenmeyer y se retiraron 50 mL del caldo preparado para preparar el inóculo de 24 horas para comenzar la fermentación.
10. Se esterilizó el área de trabajo para inocular los 50 mL de caldo estéril con 18 mL del caldo inoculado previamente conservado de la adaptación de la cepa.
11. Se dejaron incubando los 50 mL de caldo MRS modificado inoculado por 24 horas a 37 °C.
12. Se agregaron 10 mL del inóculo inicial de 24 horas a cada uno de los Erlenmeyers y se colocaron dentro de la incubadora para empezar la curva de crecimiento.
13. Los 20 mL restantes del inóculo de 24 horas fueron utilizados para determinar por peso seco la concentración inicial de la curva de crecimiento.
14. Se tomaron muestras de 10 mL respetando el tiempo de muestreo establecido. Cada muestra fue centrifugada durante 15 min a 3400 rpm.

15. El sobrenadante fue dividido en dos y guardados en tubos de ensayo debidamente rotulados y el pellet fue pesado para obtener la cantidad de biomasa formada durante la fermentación.
16. La primera mitad del sobrenadante fue tratado con un exceso de carbonato de calcio, se dejó reposar por 24 horas con agitación constante de 100 rpm y después fue centrifugado nuevamente durante 15 min a 3400 rpm para eliminar el exceso de carbonato de calcio y el precipitado formado.
17. El sobrenadante tratado y el sobrenadante de la fermentación fue enviado a HPLC para determinar la concentración de glicerina, ácido láctico, ácido acético y etanol generados durante la fermentación.

### **Cuantificación y análisis de los metabolitos de fermentación por HPLC**

La cuantificación y análisis de los metabolitos generados durante una fermentación láctica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permiten una comprensión detallada de los procesos bioquímicos involucrados, facilitando la optimización y control de la producción del ácido láctico.

#### Equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción.
- Columna de cromatografía Hi-Plex H 300 x 7.7 mm.
- Filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV.

#### Cristalería

- Tubos de ensayo.

#### Reactivos

- Agua de alta pureza.
- Ácido láctico estándar.
- Glicerina USP.
- Ácido láctico estándar.
- Etanol estándar.
- Agua de alta pureza.

### ***Determinación de glicerol, etanol y ácido acético***

1. Se tomó el sobrenadante de la fermentación de glicerol previamente tratado para determinar el glicerol y el sobrenadante de la fermentación sin tratar para la determinación del etanol y el ácido acético y pasó por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar partículas y contaminantes.
2. Se aseguró que la columna Hi Plex H estuviera colocada correctamente en el HPLC y equilibrado a las condiciones de operación antes de comenzar el análisis.
3. Se estableció la temperatura de la columna en 65 °C.
4. Se configuró el detector de índice de refracción de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se estableció el tiempo de corrida en 29 minutos.
5. Se utilizó agua de alta pureza como fase móvil.
6. Se prepararon las soluciones estándar de glicerina, ácido acético y etanol en el HPLC para determinar la curva de calibración en contra de la respuesta del detector de índice de refracción.
7. Se inyectaron las muestras filtradas en el HPLC siguiendo el protocolo establecido.
8. Se registraron los tiempos de retención y las áreas de los picos correspondientes a la glicerina, ácido acético y etanol en las muestras.
9. Se utilizó una curva de calibración para determinar las concentraciones de glicerina, ácido acético y etanol en las muestras de fermentación.

#### ***Determinación de ácido láctico***

1. Se tomó el sobrenadante de la fermentación sin tratar para la determinación del ácido láctico y se filtró por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar partículas y contaminantes.
2. Se aseguró que la columna Hi Plex H estuviera colocada correctamente en el HPLC y equilibrado a las condiciones de operación antes de comenzar el análisis.
3. Se estableció la temperatura de la columna en 65 °C.
4. Se configuró el detector de UV-VIS a una longitud de onda de 210 nm de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se estableció el tiempo de corrida en 29 minutos.
5. Se utilizó ácido sulfúrico 0.005M como fase móvil.
6. Se prepararon las soluciones estándar de ácido láctico en el HPLC para determinar la curva de calibración en contra de la respuesta del detector de índice de refracción.
7. Se inyectaron las muestras filtradas en el HPLC siguiendo el protocolo establecido.
8. Se registraron los tiempos de retención y las áreas de los picos correspondientes al ácido láctico en las muestras.
9. Se utilizó una curva de calibración para determinar las concentraciones de ácido láctico en las muestras de fermentación.

## **Estadística**

La estadística también por medio de la prueba t permite establecer cuál de los parámetros escogidos por medio de la prueba ANOVA es el que está causando un cambio significativo en la síntesis de ácido láctico en la fermentación con *Lactobacillus plantarum*.

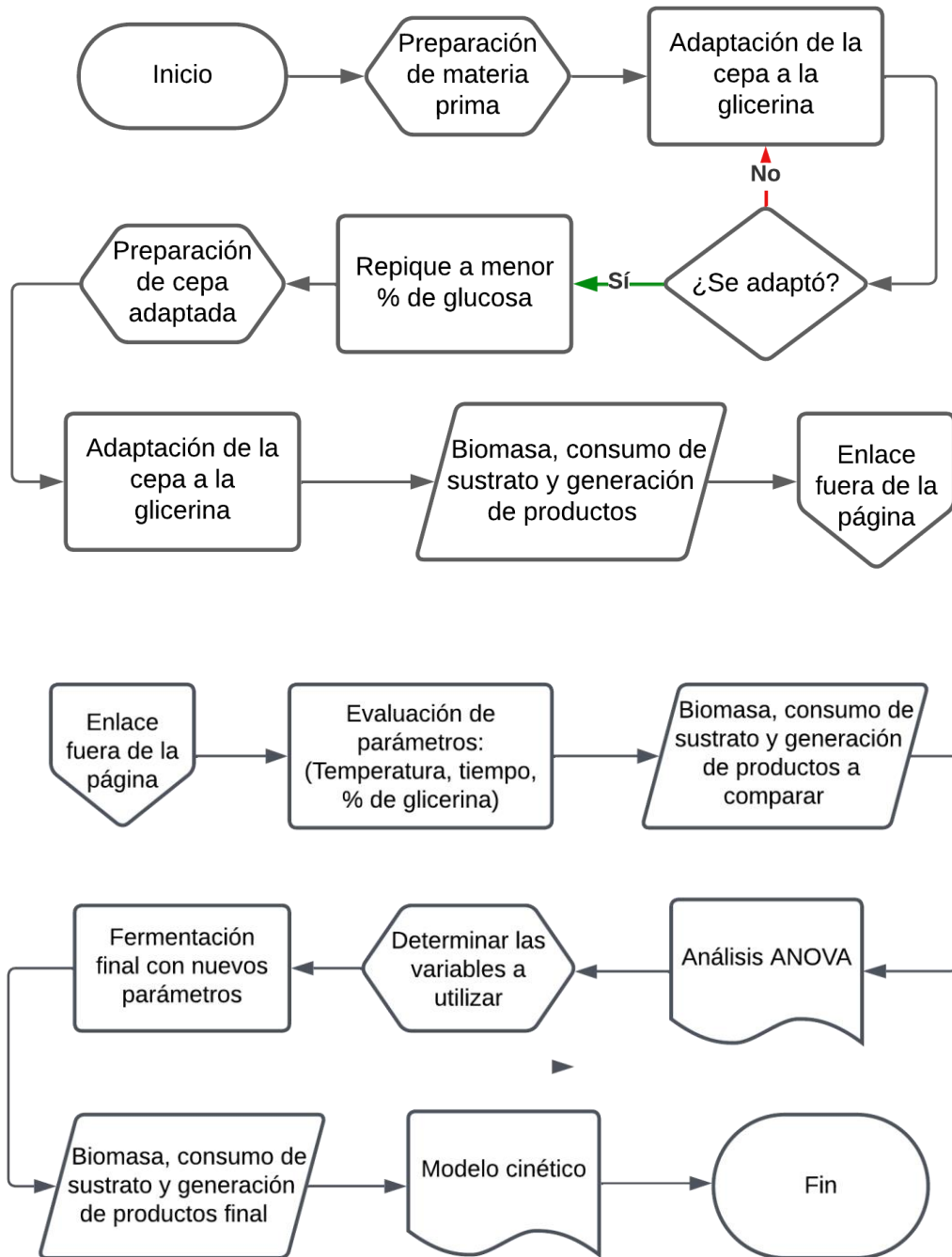
1. Se realizó el análisis ANOVA de un factor para las diferentes variables: temperatura, concentración de glicerina y tiempo de fermentación a los datos del inciso III para determinar cuál era el parámetro que causará una diferencia significativa en las variables planteadas.
2. El parámetro que causaba una diferencia era la concentración de glicerina. Se realizaron pruebas t de *student* para poder determinar cuál era la concentración que mostraba una diferencia significativa. Aquí se determinó que las muestras que presentabas diferencias significativas eran las de concentraciones de glicerina del 2.0% y del 0.5% (v/v).
3. Al determinar estas diferencias, se establecieron los parámetros de operación para la fermentación final.

## ***Diagrama de flujo del proceso***

El diagrama de flujo de proceso proporciona una representación detallada de las etapas y condiciones experimentales, facilitando la comprensión y el análisis de las variables críticas que afectan la conversión eficiente del glicerol en ácido láctico.

Figura 25

Diagrama de flujo de la metodología



Nota. Elaboración propia.

### Evaluación de la eficiencia de bioconversión de glicerol

La evaluación de la eficiencia de bioconversión de glicerol en una fermentación láctica es crucial para optimizar los procesos industriales de producción de ácido láctico, ya que

permite determinar la viabilidad y el rendimiento del uso de glicerol como sustrato alternativo, maximizando así la sostenibilidad y rentabilidad de la fermentación.

### ***Porcentaje de conversión de glicerol***

La conversión de la reacción es la cantidad de glicerol consumido ( $Glicerol_x$ ), dividido entre la cantidad de glicerol inicial ( $Glicerol_i$ ). Esto se observa en la Figura 26.

#### **Figura 26**

*Porcentaje de conversión de glicerol*

$$CG = \frac{Glicerol_i - Glicerol_x}{Glicerol_i} * 100$$

*Nota.* Elaboración propia.

### ***Rendimiento de la reacción (g/g)***

El rendimiento de la reacción se calcula en base en la cantidad de ácido láctico producido en la fermentación sobre la cantidad de glicerol consumido en la misma como se observa en la Figura 27.

#### **Figura 27**

*Porcentaje de rendimiento*

$$Y'_{ps} = \frac{\text{Ácido láctico producido (g)}}{\text{Glicerol consumido (g)}}$$

*Nota.* Elaboración propia.

### ***Productividad volumétrica (g/L\*h)***

La productividad volumétrica está definida como los gramos de ácido láctico producidos por unidad de volumen, en un tiempo dado. La ecuación que muestra esto se observa en la Figura 28.

#### **Figura 28**

*Productividad volumétrica*

$$Q = \frac{\text{Ácido láctico producido (g)}}{\text{Tiempo de fermentación} * \text{Volumen}}$$

*Nota.* Adaptado de Palomo y Díaz (2012).

## VII. Resultados

A continuación, se presentan los datos obtenidos durante la experimentación. Se presentan las propiedades determinadas del glicerol crudo utilizado en el trabajo. Asimismo, se presenta la curva de crecimiento al haber terminado la adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* al nuevo sustrato para analizar el comportamiento de la cepa. Posteriormente, se realiza una prueba de diferentes variables tales como el tiempo de fermentación, la temperatura de fermentación y la concentración inicial de glicerina presente en el glicerol crudo donde por medio de pruebas estadísticas como la prueba ANOVA y la prueba t de *student* se llega a determinar que la concentración de glicerol crudo tiene un efecto significativo en la síntesis de ácido láctico. Por último, se presenta el modelo cinético generado que explica el comportamiento de la fermentación láctica a las condiciones evaluadas.

Las propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo se obtuvieron por diversas pruebas tal como se detalló en la sección de metodología. Los datos presentados en la Table 8 son el promedio de las mediciones tomadas en triplicado para cada prueba.

**Tabla 8**


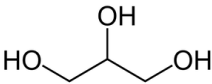
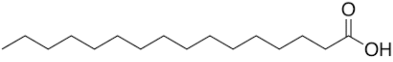
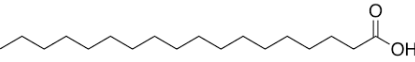
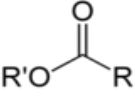
*Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo*

<b>Propiedad</b>	<b>Valor promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
Densidad (g/mL)	1.0185 g/mL $\pm$ 0.266	0.0034 g/mL
pH	11.1850 $\pm$ 0.05	0.0173
Viscosidad (cPs)	92.92 cPs $\pm$ 0.34	0.155 cPs
Glicerina (% v/v)	55.775 % $\pm$ 0.4323	1.7576 %
Metanol (%v/v)	5.403 % $\pm$ 0.1244	0.1414 %
Agua (%v/v)	1.117 % $\pm$ 0.023	0.0002 %

*Nota.* Elaboración propia.

La presencia de otros compuestos en el glicerol crudo se obtuvo por medio de un análisis de espectrofotometría de masas para determinar la presencia de otros compuestos. Estos se presentan en la Tabla 9. Debido a la naturaleza del proceso donde se obtuvo el glicerol crudo, no se puede determinar con exactitud la concentración de todos los compuestos presentes.

**Tabla 9***Compuestos identificados presentes en el glicerol crudo*

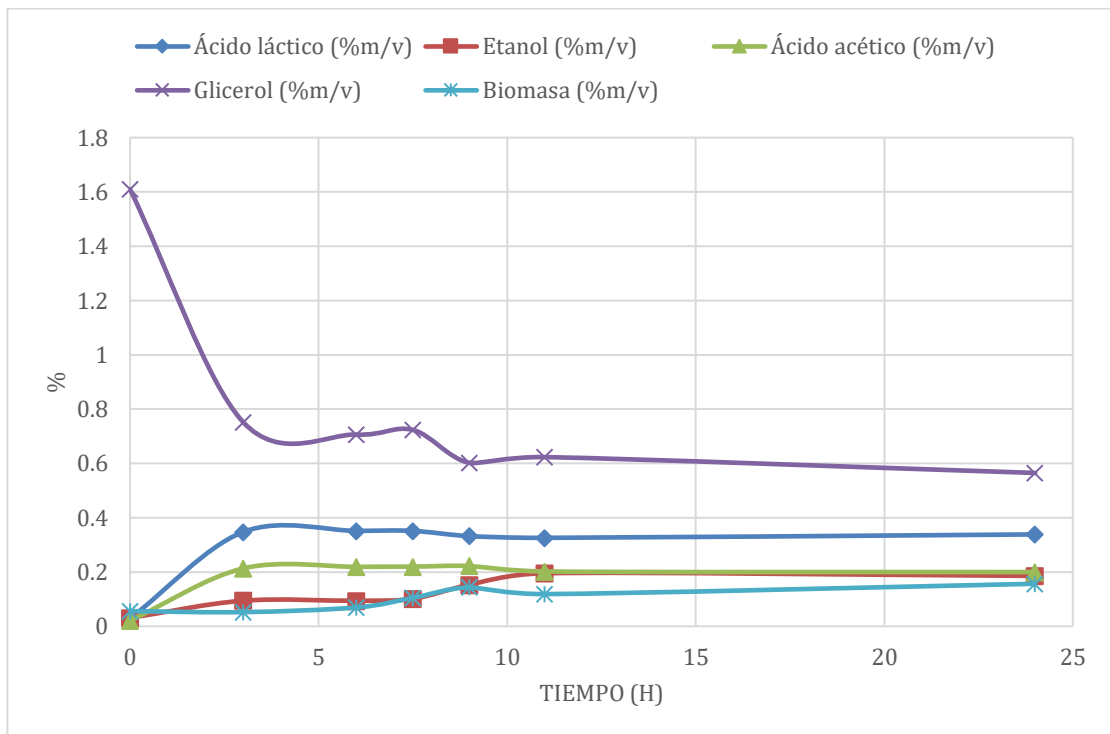
No.	Nombre del compuesto	Formula química	Estructura química	Probabilidad
1	Metanol	CH <sub>3</sub> OH	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	39
2	Heptano	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>		95
3	Glicerina	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>		83
4	Ácido hexadecanoico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>		98
5	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>		98
6	Éster metílico de ácido graso	N/A		99

*Nota.* Elaboración propia

En la Figura 29, se presenta la curva de crecimiento de la cepa adaptada a una concentración inicial de 1%(v/v) de glicerina del glicerol crudo a una temperatura de 37 °C y un tiempo de 24 horas. Esta curva se realizó para evaluar la adaptación de la cepa al nuevo sustrato. En esta se observa el comportamiento del sustrato, microorganismo, producto y subproductos de la fermentación realizada.

**Figura 29**

*Curva de crecimiento de la fermentación láctica a una temperatura de 37 °C de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo*

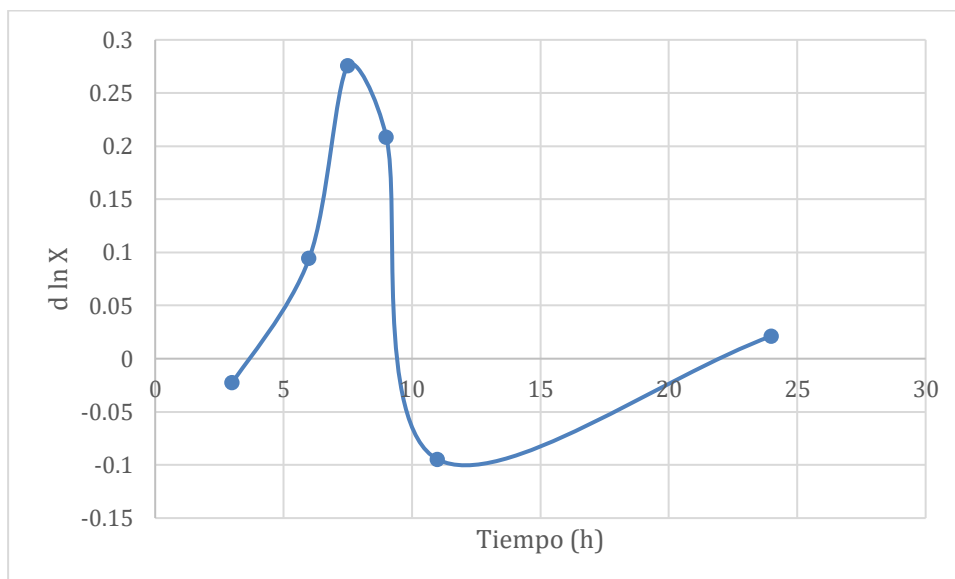


*Nota.* Elaboración propia.

La variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo permite establecer en cuál fase de crecimiento se encuentra la cepa durante el tiempo de fermentación y así poder determinar lo que está sucediendo con los sustratos y productos generados. La variación del logaritmo natural de los datos presentados en la Figura 29 se presenta en la Figura 30.

**Figura 30**

Variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo contra el tiempo para el análisis de las fases de la curva de crecimiento para la curva de crecimiento promedio de la fermentación a 37 °C con la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada



Nota. Elaboración propia.

La prueba ANOVA permitió evaluar las diferentes pruebas realizadas para determinar la variable que tenía un cambio significativo en la síntesis de ácido láctico utilizando glicerol crudo como sustrato. Los valores F y sus valores críticos se presentan en la Tabla 10. En esta prueba se determinó que la variable que causaba el cambio era la concentración de glicerina.

**Tabla 10**

Resultados de la prueba ANOVA en las diferentes variables evaluadas durante la fermentación de glicerol crudo por medio de una cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico

Variable evaluada	Valor F	Valor crítico de F	Resultado
Temperatura °C (32, 37 y 42)	0.7487	3.1788	No hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula
Concentración de glicerina (0.5%, 1.0% y 2.0%)	5.1745	3.1788	Hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula

Tiempo de fermentación (24 hrs y 48 hrs)	1.0419	4.0266	No hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula
--	--------	--------	--

*Nota.* Elaboración propia.

La prueba t se realizó para determinar cuál era la concentración de glicerina utilizada que causaba un cambio significativo en la síntesis de ácido láctico. Los resultados del valor p obtenido y la significancia utilizada se presentan en la Tabla 11. Esto permitió seleccionar la concentración a utilizar para realizar el modelo cinético de la fermentación láctica.

**Tabla 11**

*Resultados de la prueba t en las muestras de diferentes concentraciones de glicerina evaluadas durante la fermentación de glicerol crudo por medio de una cepa Lactobacillus plantarum adaptada para la síntesis de ácido láctico*

Muestras evaluadas (Concentración de glicerina % (v/v))	Valor p de las dos colas	Nivel de significancia	Resultado
0.5% vs. 1.0%	0.0605	0.05	No hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula
0.5% vs. 2.0%	0.0004	0.05	Hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula
1.0% vs. 2.0%	0.3609	0.05	No hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula

*Nota.* Elaboración propia.

Las ecuaciones presentadas en la Tabla 12 representan el modelo cinético utilizado para poder predecir el comportamiento de la curva de crecimiento obtenida de la fermentación láctica utilizando glicerina del glicerol crudo. Se utilizan distintas ecuaciones para explicar diferentes compuestos y tiempos de la misma fermentación.

**Tabla 12**

*Ecuaciones de los modelos cinéticos realizados en el software Berkeley-Madonna para el análisis de la fermentación láctico por medio de la cepa Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

<b>Ecuación</b>	<b>Descripción</b>	<b>SSE</b>	<b>RMSE</b>
$\mu_0 = \frac{\mu_{max} * (S - 1.57)}{k_s * X + (S - 1.57)}$	Describe la velocidad de reacción por medio del modelo Contois y Fujimoto para el uso de la glicerina como sustrato donde $\mu_{max}$ es la velocidad máxima de reacción con la glicerina, S es la concentración de glicerina, X es la concentración de biomasa y $k_s$ es la constante de afinidad hacia la glicerina.	N/A	N/A
$\mu_1 = \frac{\mu_{max1} * (S_1 - 0.901279)}{k_{s1} * X + (S_1 - 0.901279)}$	Describe la velocidad de reacción por medio del modelo Contois y Fujimoto para el uso teórico de la peptona como un sustrato donde $\mu_{max1}$ es la velocidad máxima de reacción con las peptonas, $S_1$ es la concentración de la peptona, X es la concentración de biomasa y $k_{s1}$ es la constante de afinidad hacia la peptona	N/A	N/A
$\frac{dS}{dt} = \mu_0 * \frac{X}{Y_{X/S}}$	Describe el consumo de glicerina donde $\mu_0$ es la velocidad específica correspondiente a la glicerina, X es la concentración de biomasa y $Y_{X/S}$ es el rendimiento	0.023015212	0.057340103

	entre el microorganismo y la glicerina como sustrato		
$\frac{dS_1}{dt} = \mu_1 * \frac{X}{Y_{X/S1}}$	Describe el consumo de teórico de la peptona donde $\mu_1$ es la velocidad específica correspondiente a la peptona, X es la concentración de biomasa y $Y_{X/S1}$ es el rendimiento entre el microorganismo y la peptona como sustrato	N/A	N/A
$\frac{dX}{dt} = X * \mu_1 + X * \mu_0$	Describe el crecimiento del microorganismo siguiente el modelo de Contois y Fujimoto para el consumo de glicerina y el consumo teórico de peptona, donde X es la concentración de biomasa, $\mu_1$ es la velocidad específica correspondiente a la peptona y $\mu_0$ es la velocidad específica correspondiente a la glicerina	0.003107214	0.021068643
$\frac{dAL}{dt} = -a * \left( \mu_0 * \frac{X}{Y_{X/S}} \right) + b * X$	Describe la síntesis de ácido láctico donde X es la concentración de biomasa, $\mu_0$ es la velocidad específica correspondiente a la glicerina, $Y_{X/S}$ es el rendimiento entre el microorganismo y la glicerina como sustrato, y a y b son constantes de proporcionalidad del	0.020715255	0.054399652

	modelo de Luedeking-Piret.		
$\frac{dAC}{dt} = c * S + d$	Describe la producción de ácido acético donde S es la concentración de glicerina y c y d son constantes de proporcionalidad del modelo de Luedeking-Piret.	0.000144972	0.004550858
$\frac{dAC}{dt} = 0.13074$	Describe el estado de la concentración de ácido acético luego de las 4 horas iniciales de fermentación	0.000144972	0.004550858
$\frac{dEta}{dt} = -g * \left( \mu_0 * \frac{X}{Y_{X/S}} \right) + h * X$	Describe la síntesis de etanol donde X es la concentración de biomasa, $\mu_0$ es la velocidad específica correspondiente a la glicerina, $Y_{X/S}$ es el rendimiento entre el microorganismo y la glicerina como sustrato, y g y h son constantes de proporcionalidad del modelo de Luedeking-Piret.	0.001955409	0.016713592

*Nota.* Elaboración propia.

Los parámetros son las constantes presentes en el modelo cinético que permite que el modelo se adapte de forma a los datos obtenidos para la realización de la curva de crecimiento final de la fermentación láctica. Los parámetros determinados para el modelo cinético se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13**

*Parámetros cinéticos del modelo establecido para el uso de *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico ajustados a los datos experimentales obtenidos a una fermentación a una temperatura de 37 °C y una concentración inicial del 2.*

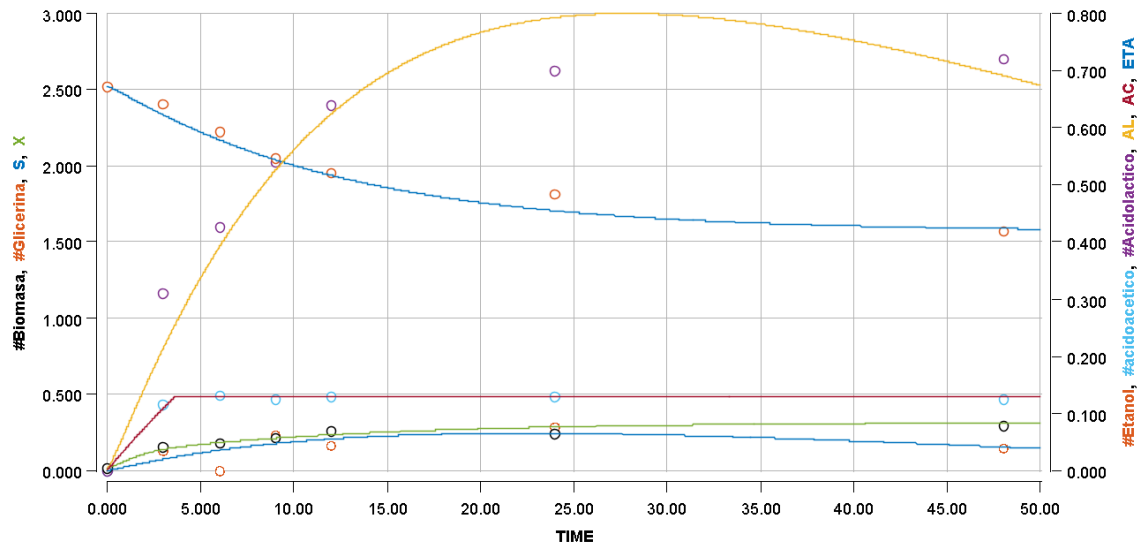
<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ )	1.7 (h <sup>-1</sup> )
Velocidad máxima de crecimiento 1 ( $\mu_{max1}$ )	1.5 (h <sup>-1</sup> )
Constante de saturación media para el sustrato (Ks)	92
Constante de saturación media para el sustrato 1 (Ks <sub>1</sub> )	1.5
Rendimiento del microorganismo con respecto al sustrato (Yx/s)	-0.22
Rendimiento teórico del microorganismo con respecto a la peptona (Yx/s1)	-0.9
Constante de proporcionalidad (a)	1.17874
Parámetro del modelo de Luedeking-Piret (b)	-0.03296
Constante de proporcionalidad (c)	0.03
Parámetro del modelo de Luedeking-Piret (d)	-0.0368
Constante de proporcionalidad (g)	0.11212
Parámetro del modelo de Luedeking-Piret (h)	-0.00511

*Nota.* Elaboración propia.

En la Figura 31, se presenta la curva de crecimiento de la cepa adaptada a una concentración inicial de 2%(v/v) de glicerina del glicerol crudo a una temperatura de 37 °C y un tiempo de 48 horas. Esta curva se realizó para evaluar la adaptación de la cepa al nuevo sustrato y la generación de productos de la fermentación.

**Figura 31**

*Curva de crecimiento del modelo cinético de la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico*

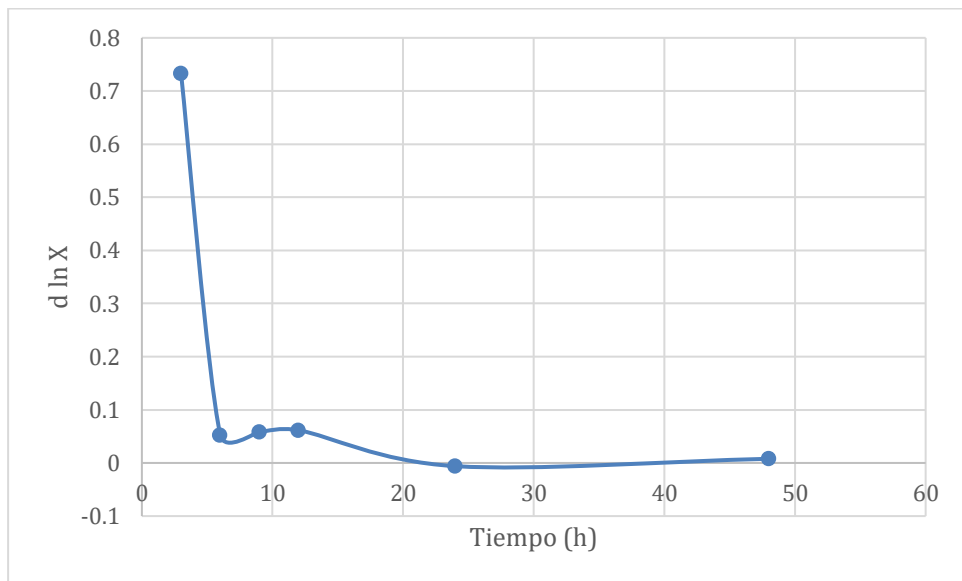


*Nota.* Elaboración propia.

La variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo permite establecer en cuál fase de crecimiento se encuentra la cepa durante el tiempo de fermentación y así poder determinar lo que está sucediendo con los sustratos y productos generados. La variación del logaritmo natural de los datos presentados en la Figura 31 se presenta en la Figura 32.

**Figura 32**

Variación del logaritmo natural de la concentración del microorganismo contra el tiempo para el análisis de las fases de la curva de crecimiento para la curva de crecimiento promedio de la fermentación a 37 °C con la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada



Nota. Elaboración propia.

## VIII. Análisis de resultados

En este trabajo de graduación, se realizó la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* para la síntesis de ácido láctico. Como primer punto, se evaluaron las propiedades del glicerol crudo a utilizar. Esto con la finalidad de tener un entendimiento del tipo de materia prima que se iba a utilizar para la fermentación. Por medio de un análisis de HPLC se obtuvieron los datos obtenidos en la Tabla 8 de la sección de resultados. Se obtuvo una concentración de  $55.775\% \pm 0.4323$  de glicerina (% v/v) y una concentración de  $5.403\% \pm 0.1244$  de metanol (% v/v). Al evaluar la desviación estándar presentada en el mismo cuadro, se puede determinar que no existe diferencia significativa en las mediciones tomadas de estos dos parámetros. Se puede observar que el valor de la concentración de glicerina se encuentra en el rango indicado en la Tabla 1 de la sección del Marco teórico. El metanol presente en la mezcla se debe a que este es el alcohol utilizado para la reacción de transesterificación por medio de la catálisis con hidróxido de sodio.

El análisis del agua presente en la mezcla se llevó a cabo por medio de una titulación de Karl-Fischer donde se obtuvo que la concentración de agua utilizada en la mezcla era de  $1.117\% \pm 0.023$  (% v/v) con una desviación estándar baja, esto debido a la confiabilidad del método utilizado. Sin embargo, la mezcla tiene la presencia de otros compuestos que debido a la falta de estándares no pudieron ser cuantificados, pero se realizó un análisis cualitativo para poder establecer un parámetro de comparación de los compuestos presentes en el glicerol crudo. Se realizó por medio de espectrofotometría de masas y se lograron identificar los compuestos mencionados en la Tabla 9 de la sección de resultados. Se observa la presencia de compuestos cuantificados anteriormente pero también la presencia de heptano, ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos. El heptano presente se debe a que el glicerol fue producido a partir de aceites comerciales. Hay varios aceites o grasas comerciales que contienen este compuesto. Generalmente, se encuentran en bajas concentraciones en los aceites y la presencia de este en el glicerol indica que su calidad no es muy alta y recae en la categoría de glicerol crudo (García et al. 2012). La presencia de ácidos grasos y ésteres metílicos en el glicerol crudo se debe también a la procedencia de este y a la reacción de transesterificación. La reacción se lleva a cabo entre aceite y metanol y es catalizada por hidróxido de sodio. Los ácidos grasos provienen de aceite que no terminó de reaccionar y los ésteres metílicos son parte del biodiésel que se permite pasar durante el proceso de decantación para asegurarse que el biodiésel producido no tiene rastros de glicerol. Esto equivale a que hay alrededor de menos del 40 % en volumen de impurezas que corresponden a estos compuestos. Debido a que no se pueden obtener estándares exactos, estos no pudieron ser cuantificados.

En consecuencia, se prosiguió a medir algunas propiedades físicas del glicerol. Primero, se midió la densidad a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se comparó con el valor de la densidad del glicerol puro a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

que es de 1.31 g/mL. La densidad tuvo un valor de 1.0185 g/mL  $\pm$ 0.266. Dicha variación de la densidad ocurre debido a que el glicerol crudo obtenido por el proceso de la transesterificación del aceite se queda con las impurezas presentes en el medio de reacción, al igual que con las impurezas del aceite utilizado. El pH es otro indicador de que el glicerol crudo tiene trazas de impurezas. El valor de pH del glicerol puro es de 6.4. El valor obtenido al medir la solución de glicerol crudo diluida en 50 mL de agua destilada fue de 11.18  $\pm$ 0.05. Esto evidencia las trazas de álcalis utilizados para catalizar la reacción como el hidróxido de sodio debido a que tiene un pH básico comparado con el glicerol puro (Shengjun et al. 2012). Por otro lado, la viscosidad es un parámetro que no es tan práctico para comparar debido a que depende de diversos factores como el método utilizado, el tipo de viscosímetro utilizado, la temperatura, entre otras. El valor obtenido fue 92.92 cPs  $\pm$ 0.34 con una desviación estándar de 0.155 cPs. Este resultado es un dato muy complejo de comparar porque depende de varios factores físicos y también de la fuente de donde se haya obtenido el glicerol crudo por lo que no se puede dar determinaciones concretas sobre este y su relación con el glicerol.

El color de la muestra de glicerol crudo también demuestra la presencia de otros compuestos que hacen que las propiedades de la glicerina varíen debido a estar en una solución con otros compuestos tales como: ácidos grasos, ésteres metílicos, metanol y agua. El glicerol crudo utilizado se puede observar en la Figura 59 en la sección de anexos en las Ilustraciones. Los ácidos grasos, los ésteres metílicos y la coloración oscura vienen del uso del aceite quemado. El agua y el metanol provienen del proceso de producción de biodiésel donde se utiliza el metanol para realizar la transesterificación y el agua para lavar el biodiésel y remover las impurezas de esa fase (Shengjun et al. 2012).

Posterior a analizar el glicerol crudo, se llevó a cabo la adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* para poder utilizar el glicerol crudo como sustrato. Primero, se realizó una prueba de tolerancia de la cepa a la presencia de glicerol crudo en agar MRS no modificado. Esta se realizó a concentraciones de 0.5 % v/v de glicerol crudo hasta un 5.0 % v/v. Esta prueba se puede observar en la Figura 61 de la sección de anexos en las Ilustraciones. Se evidenció que el crecimiento de la cepa disminuyó en las concentraciones altas de glicerol y que en las concentraciones relativamente bajas se mantuvo constante. Asimismo, cabe destacar que al utilizar concentraciones por encima del 2.0 % v/v de glicerol se evidenció un turbidez en el agar y la presencia de otros compuestos que se puede deber a la presencia de ácidos grasos en la mezcla. Debido a esto, se procedió a realizar la adaptación a una concentración de 1.0% v/v de glicerol crudo.

La adaptación se llevó a cabo haciendo repiques continuos en agar MRS modificado, donde se disminuyó la concentración de glucosa paulatinamente hasta eliminarla del medio tal como se observa el crecimiento obtenido en los repiques en la Figura 62 de la sección de anexos en el área de Ilustraciones. La glucosa es parte central del metabolismo de los seres vivos y

funciona como una fuente de energía en la generación de adenosín trifosfato (ATP), que es la energía de las células. Asimismo, la glucosa puede entrar en la vía metabólica de las pentosas fosfato, para generar más ATP y también proporcionar la base para la síntesis de ácidos nucleicos y otros compuestos de importancia para el crecimiento celular. Al cambiar esta fuente primordial en el proceso metabólico de un microorganismo, hay que evaluar qué tan bien se adapta a utilizar la nueva fuente de carbono en su metabolismo. La cepa adaptada final fue puesta en evaluación en una fermentación con glicerol crudo en caldo MRS modificado con 1.0 % v/v de glicerol crudo. La fermentación aerobia se realizó a 37 °C y se puede observar la curva de crecimiento en la Figura 29 de la sección de resultados. Se puede observar que la cepa se logró adaptar debido al crecimiento que hubo en la biomasa medida y en el consumo de la glicerina en el medio. Se midieron los siguientes compuestos que fueron generados debido a la fermentación aerobia tales como el ácido láctico, ácido acético y el etanol. Los diferentes productos se deben a que el proceso heterofermentativo de la cepa *L. plantarum* ocurre en condiciones de bajo oxígeno tal como se observa en la Figura 17 de la sección del Marco teórico. Debido a la síntesis de estos productos, el crecimiento de microorganismos y el decaimiento del glicerol crudo, se puede indicar que la cepa *Lactobacillus plantarum* utilizada fue adaptada al glicerol crudo como sustrato.

Cabe resaltar que al observar la Figura 29 en la sección de resultados, se puede evaluar el comportamiento de la curva de crecimiento promedio de las mediciones utilizadas durante la adaptación de la cepa. Se puede evaluar que la fase de crecimiento exponencial de la cepa se da entre las 5 y 10 horas de fermentación. Sin embargo, la sección de crecimiento exponencial es muy corta y la velocidad de crecimiento de la cepa es creciente durante las primeras 2 horas y media y luego es decreciente durante las siguientes 2 horas y media. Asimismo, luego de entrar a la fase de decaimiento o muerte después de las 10 horas, se puede observar que la cepa vuelve a tener una fase de crecimiento hasta llegar a las 24 horas de fermentación. Este comportamiento será explicado a mayor detalle en la sección de la discusión donde se habla sobre el modelo cinético establecido para la fermentación.

Posteriormente, la cepa adaptada fue evaluada por la conversión del glicerol crudo a ácido láctico por medio de la variación de tres parámetros: temperatura, tiempo y concentración de sustrato (glicerol crudo). Los resultados obtenidos se evaluaron por medio de pruebas ANOVA para la conversión de glicerol crudo. Al observar la Tabla 10 en la sección de resultados, se puede observar que el único parámetro que presentó una diferencia significativa en la varianza de los grupos fue la concentración de glicerol. Sin embargo, no se indicaba entre que concentraciones se presentaba dicha variación, para ello fue necesario utilizar la prueba t. En la Tabla 11 de la sección de resultados se puede evaluar que las concentraciones de 0.5 % v/v y 2.0 % v/v de glicerol crudo fueron los grupos que presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre sí. Debido a estos resultados, se procedió a determinar que

la fermentación óptima para poder establecer el modelo cinético se iba a establecer a una concentración de 2.0% v/v. Este parámetro se escogió debido a que era uno de los que presentaban diferencia significativa con el 0.5% y debido a que, al hacer al analizar los metabolitos presentes en la fermentación, se tienen mejores resultados en el equipo de HPLC para poder determinar metabolitos a concentraciones no tan bajas como lo sería con 0.5% v/v de glicerol crudo y los metabolitos generados a partir de este. Asimismo, debido a que en la temperatura y el tiempo de fermentación no presentaron diferencias estadísticamente significativas, se determinó realizar la fermentación a una temperatura de 37 °C que es la temperatura óptima para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* (Alves et al.2018). También se decidió realizar la fermentación durante 48 horas para tener un mayor intervalo de tiempo para evaluarla.

La fermentación para establecer el modelo cinético se realizó con los siguientes parámetros: temperatura de 37 °C, una concentración de glicerol crudo del 2.0 % v/v y se hicieron tomas de mediciones cada 3 horas durante un periodo de 24 horas, realizando una medición final a las 48 horas. Se utilizó el modelo de Contois y Fujimoto para explicar el comportamiento de los genes involucrados en los procesos metabólicos de la reacción. Al utilizar este modelo se pudo llevar a cabo el cálculo de la curva de crecimiento de la reacción. La curva de crecimiento se puede observar en la Figura 31 de la sección de resultados. Asimismo, los resultados del modelo cinético que pronostica la fermentación se presentan en la Tabla 12 de la misma sección. Al observar la gráfica del modelo cinético, se puede ver que las ecuaciones generadas se adaptan a los datos obtenidos experimentalmente. Sin embargo, se decidió analizar la precisión de los modelos por medio de la suma de errores al cuadrado y la raíz de error cuadrado medio. Estos dos permiten establecer un rendimiento del modelo predictivo con los datos reales del proceso.

El primer paso fue establecer el modelo por el cual se iba a analizar la velocidad de reacción. Se escogió el modelo de Contois y Fujimoto. Este es uno de los modelos que es una derivación del modelo de Monod. El tercer parámetro de la ecuación que es la concentración de la biomasa permite un mejor ajuste de las ecuaciones a datos experimentales debido a que se puede tener una inhibición por la concentración de biomasa presente en el medio (Vatcheva et al. 2006). Se estableció la ecuación de velocidad de crecimiento respecto al sustrato tal como se puede observar en la Tabla 12 de la sección de resultados. Esta ecuación permitió establecer la velocidad de crecimiento de la cepa en el medio. Sin embargo, al realizar el modelo se observó que existía una discrepancia en las horas iniciales de la fermentación. Tal como se observa en la Figura 45 en la sección de anexos bajo Datos calculados, donde se aíslan los datos del crecimiento de microorganismos y en la Figura 44 en la sección de anexos también bajo Datos calculados, donde se ve el decaimiento en la concentración de glicerina. En estas gráficas

se puede observar que, al inicio de la fermentación, el crecimiento del microorganismo no tiene una proporción que se pueda relacionar al decaimiento del sustrato.

En este punto cabe destacar que la cepa no utiliza solamente el sustrato al momento de su crecimiento, el medio está enriquecido con otros componentes que son utilizados para el crecimiento de la cepa. Los otros nutrientes presentes son las peptonas y sales que son necesarias para el desarrollo del microorganismo. El sustrato es la fuente de energía principal pero mientras tanto las peptonas proporcionan nutrientes necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas y otras moléculas necesarias para el crecimiento de la cepa. Asimismo, otros compuestos necesarios son el agua, sales y otros compuestos orgánicos presentes en el medio (Sánchez et al. 2010). Generalmente, las bacterias del género *Lactobacillus* utilizan una azúcar como fuente de energía para producir ácido láctico. Al estar adaptada a otro sustrato como lo es la glicerina, la cepa tuvo una menor capacidad de crecimiento que si hubiera utilizado una azúcar. Sin embargo, las peptonas seguían presentes en el medio por lo que se puede asumir que el crecimiento inicial que no está completamente asociado al decaimiento de la glicerina se puede deber a las peptonas del medio. Cabe destacar que, debido a las limitaciones de los equipos de laboratorio disponibles, no se pudo evaluar el comportamiento de las peptonas presentes en el medio durante el transcurso de la fermentación. Pero se decidió establecer un modelo teórico para el consumo de estos debido a que se conocía la concentración inicial de peptonas presentes en el medio, el modelo establecido consistió en el mismo modelo de Contois y Fujimoto que explicaba el comportamiento de la velocidad de crecimiento respecto al consumo de la glicerina.

Con este supuesto en mente, procedemos a explicar el modelo determinado. En la Tabla 12 de la sección de resultados se puede observar un resumen de las ecuaciones para cada componente de la fermentación que fue analizado junto con el modelo teórico de las peptonas. En esta sección se resumen las ecuaciones utilizadas para establecer el modelo cinético, una descripción de la ecuación y un análisis del rendimiento del método predictivo de regresión por medio de la suma de errores cuadrados (SSE) y la raíz de error cuadrado medio (RMSE). Las velocidades de crecimiento mencionadas anteriormente no se pueden analizar por estos métodos debido a que son modelos establecidos. Los modelos que se pueden evaluar por estos métodos son los que pronostican el comportamiento del glicerol, el microorganismo, el ácido láctico, ácido acético y el etanol.

La ecuación que modela el decaimiento de la glicerina tiene un SSE de 0.023 y un RMSE de 0.057. Para poder hacer uso de estos datos, hay que observar los datos de la Tabla 53 en la sección de anexos para poder comparar la magnitud del error con la magnitud de los datos. Se puede ver en la Figura 44 que el modelo logra adaptarse bien a los datos experimentales obtenidos, al comparar el SSE se ve que tiene un valor pequeño al igual que el RMSE. Esto indica que el modelo establecido para pronosticar el comportamiento del glicerol en la reacción

es válido. Ahora al ver la ecuación que modela el comportamiento de la biomasa contra el tiempo, si se observa la Figura 45 en la sección de anexos en los datos calculados, se puede evidenciar que existe el crecimiento no asociado en las primeras 10 horas de la fermentación. Por este motivo se decidió incluir el modelo teórico que explica el consumo de las peptonas que se mencionó anteriormente. El modelo con este supuesto logra adaptarse a los datos experimentales obtenidos con un SSE de 0.003 y un RMSE de 0.021. Esto concuerda con el modelo establecido para la glicerina donde debido a la magnitud de estos dos grupos de datos, se puede indicar que los modelos son válidos para predecir el comportamiento de la fermentación a las condiciones evaluadas.

La ecuación que modela el ácido láctico se encuentra también en la Tabla 12 en la sección de resultados y se puede ver su comportamiento en la Figura 46 en la sección de anexos en los datos calculados. La ecuación para el ácido láctico tuvo un SSE de 0.0207 y un RMSE de 0.0543 que al compararlos con la magnitud de los datos en la Tabla 53 de la sección de anexos, evidencian que es un buen modelo para el pronóstico de los datos experimentales obtenidos. Sin embargo, cabe recalcar el comportamiento que se puede evidenciar en el ácido láctico; tiene un punto máximo y luego empieza a decaer. Esto se puede explicar también viendo el comportamiento del etanol y con los parámetros cinéticos del modelo de Luedeking-Piret. Este es un modelo que explica el crecimiento de células en un medio donde el sustrato es limitado (Sharma et al. 2023). El parámetro no asociativo que se determinó para los tres productos tiene un valor negativo. Este parámetro corresponde al valor del modelo que indica un crecimiento no asociado al sustrato, por lo que se puede indicar que el ácido láctico y el etanol al final de la fermentación dejan de estar asociados al consumo del sustrato. Debido a que el consumo de glicerina disminuye y empieza a disminuir la concentración de ácido láctico y etanol, se puede suponer que el microorganismo está más adepto a consumir los productos debido a que estos ahora tienen una mayor presencia en el medio, pues antes solo había presencia de glicerina y los otros nutrientes. Esto se respalda debido a que este parámetro era el que más se ajustaba al modelo al momento del ajuste de la ecuación a los datos experimentales.

La ecuación que describe el comportamiento de la producción de ácido acético se divide en dos tal como se evidencia en la Tabla 12 de la sección de resultados. Esto se puede explicar debido a la Figura 47 en la sección de anexos, donde se puede evidenciar que hay un crecimiento abrupto durante las primeras 5 horas de la fermentación y luego este se mantiene constante durante el resto de la reacción. Esto se puede deber a la presencia de inhibidores de la síntesis de este producto tal como la presencia de otros compuestos que podrían ser provenientes de las impurezas del glicerol crudo como lo podrían ser el hidróxido de sodio. Cabe destacar, que al dejar el modelo constante después de las 5 horas hizo el SSE de 0.000145 y el RMSE de 0.00455. Al comparar con los datos de la Tabla 53 en la sección de anexos, se pueden ver que

tienen una magnitud mucho menor, por lo que el modelo logra pronosticar de una manera válida el comportamiento de los datos experimentales.

La ecuación que describe el comportamiento de la producción de etanol se puede observar en la Tabla 12 en la sección de resultados. Esto se puede analizar con la Figura 48 en la sección de anexos y los resultados obtenidos de SSE con un valor de 0.00195 y un RMSE de 0.0167 al compararlos con la Tabla 53 en la sección de anexos, se puede ver que el etanol es el producto con menor producción por lo que su magnitud es menor. Esto quiere decir que el modelo no se ajusta tan bien a los datos experimentales a pesar de tener valores pequeños de error. Asimismo, la variación se evidencia en la Figura 48. El comportamiento del etanol es similar al que se comentó para el ácido láctico donde el parámetro no asociativo de Luedeking-Piret tiene un valor negativo, por lo que este al final de la fermentación comienza a disminuir, aunque el etanol tiene un efecto menos predictivo tal y como se evidencia en la ecuación de su modelo.

Al observar los datos obtenidos en la Tabla 13 en la sección de resultados por el modelaje en el software de Berkeley-Madonna se tienen los parámetros cinéticos obtenidos para el modelo cinético propuesto, con un valor de  $1.5 \text{ h}^{-1}$  para la velocidad máxima de crecimiento respecto a la glicerina. Sin embargo, se compara el valor de la constante de saturación media se puede ver que la constante tiene 92, lo que evidencia que tiene una magnitud mucho mayor a la velocidad máxima. Asimismo, la constante de saturación evidencia la afinidad hacia el sustrato; mientras menor sea su valor, más a fin al sustrato es el microorganismo. Esto respalda el hecho de que el microorganismo no prefiere utilizar la glicerina como fuente de energía principal, por lo que el supuesto del uso de las peptonas al inicio es válido. Asimismo, en los modelos de Luedeking-Piret para los productos, se puede ver que el parámetro no asociado para los tres productos tiene un valor negativo tal como se había discutido anteriormente, lo que explica su comportamiento al final de la reacción. Asimismo, el rendimiento del microorganismo por el sustrato es de un valor de -0.22 lo que sigue fundamentando el supuesto de que el microorganismo no acepta tan fácilmente el glicerol, pero debido a su abundancia inicial lo utiliza como fuente de energía hasta que la presencia de otros compuestos aumenta en el medio, o se aprovecha de la presencia de otros nutrientes al inicio como la concentración inicial de peptonas también es abundante.

Por último, se pueden analizar las fases de la curva de crecimiento que se observaron en la curva del modelo cinético establecido por medio de la Figura 32 en la sección de resultados. Se puede evidenciar que después de las 3 horas de la fermentación hasta las 10 horas de fermentación se está en la fase de crecimiento exponencial, pero al final de esta, la velocidad de generación de biomasa está disminuyendo. Finalmente, después de las 20 horas de la fermentación se evidencia la fase estacionaria debido a que no existe una variación en el cambio de la concentración de microorganismos con el tiempo.

## IX. Conclusiones

- Se obtuvo una caracterización de la materia prima, donde se encontraron propiedades del glicerol crudo para poder ser utilizado como sustrato con una concentración de 55.76% (v/v)  $\pm$ 0.4323 de glicerol, 5.403%  $\pm$ 0.1244 (v/v) de metanol, 1.117%  $\pm$ 0.023 (v/v) de agua. Además, se encontró la presencia de heptano, ácidos grasos y ésteres metílicos que provienen de la materia prima utilizada en la reacción de transesterificación. Asimismo, se cuenta con un pH de 11.19  $\pm$ 0.05, una densidad de la solución de 1.02 g/mL  $\pm$ 0.266 y una viscosidad de 92.92 cPs  $\pm$ 0.34.
- Se adaptó la cepa de *Lactobacillus plantarum* al glicerol crudo como sustrato. Se pudo observar que al utilizar una concentración inicial de glicerol del 1.0 % (v/v) en el caldo MRS modificado y una concentración inicial de 0.056 % (m/v) de cepa, se llegó a obtener un crecimiento de hasta 0.156 % (m/v) de la cepa, una concentración residual de glicerol del 0.565 % (m/v) y una síntesis de productos de 0.338 % (m/v) de ácido láctico, 0.186 % (m/v) de etanol y 0.199 % (m/v) de ácido acético.
- Se logró determinar que la variable que tiene una mayor influencia en la conversión de glicerol crudo a ácido láctico es la concentración inicial de glicerol en el medio y se establecieron los parámetros de operación para la fermentación de glicerol crudo con mayor síntesis de ácido láctico por medio de *Lactobacillus plantarum*, siendo estos: una temperatura de 37 °C, un tiempo de fermentación de 48 horas y una concentración inicial de glicerol de 2.0 % (v/v).
- Se planteó un modelo cinético que pronóstica el comportamiento de las especies medidas durante la fermentación de glicerol crudo al 2.0 % (v/v) utilizando *Lactobacillus plantarum* donde se puede destacar la velocidad de crecimiento máxima asociada al glicerol siendo esta de 1.7 h<sup>-1</sup> y con una constante de saturación media para el sustrato de 92, que ejemplifica que la cepa no tiene tanta afinidad por el glicerol crudo del medio.

## **X. Recomendaciones**

- Se recomienda utilizar un glicerol crudo del que se conozcan de los aceites utilizados para su manufactura para así lograr tener los estándares de los ácidos grasos presentes en la mezcla y poder cuantificarlos.
- Se recomienda utilizar concentraciones bajas de glicerol crudo para evitar la interferencia de otros compuestos presentes en la muestra al momento de realizar los medios de cultivo.
- Se recomienda neutralizar el glicerol crudo a utilizar previo a incorporarlo en el caldo fermentativo para evitar la interferencia de otras variables en el crecimiento microbiano o en el desarrollo de la fermentación.
- Se recomienda analizar el efecto del pH durante la fermentación para evaluar si este tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de las otras especies ajenas al ácido láctico que se generan durante la reacción.
- Se recomienda analizar y cuantificar el consumo de las peptonas en el medio para poder estudiar el crecimiento de la cepa al momento de la fermentación.

## XI. Referencias

- Alves, M. P., Melo, M. C., y Almeida, J. P. (2018). Production of lactic acid from glycerol by *Lactobacillus plantarum*: Influence of culture conditions [Producción de ácido láctico a partir de glicerol por *Lactobacillus plantarum*: Influencia de las condiciones de cultivo]. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 20–27. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2008-6>
- Asociación de Combustibles Renovables de Guatemala (s.f.) *Biodiésel*. Recuperado de: <https://acrguatemala.com/biodiesel/>
- Baek, S.-H., Kwon, E. Y., Kim, Y. H., y Hahn, J.-S. (2016). Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [Ingeniería metabólica y evolución adaptativa para la producción eficiente de ácido D-láctico en *Saccharomyces cerevisiae*]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2737–2748. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7431-8>
- Buenemann, T., Oudejans, J. C., Gamba, P., y Rampi, A. (1991). Process for purifying crude glycerol [Proceso para purificar glicerol crudo]. *U.S. Patent No. 4990695*. <https://patents.google.com/patent/US4990695>
- Cardeño, F; Gallego, L y Ríos, L (2011). Refinación de la Fase Glicerina del Biodiésel de Aceite de Palma empleando Ácidos Minerales. *Información tecnológica*, 22(6), 15-24. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642011000600003>
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G.-J. E., y Zeng, A.-P. (2011). Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process [Producción de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* cultivado en glicerol crudo derivado del biodiésel mediante un proceso de fermentación no esterilizado]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 101–112. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3346-8>
- Chen, Y., Yin, Y., y Wang, J. (2021). Comparison of fermentative hydrogen production from glycerol using immobilized and suspended mixed cultures [Comparación de la producción fermentativa de hidrógeno a partir de glicerol utilizando cultivos mixtos inmovilizados y en suspensión]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46, 8986–8994. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.184>
- D'Angelo, G; Ferrari, B; Terré, E y Calzada, J (2022) *Argentina: El 0,2% del cereal mundial se exporta desde la Bolsa de Comercio de Rosario*. [PDF]. Rosario, Argentina: Bolsa de Comercio de Rosario.
- Ertola, R., y Yantorno, O. (2007). *Microbiología industrial: Medio de fermentación*. *BiologíaUnalM*. <https://www.sem microbiologia.org/wp-content/uploads/2020/05/sem-63-microbiologi%CC%81a-Industrial.pdf>

- Fernández-Galiano, M., y Garcia-Morante, J. (2011). Heterolactic fermentation by lactic acid bacteria [Fermentación heteroláctica por bacterias ácido-lácticas]. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00001>
- Gamboa, J., y Lizcano, V. (2013). *Estudio de la fermentación del glicerol crudo para la obtención de ácido láctico empleando Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469: Propuesta preliminar de un modelo cinético*. Tesis, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química.
- Gao, H., Zhang, Y., Chen, L., Zhang, B., Liu, L., Zhang, J., Chen, Y., Wang, J., Liu, Y., y Xu, J. (2019). Production of lactic acid from glycerol by *Lactobacillus plantarum* under different culture conditions [Producción de ácido láctico a partir de glicerol por *Lactobacillus plantarum* bajo diferentes condiciones de cultivo]. *Food and Bioprocess Technology*, 12(12), 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02377-5>
- Garai-Ibabe, G. (2010). *Bacterias lácticas de sidra natural: Implicaciones en alteraciones y potencial probiótico de cepas productoras de (1,3) (1,2)- β-D-glucanos*. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad de Microbiología del Departamento de Química Aplicada.
- García, M., Martínez, M., García, J., y Fernández, J. (2012). Determinación de heptano en glicerol crudo por cromatografía de gases. *Revista de Cromatografía A*, 1258, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.048>
- González, J., Juárez, C., Pérez, M., y García, F. (2015). Producción de ácido láctico a partir de glicerol crudo de la industria del biodiésel utilizando cepas de *Lactobacillus plantarum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 489–498. <https://doi.org/10.24275/rmiq/RIQ0071>
- Gravetter, F., y Wallnau, L. (2022). *Statistics for the behavioral sciences* (12th ed.) [Estadística para las ciencias del comportamiento] Cengage Learning.
- Greasham, R. (1993). Media for microbial fermentation [Medios para la fermentación microbiana]. *Biotechnology*, 7, 128–137. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90062-4)
- Gupta, M., y Kumar, N. (2012). Scope and opportunities of using glycerol as an energy source [Alcance y oportunidades de utilizar glicerol como fuente de energía]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4551–4556. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.010>
- Hejna, A., Kosmela, P., Formela, K., Piszczyk, Ł., y Haponiuk, J. T. (2016). Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives [Aplicaciones potenciales del glicerol crudo en tecnología de polímeros: Estado actual y perspectivas]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 449–475. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.057>
- Hoang, D. (s.f.). Lactic acid bacteria [Bacterias ácido-lácticas]. En *Food science and technology: A series of monographs, textbooks and reference books* (3ra ed., p. 19). Marcel Dekker, Inc.
- Hofvendahl, K., y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources [Factores que afectan la producción fermentativa de ácido láctico a

- partir de recursos renovables]. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00153-5)
- Hong, A., Cheng, K., Peng, F., Zhou, S., Sun, Y., Liu, C., y Liu, D. (2009). Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid [Aislamiento de cepas y optimización de parámetros del proceso para la bioconversión de glicerol a ácido láctico]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84, 1576–1581. <https://doi.org/10.1002/jctb.2161>
- International Energy Agency. (2022). *World energy outlook 2022* [Perspectiva mundial de la energía 2022] (pp. 11–30). International Energy Agency. Paris, Francia.
- Jensen, T. Ø., Kvist, T., Mikkelsen, M. J., Christensen, P. V., y Westermann, P. (2012). Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum* [Fermentación de glicerol crudo derivado de la producción de biodiésel por *Clostridium pasteurianum*]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 709–717. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1128-0>
- Johnson, D., y Taconi, K. (2007). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production [El excedente de glicerina: Opciones para la conversión de valor agregado del glicerol crudo resultante de la producción de biodiésel]. *Environmental Progress*, 26(4), 338–348. <https://doi.org/10.1002/ep.10224>
- Johnson, E. E., y Rehmann, L. (2016). The role of 1,3-propanediol production in fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* [El rol de la producción de 1,3-propanodiol en la fermentación de glicerol por *Clostridium pasteurianum*]. *Bioresource Technology*, 209, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.087>
- Kenar, J. A. (2007). Glycerol as a platform chemical: Sweet opportunities on the horizon? [Glicerol como químico base: ¿Oportunidades dulces en el horizonte?]. *Lipid Technology*, 19, 249–253. <https://doi.org/10.1002/lite.200700066>
- König, H., y Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria [Bacterias ácido-lácticas]. En *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine* (pp. 3–29). Springer.
- Li, C., Gao, S., Yang, X., y Lin, C. S. K. (2018). Green and sustainable succinic acid production from crude glycerol by engineered *Yarrowia lipolytica* via agricultural residue-based in situ fibrous bed bioreactor [Producción verde y sostenible de ácido succínico a partir de glicerol crudo por *Yarrowia lipolytica* ingeniería mediante biorreactor de lecho fibroso in situ basado en residuos agrícolas]. *Bioresource Technology*, 249, 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.094>
- Liu, H., Wang, H., Xu, S., y Zhang, J. (2018). Production of lactic acid from crude glycerol by *Lactobacillus plantarum* in a two-stage fermentation process [Producción de ácido láctico a

- partir de glicerol crudo por *Lactobacillus plantarum* en un proceso de fermentación en dos etapas]. *Bioresource Technology*, 268, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.027>
- Liu, Y., Xu, H., y Zhang, J. (2021). The roles of *Lactobacillus plantarum* in human health [Los roles de *Lactobacillus plantarum* en la salud humana]. *Frontiers in Microbiology*, 12, 770054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.770054>
- Mabutyana, L., y Pott, R. W. (2021). Photo-fermentative hydrogen production by *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 in the presence of inhibitory compounds [Producción de hidrógeno foto-fermentativo por *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 en presencia de compuestos inhibidores]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46, 29088–29099. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.07.208>
- Machado, C. (2010). *Situación de los biocombustibles de 2da y 3era generación en América Latina y Caribe*. OLADE - II.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., y Brock. (2004). *Biología de los microorganismos* (10.ª ed., p. 399). Pearson Prentice Hall.
- Maldonado, O., Rolz, C., y Zambrano, G. (2010). Producción de biodiésel: Estrategias y tecnología. *Revista UVG*, (21), 11–21. Guatemala.
- Mazumdar, S., Blankschien, M. D., Clomburg, J. M., y Gonzalez, R. (2013). Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli* [Síntesis eficiente de ácido L-láctico a partir de glicerol por *Escherichia coli* metabólicamente modificado]. *Microbial Cell Factories*, 12, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-7>
- Moklis, M., Cheng, S., y Cross, J. (2023). Current and future trends for crude glycerol upgrading to high value-added products [Tendencias actuales y futuras para la mejora del glicerol crudo a productos de alto valor añadido]. *Sustainability*, 15(4), 2979. <https://doi.org/10.3390/su15042979>
- Morales, W. (2012). *Obtención de biodiésel con catalizadores sólidos ácidos o superácidos* [Tesis doctoral]. Universidad Tecnológica Nacional. Córdoba.
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., y Lunina, J. N. (2018). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials [Producción de ácido cítrico por levadura *Yarrowia lipolytica* en diferentes materias primas renovables]. *Fermentation*, 4, 36. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020036>
- Nomanbhay, S., Ong, M. Y., Chew, K. W., Show, P.-L., Lam, M. K., y Chen, W.-H. (2020). Organic carbonate production utilizing crude glycerol derived as by-product of biodiesel production: A review [Producción de carbonatos orgánicos utilizando glicerol crudo derivado como subproducto de la producción de biodiésel: Una revisión]. *Energies*, 13, 1483. <https://doi.org/10.3390/en13061483>

- Palomo, M., y Díaz, P. (2012). *Producción biotecnológica de ácido láctico por una cepa nativa de Lactobacillus sp a partir de glicerol crudo proveniente de la industria del biodiésel* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
- Pérez, L., y Redondo, R. (2014). *Producción de glicerina USP* [Proyecto final]. Ingeniería Industrial, Universidad Tecnológica Nacional. Trenque Lauquen.
- Posada, J., y Cardona, C. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la obtención de biodiésel. *Revista de la Facultad de Ciencias Universidad Javeriana*, 14, 9–27.
- Posada, J., Rincón, L., y Cardona, C. (2012). Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem [Diseño y análisis de biorrefinerías basadas en glicerol crudo: Abordando el problema del glicerol]. *Bioresource Technology*, 111, 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.039>
- Prada, Y., Romero, M., Díaz, P., Molina, D., y Guzmán, C. (2012). Lactic acid production by *Lactobacillus sp.* from biodiesel derived raw glycerol [Producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp.* a partir de glicerol crudo derivado de biodiésel]. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(1), 57–65. Recuperado el 29 de octubre de 2021, de [https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-53832012000200005&lng=en&tlng=en](https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-53832012000200005&lng=en&tlng=en)
- Pradima, J., y Kulkarni, M. R. (2017). Review on enzymatic synthesis of value added products of glycerol, a by-product derived from biodiesel production [Revisión sobre la síntesis enzimática de productos de valor añadido a partir de glicerol, un subproducto derivado de la producción de biodiésel]. *Resource-Efficient Technologies*, 3, 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.retrec.2017.11.001>
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2000). *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana.
- Reina, C., Jiménez, L., y Pedraza, N. (2014). Obtención de biodiésel (etil-éster) mediante catálisis básica a nivel planta piloto derivado de aceites usados de la industria alimenticia. *Publicaciones e Investigación*, 8, 99. <https://doi.org/10.22490/25394088.1293>
- Rodrigues, C. V., Santana, K. O., Nespeca, M. G., Rodrigues, A. V., Pires, L. O., y Maintinguer, S. I. (2020). Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes [Valoración energética de glicerol crudo y aguas residuales sanitarias en la generación de hidrógeno mediante procesos biológicos]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 11943–11953. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.154>
- Saini, M., Wang, Z. W., Chiang, C.-J., y Chao, Y.-P. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of n-butanol from crude glycerol [Ingeniería metabólica de *Escherichia coli* para la producción de n-butanol a partir de glicerol crudo]. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 173. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0894-3>

- Samudrala, S. P. (2019). Glycerol transformation to value-added 1,3-propanediol production: A paradigm for a sustainable biorefinery process [Transformación de glicerol en producción de 1,3-propanodiol de valor añadido: Un paradigma para un proceso de biorrefinería sostenible]. In *Glycerine production and transformation—An innovative platform for sustainable biorefinery and energy* (pp. 80–101). BoD—Books on Demand. Norderstedt, Germany.
- Sánchez, A., García, M., García, J., y García, J. (2010). Efecto del sustrato y las peptonas sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo mínimo. *Revista Iberoamericana de Microbiología*, 23(2), 123–130. [https://doi.org/10.1016/S1134-7513\(10\)70023-8](https://doi.org/10.1016/S1134-7513(10)70023-8)
- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J., y Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: Production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein [Metabolismo del glicerol en *Lactobacillus collinoides*: Producción de 3-hidroxipropionaldehído, un precursor de la acroleína]. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00160-1)
- Seguí, L. (s.f.). *Centrifugación a escala de laboratorio* (pp. 2–8). Universitat Politècnica de València. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/183885/Segui%20-%20Centrifugacion%20a%20escala%20de%20laboratorio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Serna, L., y Rodríguez, S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 54–65.
- Sharma, S., Sharma, P., Mishra, V., y Mishra, A. (2023). A modified Luedeking-Piret model for describing the growth of *Lactobacillus plantarum* in a minimal medium [Un modelo de Luedeking-Piret modificado para describir el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en un medio mínimo]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 202–212. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-02320-2>
- Shengjun, H., Xialoan, L., Caixia, W., y Yebo, L. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants [Caracterización de glicerol crudo de plantas de biodiésel]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5915–5921. <https://doi.org/10.1021/jf3008629>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2022). *Fundamentos de química analítica* (11.a ed.). Brooks/Cole.
- SRS International Biodiesel. (2016). *Glycerin specifications* [Especificaciones de glicerina]. [En línea]. Recuperado de <http://www.srsbiodiesel.com/technologies/glycerin-purification/glycerin-specifications>
- Sunhoon, K., Ik-keun, Y., Woo Gi, L., Ho Nam, C., y Yong Keun, C. (2000). High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor [Producción continua a alta tasa de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* en un biorreactor de reciclaje celular de membrana de dos etapas]. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2001), 25–34.

- Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K., y Shen, W. (2009). Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli* [Conversión microbiana de glicerol a 1,3-propanediol por una cepa modificada de *Escherichia coli*]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1628-1634. <https://doi.org/10.1128/AEM.02376-08>
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., y Mas, A. (2003). Effect of temperature on the evolution of a defined population of *Saccharomyces* [Efecto de la temperatura en la evolución de una población definida de *Saccharomyces*]. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00143-7)
- Torroba, A. (2021). *Atlas de los biocombustibles líquidos 2020 – 2021*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Recuperado de <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/18661/BVE21097939e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9ª ed.). Editorial Médica Panamericana, 176-183.
- Varrone, C., Giussani, B., Izzo, G., Massini, G., Marone, A., Signorini, A., y Wang, A. (2012). Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture [Optimización estadística de la producción de biohidrógeno y etanol a partir de glicerol crudo por cultivo microbiano mixto]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16), 16479–16488. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.07.064>
- Vatcheva, I., de Jong, H., Bernard, O., y Mars, N. (2006). Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems [Selección de experimentos para la discriminación de modelos semicuantitativos de sistemas dinámicos]. *Artificial Intelligence*, 170(4-5), 472-506. <https://doi.org/10.1016/j.artint.2005.11.001>
- Vega, M. (2014). *Aprovechamiento de la glicerina por esterificación* [Tesis doctoral, Universidad de Madrid]. s.n.
- Yang, L., Zhang, J., y Wei, W. (2017). A review on the production of lactic acid from glycerol [Una revisión sobre la producción de ácido láctico a partir de glicerol]. *Bioresource Technology*, 244, 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.094>
- Yu, K. O., Kim, S. W., y Han, S. O. (2010). Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* [Ingeniería de la vía de utilización de glicerol para la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*]. *Bioresource Technology*, 101(11), 4157–4161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.031>
- Zheng, Y., Wang, X., Zhang, W., y Lu, J. (2020). *Lactobacillus plantarum*: A versatile probiotic with promising applications in food, medicine, and agriculture [*Lactobacillus plantarum*: Un probiótico versátil con aplicaciones prometedoras en alimentos, medicina y agricultura]. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01354>

## XII. Anexo A. Balances de masa y energía del proceso

En este anexo, se presenta el cálculo de los balances de masa y energía para la fermentación general de la experimentación a una concentración de sustrato de 2.0 % (v/v). Se presentan los cálculos de las entradas y salidas del sistema de fermentación para indicar la conservación de masa y energía en el sistema evaluado.

**Tabla 14**

*Balance de masa de un sistema de fermentación láctica de L. plantarum usando glicerina como sustrato a una concentración de 2.0 % (v/v)*

<b>Entradas</b>
<p><b>Entrada de agua en el medio de cultivo</b></p> $318.17 \text{ mL agua} \left( \frac{1.0 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \right) = 318.17 \text{ g de agua iniciales}$ <p>Este cálculo se realizó para determinar la cantidad de agua inicial que se tenía en el medio de cultivo MRS modificado para la fermentación final del glicerol crudo utilizando un volumen de 330 mL de medio donde el 2% de este era glicerina.</p>
<p><b>Entrada de glicerol crudo en el medio de cultivo</b></p> $330 \text{ mL sol} \left( \frac{2.0 \text{ mL glicerina}}{100 \text{ mL}} \right) \left( \frac{100 \text{ mL glicerol}}{55.775 \text{ mL glicerina}} \right) \left( \frac{1.0185 \text{ g}}{1 \text{ mL glicerol}} \right)$ $= 12.052 \text{ g de glicerol}$
<p><b>Entrada de glicerina en el medio de cultivo</b></p> $12.052 \text{ g de glicerol} \left( \frac{1 \text{ mL glicerol}}{1.0185 \text{ g glicerol}} \right) \left( \frac{55.775 \text{ mL glicerina}}{100 \text{ mL glicerol}} \right) \left( \frac{1.26 \text{ g glicerina}}{1 \text{ mL glicerina}} \right)$ $= 8.316 \text{ g de glicerina}$
<p><b>Entrada de impurezas del glicerol en el medio de cultivo</b></p> $12.052 \text{ g de glicerol} - 8.316 \text{ g de glicerina} = 3.736 \text{ g de impurezas}$ <p>Este cálculo se realizó para determinar la cantidad de compuestos iniciales que se tenía en el medio de cultivo MRS modificado para la fermentación final del glicerol crudo utilizando un volumen de 330 mL de medio se agregaba cierta cantidad del glicerol crudo.</p>
<p><b>Entrada del microorganismo en el medio de cultivo</b></p> $0.1749 \frac{\text{g}}{\text{mL}} * 30 \text{ mL} = 5.247 \text{ g de cepa inicial}$ <p>Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad inicial que se agregó al medio para poder empezar la fermentación que se formó a partir de un inóculo de 24 horas en 30 mL que fueron agregados al volumen inicial de 300 mL.</p>
<p><b>Entrada de peptona en el medio de cultivo</b></p> <p style="text-align: center;">8 gramos de peptona</p>
<p><b>Entrada de otros nutrientes en el medio de cultivo</b></p>

<i>5.7 gramos de nutrientes adicionales</i>
<p><b>Entrada de oxígeno al medio de cultivo durante la fermentación</b></p> $3.116 \text{ g de glicerina rxn } \left( \frac{1 \text{ mol de glicerina}}{92.09 \text{ g de glicerina}} \right) \left( \frac{\frac{3}{2} \text{ mol } O_2}{1 \text{ mol glicerina}} \right) \left( \frac{32 \text{ g } O_2}{1 \text{ mol } O_2} \right)$ $= 1.6242 \text{ g } O_2$ <p>Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad inicial que requería el medio al medio para poder empezar la fermentación que se formó a partir de un inóculo de 24 horas en 30 mL que fueron agregados al volumen inicial de 300 mL.</p>
<b>Salidas</b>
<p><b>Salida de glicerina del medio de cultivo</b></p> <p><i>Conversión * Glicerina inicial = 0.6252559 * 8.316 g de glicerina = 5.1996 g de glicerina</i></p>
<p><b>Salida de biomasa formada en el medio de cultivo</b></p> $0.02979 \frac{\text{g}}{\text{mL}} * 330 \text{ mL} = 9.8307 \text{ g de cepa final}$
<p><b>Salida de producto de ácido láctico</b></p> $\left( 0.0072 \text{ g de ácido } \frac{\text{láctico}}{\text{mL}} \right) (330 \text{ mL de sol}) = 2.376 \text{ g de ácido láctico}$
<p><b>Salida de producto de ácido acético</b></p> $\left( 0.0012488 \text{ g de ácido } \frac{\text{acético}}{\text{mL}} \right) (330 \text{ mL de sol}) = 0.412104 \text{ g de ácido acético}$
<p><b>Salida de producto de etanol</b></p> $\left( 0.000402 \text{ g de } \frac{\text{etanol}}{\text{mL}} \right) (330 \text{ mL de sol}) = 0.13285 \text{ g de etanol}$ <p>Estos cálculos se realizaron por medio de las conversiones obtenidas en HPLC para los productos de la fermentación y el sustrato utilizado junto con la formación de microorganismo.</p>

*Nota.* Elaboración propia.

### **Figura 33**

*Balace de masa de un sistema de fermentación láctica de L. plantarum usando glicerina como sustrato a una concentración de 2.0 % (v/v)*



$$v = \frac{Q_{convectivo}}{Q_{convectivo'}} = \frac{-0.058049 \frac{kJ}{h}}{-\frac{936kJ}{m^2}} = 6.2018 * \frac{10^{-5}m^2}{h}$$

*Nota.* Elaboración propia.

### XIII. Anexo B. Datos originales

En este anexo, se presenta una colección de todos los datos recolectados durante la experimentación. Primero, se presentan los datos obtenidos para caracterizar el glicerol crudo. Después, se presentan los datos de las corridas realizadas para evaluar la adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* al nuevo sustrato. Posteriormente, se presentan los gráficos de los datos mencionados anteriormente. Por último, se presentan los datos y gráficos de las fermentaciones realizadas.

**Tabla 15**

*Medición de la densidad del glicerol crudo a 24 °C*

No.	Peso total (g) ±0.1 g	Peso glicerol (g) ±	Volumen glicerol (mL) ± 0.4 mL	Densidad (g/mL)
1	134.8	50.9	50	1.018
2	134.9	51	50	1.02
3	134.6	50.7	50	1.014
4	135	51.1	50	1.022

*Nota.* Elaboración propia

**Tabla 16**

*Medición del pH de una solución del glicerol crudo*

No.	Peso glicerol (g) ±0.1 g	Volumen (mL) ±0.4 mL	Concentración (g/mL)	pH
1	1.09	50	0.0218	11.2
2	1.1	50	0.022	11.17
3	1.1	50	0.022	11.2
4	1	50	0.02	11.17

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 17**

*Medición del porcentaje de agua en el glicerol crudo*

No.	Porcentaje de agua (%) ±0.05 %
1	1.09%
2	1.13%

3	1.13%
---	-------

*Nota.* Elaboración propia

**Tabla 18**

*Medición de los compuestos presentes en el glicerol crudo por medio de HPLC*

No.1	Glicerina (% v/v) (Dilución 1/100)	Glicerina (% v/v)	Metanol (% v/v)
1	0.536	53.6	5.5
2	0.551	55.1	5.2
3	0.573	57.3	5.5
4	0.571	57.1	5.4

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 19**

*Medición de la viscosidad del glicerol crudo*

No.	Viscosidad (cPs) $\pm 0.05$ cpS
1	92.76
2	93.07
3	92.93

*Nota.* Elaboración propia.

## Figura 35

### Identificación de componentes del glicerol crudo por medio de cromatografía de gases

LIQA Library Search Report

Data Path : C:\msdchem\1\DATA\Ing Quimica\2023\  
Data File : 230712-0001.D  
Title :  
Acq On : 12 Jul 2023 10:38  
Operator : AdeM  
Sample : TDG 140  
Misc : IQ  
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST05a.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
Integration Events: ChemStation Integrator - events.e

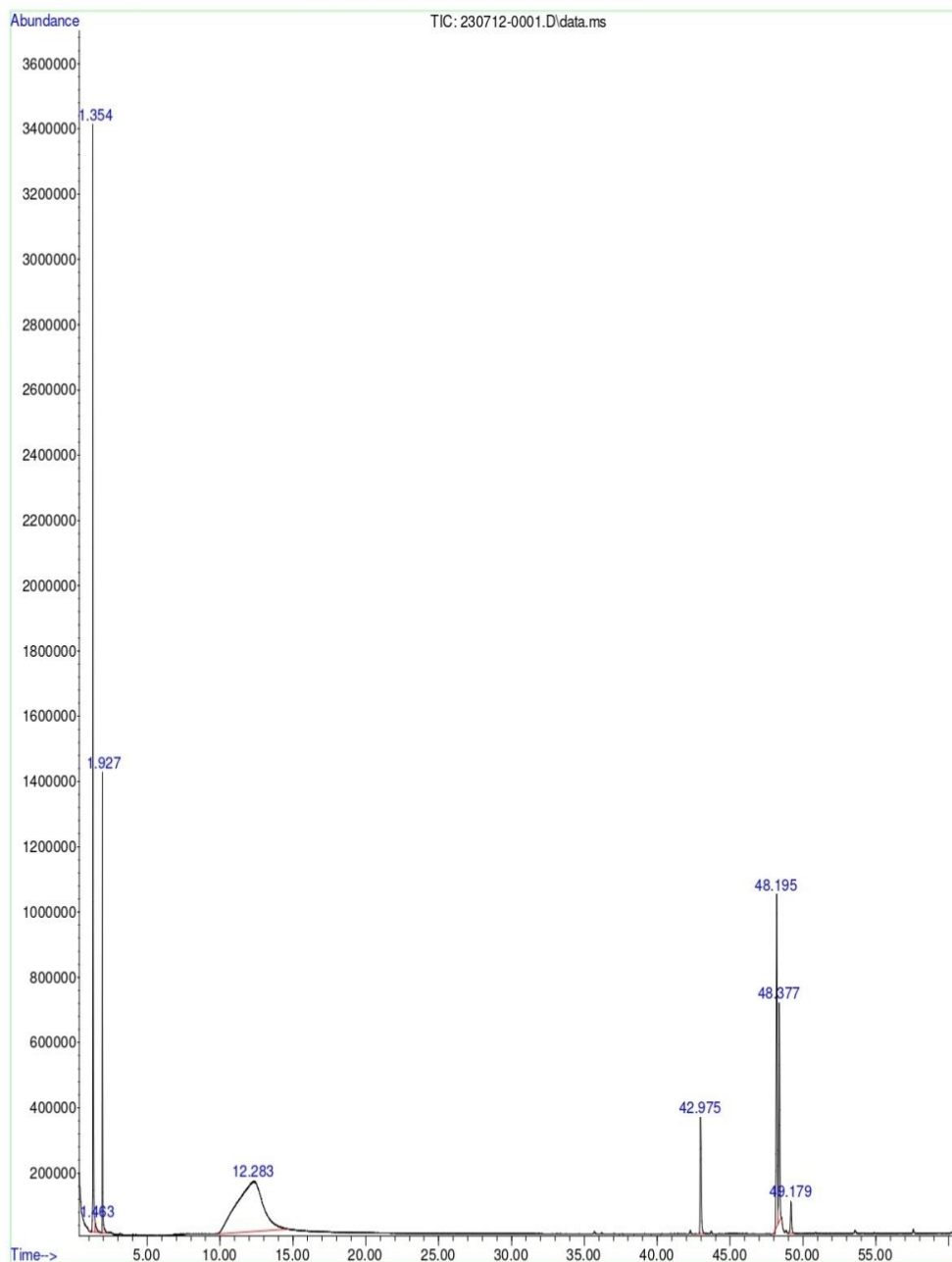
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.352	14.11	C:\Database\NIST05a.L			
			Methyl formate	259	000107-31-3	56
			Acetaldehyde, hydroxy-	262	000141-46-8	39
			Methyl Alcohol	29	000067-56-1	39
2	1.466	0.50	C:\Database\NIST05a.L			
			Acetaldehyde, hydroxy-	262	000141-46-8	9
			Formic acid, ethyl ester	802	000109-94-4	9
			Glycolaldehyde dimer	8943	023147-58-2	9
3	1.925	5.77	C:\Database\NIST05a.L			
			Heptane	3886	000142-82-5	95
			Heptane	3885	000142-82-5	95
			Heptane	3887	000142-82-5	91
4	12.282	51.88	C:\Database\NIST05a.L			
			Glycerin	2367	000056-81-5	83
			Glycerin	2368	000056-81-5	83
			Glycerin	2366	000056-81-5	40
5	42.977	4.91	C:\Database\NIST05a.L			
			Hexadecanoic acid, methyl ester	105639	000112-39-0	98
			Hexadecanoic acid, methyl ester	105644	000112-39-0	97
			Hexadecanoic acid, methyl ester	105646	000112-39-0	95
6	48.194	12.77	C:\Database\NIST05a.L			
			9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	121093	002462-85-3	99
			9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	121105	000112-63-0	99
			9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester, (Z,Z)-	121114	017309-05-6	99
7	48.376	8.59	C:\Database\NIST05a.L			
			9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	122323	000112-62-9	99
			9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	122321	000112-62-9	99
			8-Octadecenoic acid, methyl ester	122297	002345-29-1	99
8	49.181	1.47	C:\Database\NIST05a.L			
			Octadecanoic acid, methyl ester	123709	000112-61-8	98
			Octadecanoic acid, methyl ester	123700	000112-61-8	98
			Octadecanoic acid, methyl ester	123708	000112-61-8	97

Nota. Elaboración propia.

**Figura 36**

*Cromatograma de masas del glicerol crudo*

File :C:\msdchem\1\DATA\Ing Quimica\2023\230712-0001.D  
Operator : AdeM  
Acquired : 12 Jul 2023 10:38 using AcqMethod PIROLISIS MATERIA LIQUIDA HP5 SCAN.M  
Instrument : GC-MSD  
Sample Name: TDG 140  
Misc Info : IQ  
Vial Number: 1



*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 20**

*Datos de la primera corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%v/v)</b>	<b>Ácido láctico (%m/v)</b>	<b>Etanol (%v/v)</b>	<b>Ácido acético (%m/v)</b>
0	1.2412	0.026701753	0.01049544	0.021748153
3	0.56033499	0.35085635	0.11593187	0.21407679
6	0.530657422	0.35306053	0.12616974	0.21971409
7.5	0.540979854	0.35667425	0.12366671	0.22381715
9	0.421302286	0.34071007	0.16770043	0.22285051
10.5	0.461624718	0.32411035	0.24876145	0.20805894
24	0.41194715	0.34105192	0.24602966	0.19781591

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 21**

*Datos de la primera corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Volumen (mL) ± 0.5 mL</b>	<b>Peso bala vacía (g) ± 0.001 g</b>	<b>Peso bala con pellet (g) ± 0.001 g</b>
0	9	7.404	7.406
3	9	7.375	7.378
6	10.5	7.385	7.437
7.5	9.75	7.311	7.388
9	10	7.461	7.607
10.5	9.5	7.182	7.292
24	10	7.316	7.466

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 22**

*Datos de la segunda corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%v/v)</b>	<b>Ácido láctico (%m/v)</b>	<b>Etanol (%v/v)</b>	<b>Ácido acético (%m/v)</b>
0	1.260474	0.028909716	0.0980408	0.021133068
3	0.56069624	0.35752332	0.12197284	0.2202816

6	0.53380762	0.36268848	0.11805596	0.2263932
7.5	0.546919	0.36453076	0.12735844	0.22438504
9	0.42003038	0.34117864	0.2148652	0.2257222
10.5	0.45314176	0.33650804	0.27085652	0.20870916
24	0.39936452	0.34875588	0.22042856	0.20922572

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 23**

*Datos de la segunda corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

Tiempo (h)	Volumen (mL) $\pm$ 0.5 mL	Peso bala vacía (g) $\pm$ 0.001 g	Peso bala con pellet (g) $\pm$ 0.001 g
0	9	7.401	7.404
3	9	7.415	7.419
6	10.25	7.264	7.326
7.5	9.75	7.186	7.298
9	10.3	7.345	7.484
10.5	10.3	7.421	7.543
24	10	7.257	7.383

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 24**

*Datos de la tercer corrida para calcular la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

Tiempo (h)	Glicerol (%v/v)	Ácido láctico (%m/v)	Etanol (%v/v)	Ácido acético (%m/v)
0	1.33042	0.030944955	0.010223063	0.020577695
3	0.6698157	0.33412376	0.12089875	0.20558179
6	0.617113932	0.33875061	0.11365364	0.21123241
7.5	0.634412163	0.333011594	0.1351442	0.21168505
9	0.59217104	0.31471887	0.19847362	0.21786703
10.5	0.569008627	0.31702676	0.22398136	0.18919778
24	0.53360509	0.32570687	0.24019727	0.19221251

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 25**

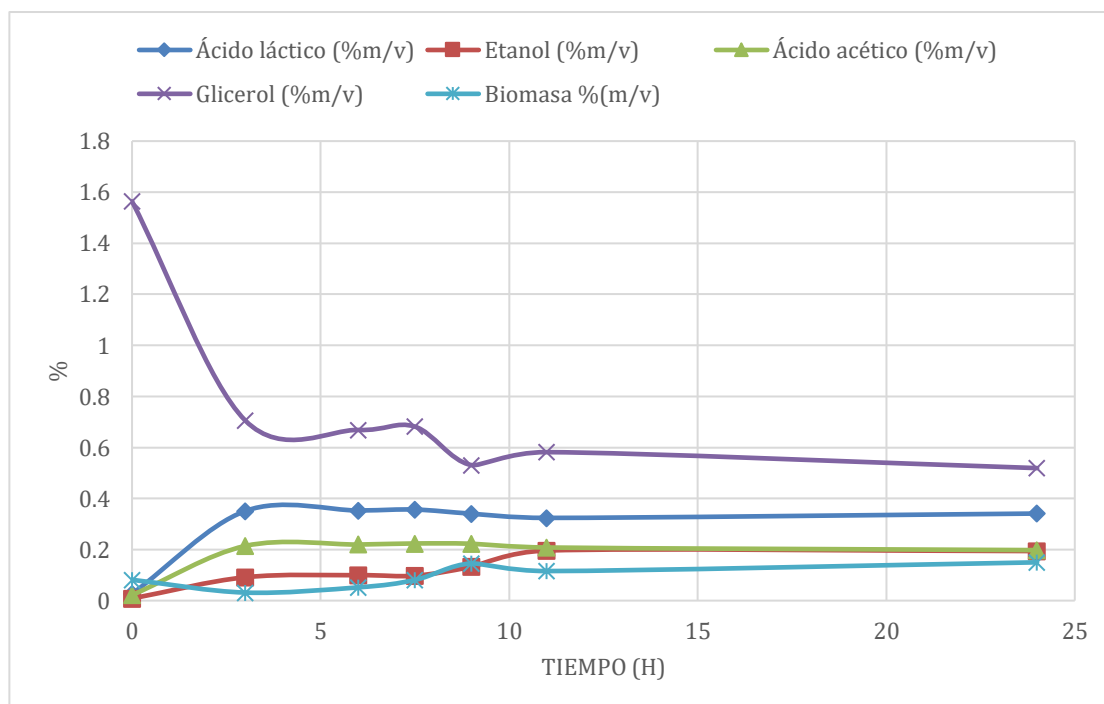
*Datos de la tercer corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

Tiempo (h)	Volumen (mL) ± 0.5 mL	Peso bala vacía (g) ± 0.001 g	Peso bala con pellet (g) ± 0.001 g
0	9	7.403	7.405
3	9	7.284	7.287
6	10.25	7.206	7.308
7.5	9.75	7.190	7.306
9	10.3	7.317	7.471
10.5	10.5	7.220	7.348
24	10	7.275	7.469

Nota. Elaboración propia.

**Figura 37**

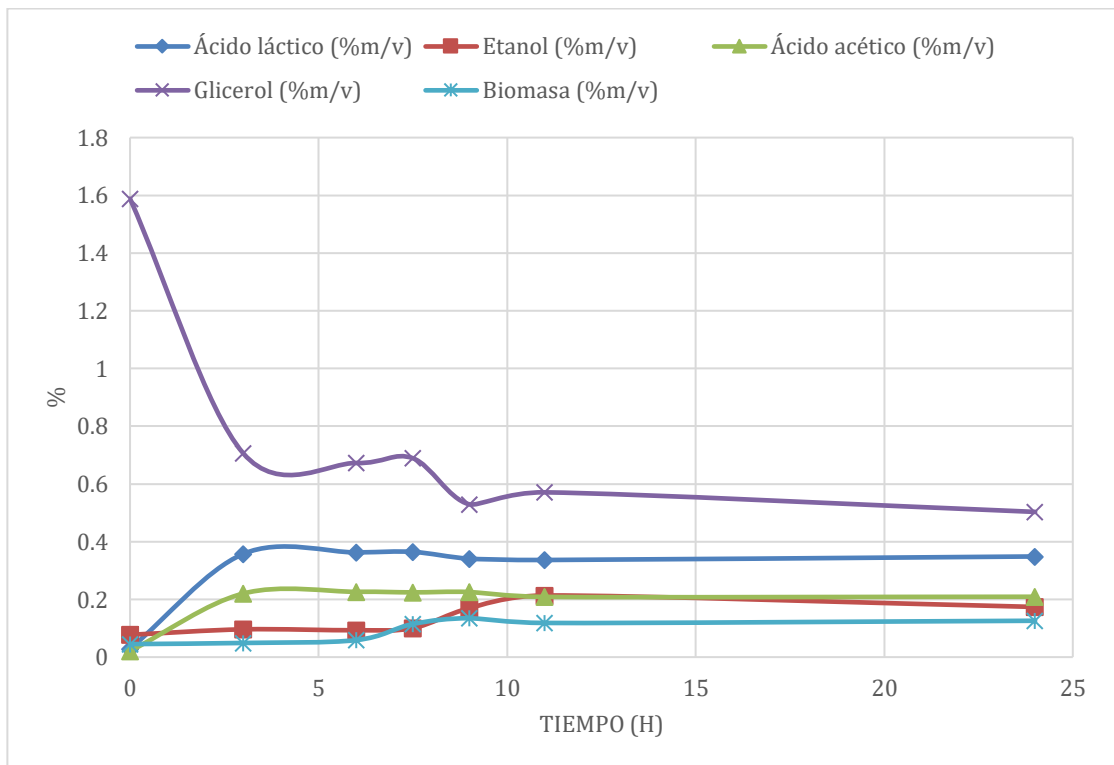
*Curva de crecimiento de la primera corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa Lactobacillus plantarum adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo*



Nota. Elaboración propia.

**Figura 38**

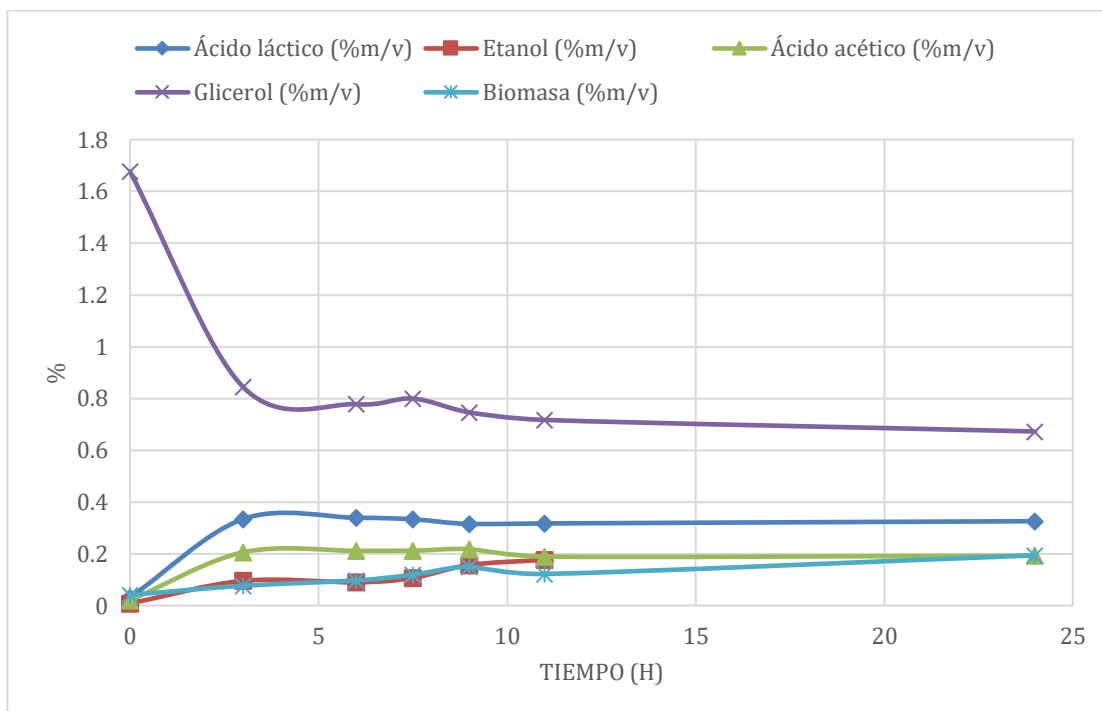
*Curva de crecimiento de la segunda corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo*



*Nota.* Elaboración propia.

**Figura 39**

Curva de crecimiento de la tercer corrida de la fermentación a 37 °C con la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada a una concentración de 1% (v/v) de glicerina del glicerol crudo



Nota. Elaboración propia.

**Tabla 26**

Datos de la primer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de *Lactobacillus plantarum*

Glicerina inicial (%v/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (hr)	Ácido láctico (%v/v)	Glicerol (%v/v)
0.53%	30	24	0.0924%	0.3655%
0.50%	30	24	0.0542%	0.3797%
0.52%	30	24	0.0733%	0.3726%
0.50%	37	24	0.2342%	0.2136%
0.53%	37	24	0.2652%	0.2034%
0.52%	37	24	0.2497%	0.2085%
0.50%	42	24	0.1424%	0.2923%
0.53%	42	24	0.1453%	0.2702%
0.52%	42	24	0.1439%	0.2812%

0.53%	30	48	0.1124%	0.3616%
0.50%	30	48	0.1059%	0.3494%
0.52%	30	48	0.1092%	0.3555%
0.50%	37	48	0.1295%	0.3496%
0.53%	37	48	0.1562%	0.3442%
0.52%	37	48	0.1429%	0.3469%
0.53%	42	48	0.1897%	0.2761%
0.50%	42	48	0.1974%	0.2456%
0.52%	42	48	0.1936%	0.2609%

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 27**

*Datos de la segunda concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de Lactobacillus plantarum*

<b>Glicerina inicial (%v/v)</b>	<b>Temperatura de fermentación (°C)</b>	<b>Tiempo de fermentación (hr)</b>	<b>Ácido láctico (%v/v)</b>	<b>Glicerol (%v/v)</b>
0.89%	30	24	0.5124%	0.2138%
1%	30	24	0.9066%	0.1835%
1.09%	30	24	0.7095%	0.1987%
1%	37	24	0.4236%	0.4979%
0.89%	37	24	0.3166%	0.5362%
0.94%	37	24	0.3701%	0.5170%
1%	42	24	0.3462%	0.5442%
0.89%	42	24	0.3126%	0.4741%
0.94%	42	24	0.3294%	0.5092%
1%	30	48	0.5342%	0.3437%
0.89%	30	48	0.4211%	0.3676%
0.94%	30	48	0.4776%	0.3556%
0.89%	37	48	0.3295%	0.5121%
1%	37	48	0.4244%	0.5440%
0.94%	37	48	0.3769%	0.5280%
0.89%	42	48	0.1652%	0.6757%
1%	42	48	0.2356%	0.6932%
0.94%	42	48	0.2004%	0.6845%

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 28**

*Datos de la tercer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de Lactobacillus plantarum*

Glicerina inicial (%v/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (hr)	Ácido láctico (%v/v)	Glicerol (%v/v)
1.54%	30	24	0.6421%	0.7611%
2%	30	24	0.7592%	0.7605%
1.77%	30	24	0.7007%	0.7608%
2%	37	24	0.8324%	0.7978%
1.54%	37	24	0.6456%	0.8478%
1.77%	37	24	0.7390%	0.8228%
2%	42	24	0.6819%	0.9505%
1.54%	42	24	0.3563%	0.9513%
1.77%	42	24	0.5191%	0.9509%
1.54%	30	48	0.6536%	0.7560%
2%	30	48	0.7924%	0.7728%
1.77%	30	48	0.8725%	0.7644%
1.54%	37	48	0.5431%	0.8989%
2%	37	48	1.1092%	0.8596%
1.77%	37	48	0.8262%	0.8793%
2%	42	48	0.9274%	0.5177%
1.54%	42	48	0.6712%	0.5041%
1.77%	42	48	0.7993%	0.5109%

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 29**

*Datos de la primera corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

Tiempo (h)	Glicerol (%v/v)	Ácido láctico (%m/v)	Etanol (%v/v)	Ácido acético (%m/v)
0	1.98332	0	0	0
3	1.85968	0.32241	0	0.102089228
6	1.73264	0.45812	0	0.114479703
9	1.68342	0.53281	0	0.113289989
12	1.62809	0.6532	0.167975	0.118853865

24	1.3685	0.74321	0.149348	0.120959865
48	1.16371	0.76232	0	0.123272955

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 30**

*Datos de la primera corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

Tiempo (h)	Volumen (mL) $\pm 0.5$ mL	Peso bala vacía (g) $\pm$ 0.001 g	Peso bala con pellet (g) $\pm 0.001$ g
0	10	7.131	7.287
3	10	7.150	7.278
6	8	7.110	7.230
9	8	7.048	7.191
12	10	7.161	7.376
24	10	7.153	7.353
48	10	7.383	7.580

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 31**

*Datos de la segunda corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

Tiempo (h)	Glicerol (%v/v)	Ácido láctico (%m/v)	Etanol (%v/v)	Ácido acético (%m/v)
0	2.06055	0	0	0
3	2.02434	0.3124	0.128277	0.145788
6	1.85968	0.44214	0	0.1688952
9	1.66605	0.5523	0.177811	0.1565544
12	1.49668	0.59983	0	0.1504152
24	1.48375	0.664324	0	0.14920248
48	1.33971	0.69123	0	0.13217568

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 32**

*Datos de la segunda corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Volumen (mL) ± 0.5 mL</b>	<b>Peso bala vacía (g) ± 0.001 g</b>	<b>Peso bala con pellet (g) ± 0.001 g</b>
0	10	7.131	7.287
3	10	7.092	7.242
6	8	7.220	7.387
9	8	7.091	7.267
12	10	7.202	7.398
24	10	7.200	7.466
48	10	7.334	7.481

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 33**

*Datos de la tercer corrida para monitorear la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%v/v)</b>	<b>Ácido láctico (%m/v)</b>	<b>Etanol (%v/v)</b>	<b>Ácido acético (%m/v)</b>
0	1.96423	0	0	0
3	1.85968	0.29412	0	0.10312234
6	1.71614	0.379324	0	0.11428777
9	1.53571	0.53255	0.0612799	0.1060307
12	1.53453	0.667124	0	0.12296236
24	1.48245	0.69245	0.140048	0.1210757
48	1.25318	0.71234	0.153079	0.1192091

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 34**

*Datos de la tercer corrida para determinar la biomasa generada por medio de peso seco del crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Volumen (mL) ± 0.5 mL</b>	<b>Peso bala vacía (g) ± 0.001 g</b>	<b>Peso bala con pellet (g) ± 0.001 g</b>
0	10	7.131	7.287
3	10	7.139	7.289
6	8	7.161	7.331
9	8	7.199	7.359
12	10	7.239	7.468
24	10	7.190	7.343
48	10	7.175	7.300

*Nota.* Elaboración propia.

## XIV. Anexo C. Datos calculados

En este anexo, se presenta una colección de todos los datos calculados por medio del Anexo B. Primero, se presentan los datos calculados para caracterizar el glicerol crudo. Después, se presentan los datos de las corridas realizadas para evaluar la adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* al nuevo sustrato y el promedio de las corridas. Posteriormente, se presentan los análisis ANOVA, la prueba F y la prueba t para determinar la variable que causaba un cambio significativo en la síntesis de ácido láctico. Luego, se presentan los gráficos que representan los grupos de datos mencionados anteriormente. Por último, se presentan los cuadros de la suma de errores al cuadrado para establecer la precisión del modelo cinético generado.

**Tabla 35**

*Estadística descriptiva de los parámetros fisicoquímicos medidos para la caracterización del glicerol crudo*

	<b>Glicerina %(v/v)</b>	<b>Metanol % (v/v)</b>	<b>Agua % (v/v)</b>	<b>Densidad (g/mL)</b>	<b>Viscosidad (cPs)</b>	<b>pH</b>
Promedio	55.775	5.4	0.011166667	1.0185	92.92	11.185
Desviación estándar	1.757602534	0.141421356	0.00023094	0.00341565	0.155241747	0.017320508
Varianza	3.089166667	0.02	0.00000005	0.0000117	0.0241	0.0003

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 36**

*Datos calculados de la primera corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%m/v)</b>	<b>Etanol (%m/v)</b>	<b>Biomasa (%m/v)</b>
0	1.563912	0.008280902	0.081536364
3	0.706022087	0.091470245	0.031444444
6	0.668628352	0.099547925	0.052
7.5	0.681634616	0.097573034	0.081
9	0.53084088	0.132315639	0.146
11	0.581647145	0.196272784	0.115789
24	0.519053409	0.194117402	0.15

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 37**

Datos calculados de la segunda corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo

Tiempo (h)	Glicerol (%m/v)	Etanol (%m/v)	Biomasa (%m/v)
0	1.58819724	0.077354191	0.045235
3	0.706477262	0.096236571	0.04912
6	0.672597601	0.093146152	0.059047
7.5	0.68911794	0.100485809	0.11487
9	0.529238279	0.169528643	0.13495
11	0.570958618	0.213705794	0.1184466
24	0.503199295	0.173918134	0.126

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 38**

Datos calculados de la tercer corrida para determinar la curva de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo

Tiempo (h)	Glicerol (%m/v)	Etanol (%m/v)	Biomasa (%m/v)
0	1.6763292	0.008065997	0.04112
3	0.843967782	0.095389114	0.07623
6	0.777563554	0.089672722	0.09714
7.5	0.799359326	0.106628774	0.11897
9	0.74613551	0.156595686	0.14951456
11	0.71695087	0.176721293	0.1219047
24	0.672342413	0.189515646	0.194

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 39**

Promedio de los datos calculados para determinar la curva de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo

Tiempo (h)	Glicerol (%v/v)	Ácido láctico (%m/v)	Etanol (%v/v)	Ácido acético (%m/v)	Glicerol (%m/v)	Etanol (%m/v)	Biomasa (%m/v)
0	1.277364667	0.028852141	0.039586434	0.021152972	1.60947948	0.031233697	0.055963788
3	0.596948977	0.347501143	0.119601153	0.213313393	0.752155711	0.09436531	0.052264815
6	0.560526325	0.351499873	0.119293113	0.219113233	0.706263169	0.094122266	0.069395667
7.5	0.574103672	0.351405535	0.128723117	0.219962413	0.723370627	0.101562539	0.104946667
9	0.477834569	0.332202527	0.19367975	0.22214658	0.602071556	0.152813323	0.143488187

11	0.494591702	0.325881717	0.247866443	0.201988627	0.623185544	0.195566624	0.118713433
24	0.448305587	0.33850489	0.23555183	0.19975138	0.564865039	0.185850394	0.156666667

**Tabla 40**

*Datos calculados de la primer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de Lactobacillus plantarum*

Glicerina inicial (%v/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (hr)	Ácido láctico (%m/v)	Glicerina restante (%m/v)	Glicerina consumida (%m/v)	% de conversión de glicerol	% de rendimiento de ácido láctico
0.53%	30	24	0.11%	0.4605%	0.2134%	0.3990	51.96%
0.50%	30	24	0.07%	0.4784%	0.1516%	0.3031	42.91%
0.52%	30	24	0.09%	0.4695%	0.1825%	0.3527	48.21%
0.50%	37	24	0.28%	0.2691%	0.3609%	0.7217	77.88%
0.53%	37	24	0.32%	0.2563%	0.4177%	0.7809	76.19%
0.52%	37	24	0.30%	0.2627%	0.3893%	0.7523	76.98%
0.50%	42	24	0.17%	0.3682%	0.2618%	0.5235	65.29%
0.53%	42	24	0.17%	0.3404%	0.3335%	0.6236	52.28%
0.52%	42	24	0.17%	0.3543%	0.2976%	0.5752	58.00%
0.53%	30	48	0.13%	0.4556%	0.2184%	0.4083	61.76%
0.50%	30	48	0.13%	0.4402%	0.1898%	0.3796	66.96%
0.52%	30	48	0.13%	0.4479%	0.2041%	0.3944	64.18%
0.50%	37	48	0.16%	0.4405%	0.1895%	0.3791	82.01%
0.53%	37	48	0.19%	0.4337%	0.2402%	0.4491	78.04%
0.52%	37	48	0.17%	0.4371%	0.2149%	0.4153	79.79%
0.53%	42	48	0.23%	0.3479%	0.3261%	0.6096	69.82%
0.50%	42	48	0.24%	0.3094%	0.3206%	0.6411	73.90%
0.52%	42	48	0.23%	0.3287%	0.3233%	0.6248	71.84%

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 41**

*Datos calculados de la segunda concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de Lactobacillus plantarum*

Glicerina inicial (%v/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (hr)	Ácido láctico (%m/v)	Glicerina restante (%m/v)	Glicerina consumida (%m/v)	% de conversión de glicerol	% de rendimiento de ácido láctico
0.89%	30	24	0.61%	0.2694%	0.8460%	0.9557	72.67%
1%	30	24	1.09%	0.2312%	1.4068%	1.0821	77.33%
1.09%	30	24	0.85%	0.2503%	1.1264%	1.0309	75.58%
1%	37	24	0.51%	0.6274%	0.6326%	0.6326	80.34%

0.89%	37	24	0.38%	0.6755%	0.4399%	0.4969	86.37%
0.94%	37	24	0.44%	0.6515%	0.5363%	0.5689	82.81%
1%	42	24	0.42%	0.6857%	0.5743%	0.5743	72.34%
0.89%	42	24	0.38%	0.5974%	0.5180%	0.5852	72.40%
0.94%	42	24	0.40%	0.6415%	0.5462%	0.5794	72.37%
1%	30	48	0.64%	0.4330%	0.8270%	0.8270	77.52%
0.89%	30	48	0.51%	0.4632%	0.6523%	0.7368	77.46%
0.94%	30	48	0.57%	0.4481%	0.7396%	0.7846	77.49%
0.89%	37	48	0.40%	0.6452%	0.4702%	0.5311	84.10%
1%	37	48	0.51%	0.6855%	0.5745%	0.5745	88.63%
0.94%	37	48	0.45%	0.6653%	0.5224%	0.5542	86.59%
0.89%	42	48	0.20%	0.8514%	0.2640%	0.2982	75.11%
1%	42	48	0.28%	0.8735%	0.3865%	0.3865	73.15%
0.94%	42	48	0.24%	0.8624%	0.3253%	0.3451	73.94%

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 42**

*Datos calculados de la tercer concentración de glicerina utilizada para la fermentación de glicerol crudo utilizando la cepa adaptada de Lactobacillus plantarum*

Glicerina inicial (%v/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (hr)	Ácido láctico (%m/v)	Glicerina restante (%m/v)	Glicerina consumida (%m/v)	% de conversión de glicerol	% de rendimiento de ácido láctico
1.54%	30	24	0.77%	0.9590%	0.9815%	0.6373	78.51%
2%	30	24	0.91%	0.9583%	1.5617%	0.7809	58.34%
1.77%	30	24	0.84%	0.9587%	1.2716%	0.7184	66.12%
2%	37	24	1.00%	1.0053%	1.5147%	0.7574	65.95%
1.54%	37	24	0.77%	1.0682%	0.8723%	0.5664	88.81%
1.77%	37	24	0.89%	1.0367%	1.1935%	0.6743	74.30%
2%	42	24	0.82%	1.1976%	1.3224%	0.6612	61.88%
1.54%	42	24	0.43%	1.1987%	0.7418%	0.4817	57.64%
1.77%	42	24	0.62%	1.1981%	1.0321%	0.5831	60.35%
1.54%	30	48	0.78%	0.9526%	0.9879%	0.6415	79.39%
2%	30	48	0.95%	0.9737%	1.5463%	0.7732	61.49%
1.77%	30	48	1.05%	0.9631%	1.2671%	0.7159	82.63%
1.54%	37	48	0.65%	1.1326%	0.8079%	0.5246	80.66%
2%	37	48	1.33%	1.0831%	1.4369%	0.7184	92.64%
1.77%	37	48	0.99%	1.1079%	1.1224%	0.6341	88.33%
2%	42	48	1.11%	0.6523%	1.8677%	0.9338	59.59%
1.54%	42	48	0.81%	0.6352%	1.3053%	0.8475	61.71%
1.77%	42	48	0.96%	0.6438%	1.5865%	0.8963	60.46%

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 43**

*Análisis ANOVA de un factor para la variable de la concentración de glicerina en la fermentación de glicerol crudo por medio de Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0,50%	18	9.333194467	0.518510804	0.02256514		
1,0%	18	11.54415108	0.641341726	0.0494884		
2,0%	18	12.54596705	0.696998169	0.01498468		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.30025689	2	0.150128445	5.17456953	0.00899339	3.178799292
Dentro de los grupos	1.479649783	51	0.029012741			
Total	1.779906672	53				

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 44**

*Análisis ANOVA de un factor para la variable de la temperatura en la fermentación de glicerol crudo por medio de Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
30°C	18	11.9213419	0.662296772	0.05821559		
37°C	18	10.73180027	0.596211126	0.01462364		
42°C	18	10.77017042	0.598342801	0.02887459		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.050771803	2	0.025385901	0.74874493	0.47808681	3.178799292
Dentro de los grupos	1.729134869	51	0.033904605			
Total	1.779906672	53				

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 45**

*Análisis ANOVA de un factor para la variable del tiempo en la fermentación de glicerol crudo por medio de Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
24 hrs	27	17.39868352	0.644395686	0.03347574		
48 hrs	27	16.02462907	0.593504781	0.03363746		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.034963437	1	0.034963437	1.04192429	0.31209995	4.0266314
Dentro de los grupos	1.744943235	52	0.033556601			
Total	1.779906672	53				

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 46**

*Prueba F para varianza de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

<i>No hay evidencia</i>	0,50%	1,0%
Media	0.5185108	0.64134173
Varianza	0.0225651	0.0494884
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	0.4559684	
P(F<=f) una cola	0.0575286	
Valor crítico para F (una cola)	0.4401616	
<i>Iguales</i>	0,50%	2,0%
Media	0.5185108	0.69699817
Varianza	0.0225651	0.01498468
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	1.5058805	
P(F<=f) una cola	0.2036067	
Valor crítico para F (una cola)	2.2718929	
<i>Desiguales</i>	1,0%	2,0%
Media	0.6413417	0.69699817
Varianza	0.0494884	0.01498468
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	3.3025986	
P(F<=f) una cola	0.0091096	
Valor crítico para F (una cola)	2.2718929	

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 47**

*Prueba t suponiendo varianzas iguales de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

	0,50%	1,0%
Media	0.5185108	0.64134173
Varianza	0.0225651	0.0494884
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	0.0360268	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-1.9414057	
P(T<=t) una cola	0.030267	
Valor crítico de t (una cola)	1.6909243	
P(T<=t) dos colas	0.060534	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0322445	

	0,50%	2,0%
Media	0.5185108	0.69699817
Varianza	0.0225651	0.01498468
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	0.0187749	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-3.9078669	
P(T<=t) una cola	0.0002107	
Valor crítico de t (una cola)	1.6909243	
P(T<=t) dos colas	0.0004213	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0322445	

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 48**

*Prueba t suponiendo varianzas desiguales de dos muestras entre las concentraciones de glicerina en la fermentación de glicerol crudo usando Lactobacillus plantarum para la síntesis de ácido láctico*

	1,0%	2,0%
Media	0.6413417	0.69699817
Varianza	0.0494884	0.01498468
Observaciones	18	18
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	26	
Estadístico t	-0.9299562	
P(T<=t) una cola	0.1804742	
Valor crítico de t (una cola)	1.7056179	
P(T<=t) dos colas	0.3609483	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0555294	

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 49**

*Datos calculados para la primera corrida de la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

Tiempo (h)	Glicerol (%m/v)	Etanol (%m/v)	Biomasa (%m/v)
0	2.4989832	0	0.021272727
3	2.3431968	0	0.192
6	2.1831264	0	0.225
9	2.1211092	0	0.268125
12	2.0513934	0.132532275	0.3225
24	1.72431	0.117835572	0.3
48	1.4662746	0	0.2955

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 50**

*Datos calculados para la segunda corrida de la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%m/v)</b>	<b>Etanol (%m/v)</b>	<b>Biomasa (%m/v)</b>
0	2.596293	0	0.014181818
3	2.5506684	0.101210553	0.128
6	2.3431968	0	0.15
9	2.099223	0.140292879	0.17875
12	1.8858168	0	0.215
24	1.869525	0	0.2
48	1.6880346	0	0.297

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 51**

*Datos calculados para la tercer corrida de la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%m/v)</b>	<b>Etanol (%m/v)</b>	<b>Biomasa (%m/v)</b>
0	2.4749298	0	0.017018182
3	2.3431968	0	0.1536
6	2.1623364	0	0.18
9	1.9349946	0.048349841	0.2145
12	1.9335078	0	0.258
24	1.867887	0.110497872	0.24
48	1.5790068	0.120779331	0.3012

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 52**

*Promedio de datos de la curva de crecimiento de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*

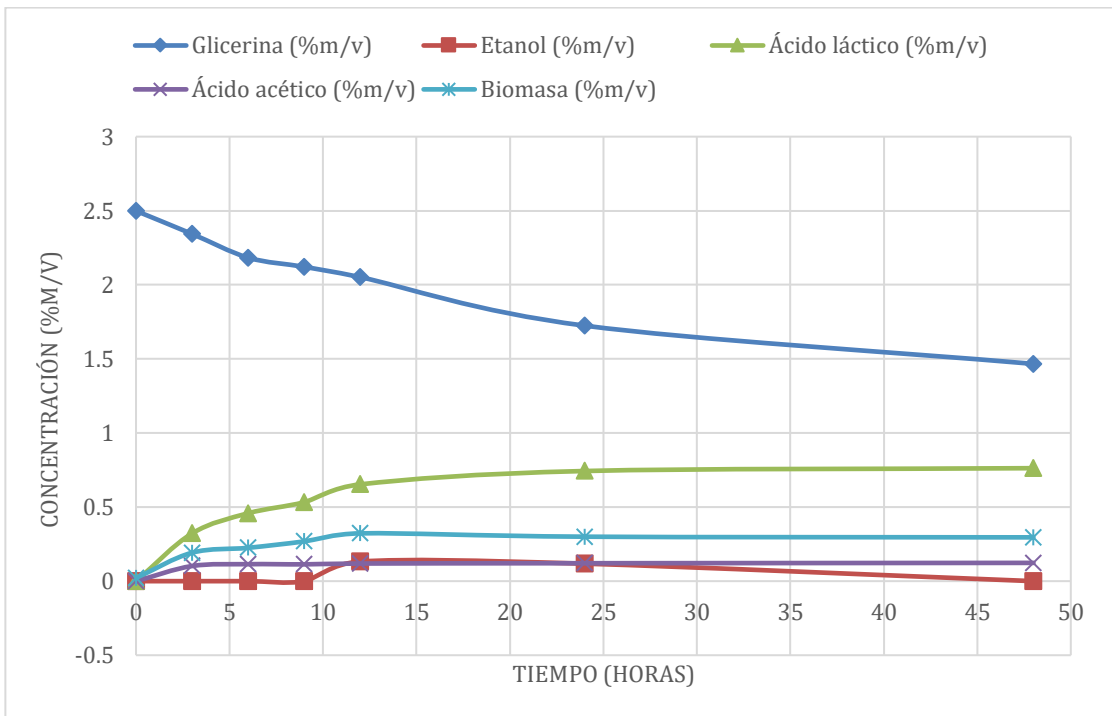
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Glicerol (%m/v)</b>	<b>Ácido láctico (%m/v)</b>	<b>Ácido acético (%m/v)</b>	<b>Etanol (%m/v)</b>	<b>Biomasa (%m/v)</b>
0	2.523402	0	0	0	0.017490909
3	2.412354	0.309643333	0.116999856	0.033736851	0.157866667
6	2.2295532	0.426528	0.132554224	0	0.185
9	2.0517756	0.53922	0.125291696	0.062880907	0.220458333
12	1.956906	0.640051333	0.130743808	0.044177425	0.265166667

24	1.820574	0.699994667	0.130412682	0.076111148	0.246666667
48	1.577772	0.721963333	0.124885912	0.040259777	0.2979

Nota. Elaboración propia.

**Figura 40**

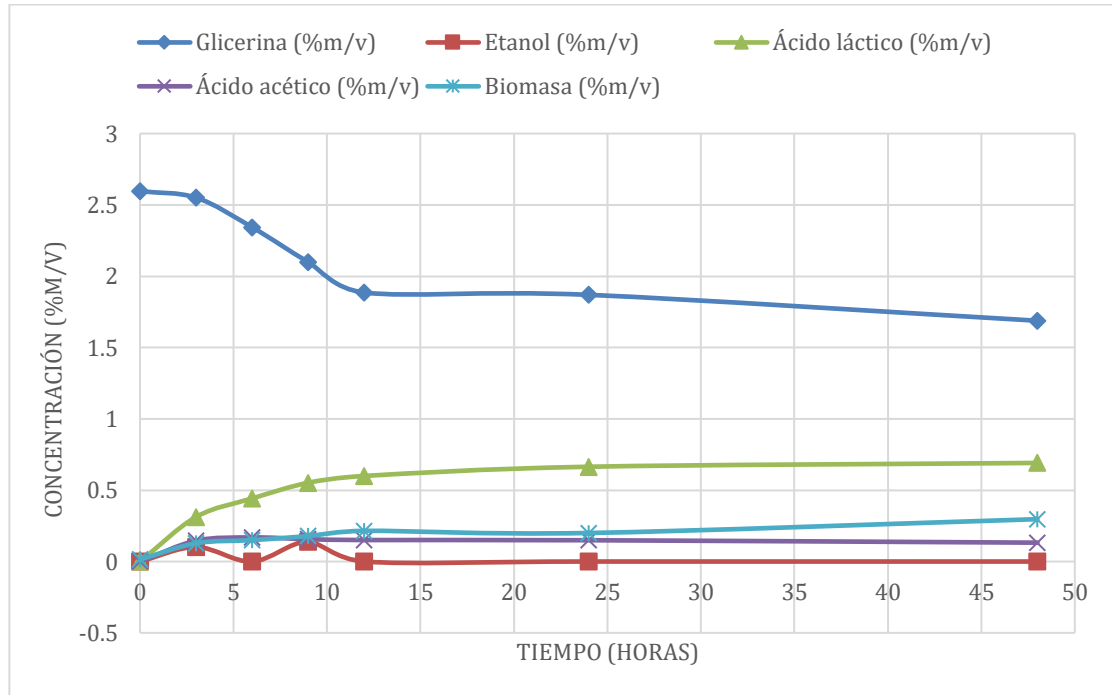
*Curva de crecimiento para la primera corrida de la fermentación por medio de la cepa de Lactobacillus plantarum adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción*



Nota. Elaboración propia.

**Figura 41**

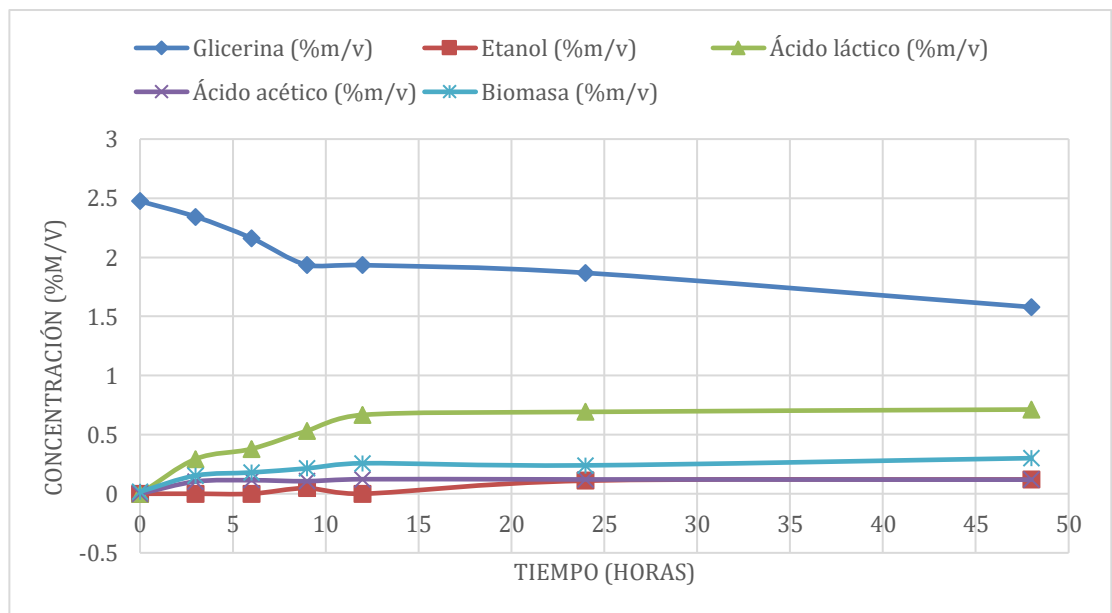
Curva de crecimiento para la segunda corrida de la fermentación por medio de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción



Nota. Elaboración propia.

**Figura 42**

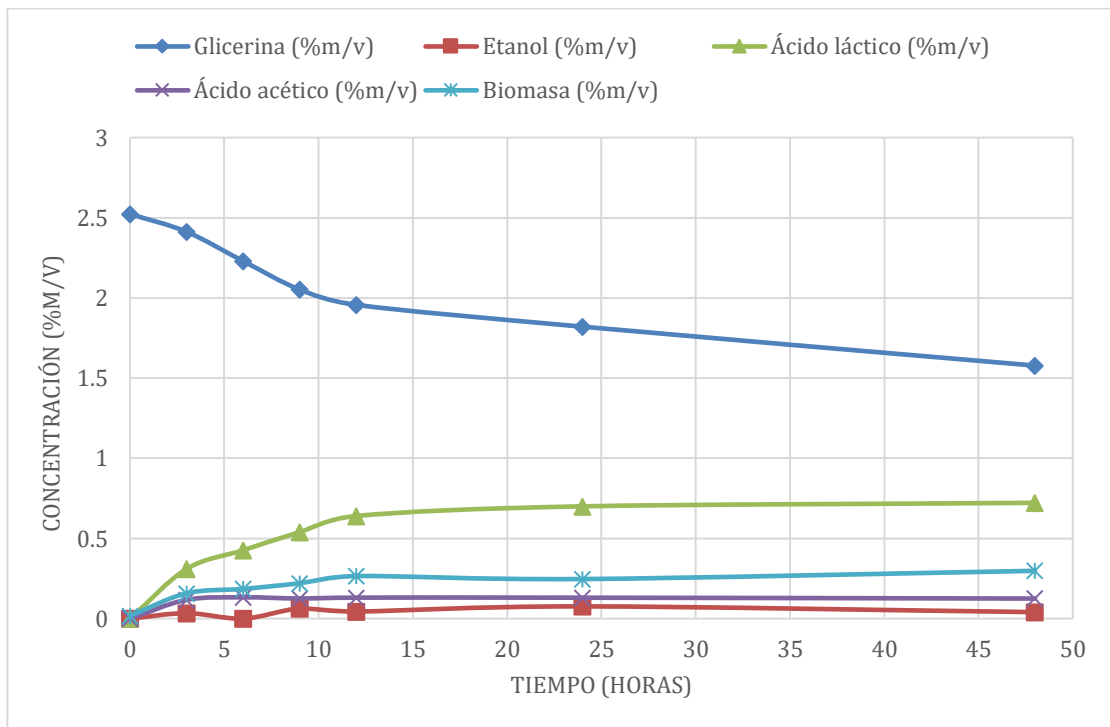
Curva de crecimiento para la tercer corrida de la fermentación por medio de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción



Nota. Elaboración propia.

**Figura 43**

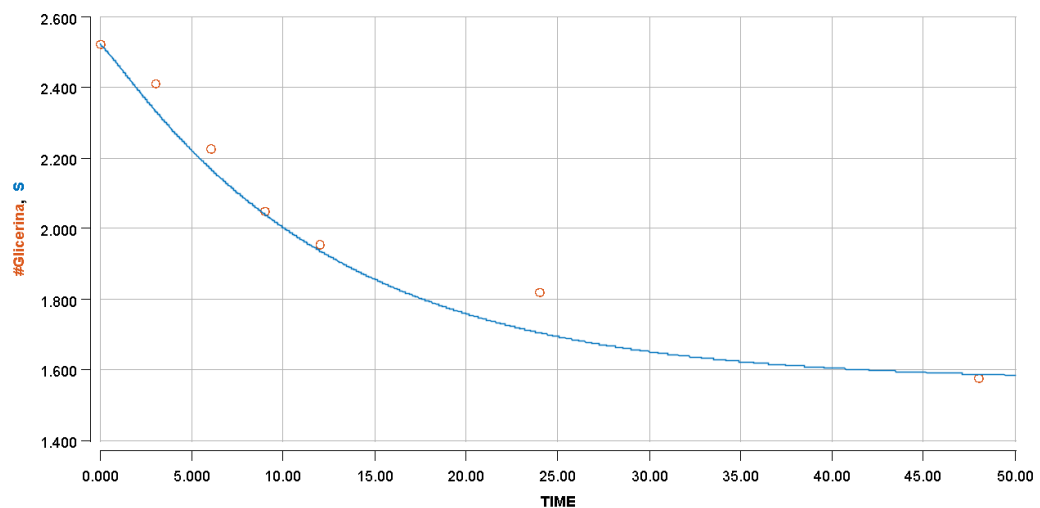
Curva de crecimiento para el promedio de los datos de la fermentación por medio de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo para generar el modelo cinético de la reacción



Nota. Elaboración propia.

**Figura 44**

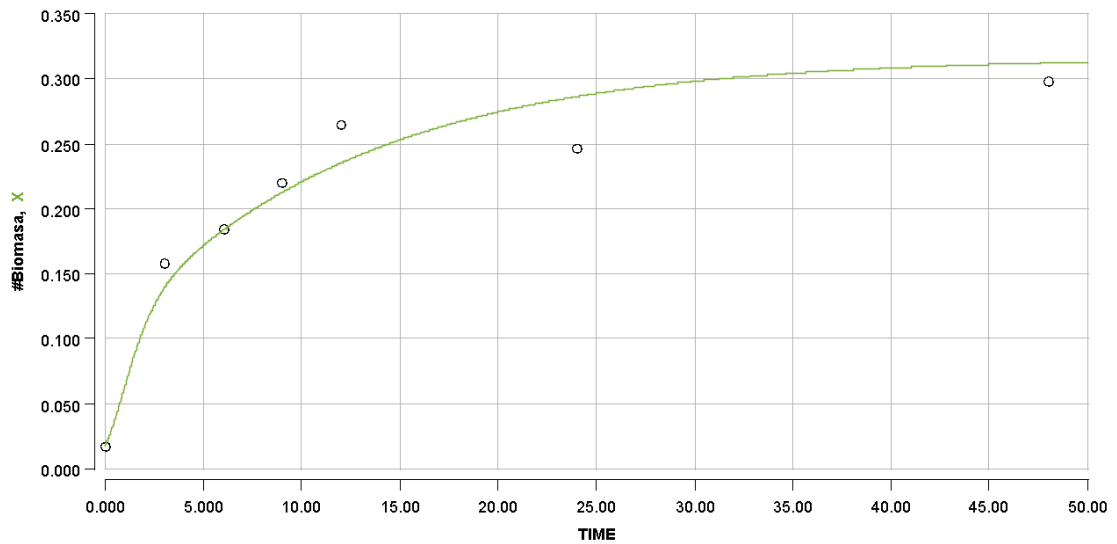
Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del sustrato (glicerina) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico



Nota. Elaboración propia.

**Figura 45**

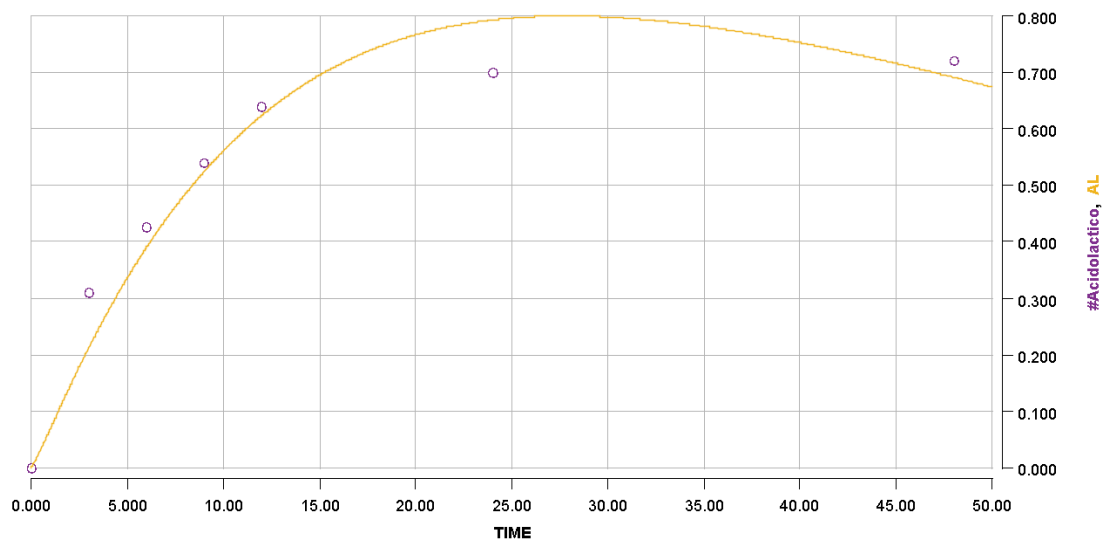
*Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del microorganismo (biomasa) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico*



*Nota.* Elaboración propia.

**Figura 46**

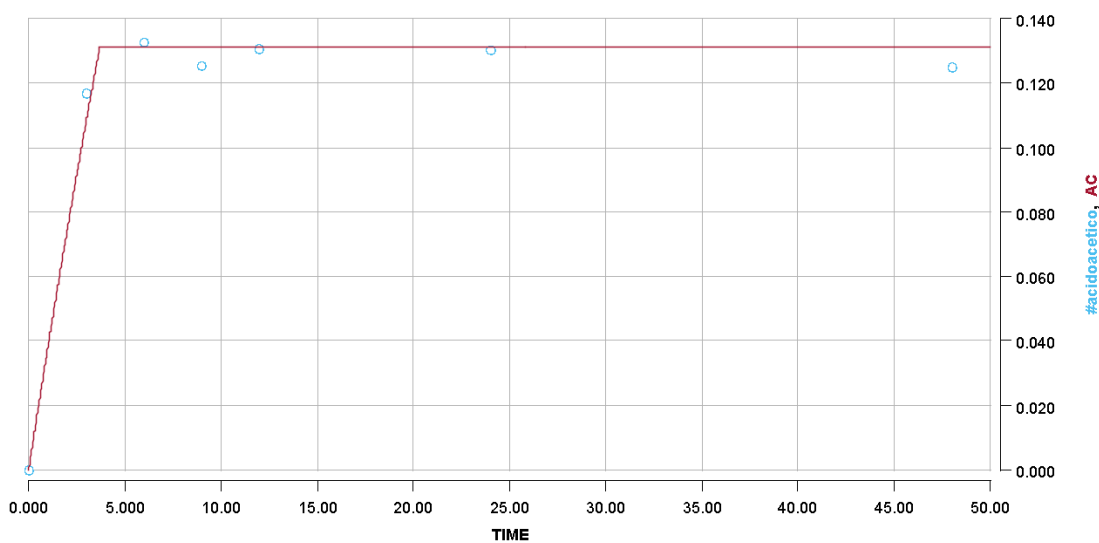
*Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del producto (ácido láctico) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico*



*Nota.* Elaboración propia.

**Figura 47**

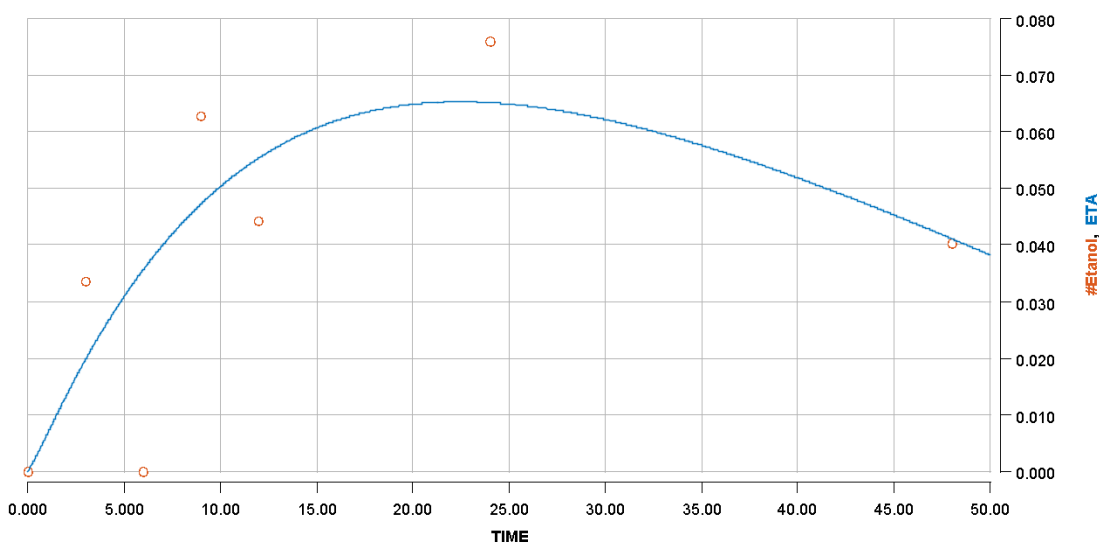
Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del subproducto (ácido acético) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico



Nota. Elaboración propia.

**Figura 48**

Curva de crecimiento del modelo cinético que predice el comportamiento del subproducto (etanol) durante la fermentación de glicerol crudo por medio de la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada para la síntesis de ácido láctico



Nota. Elaboración propia.

**Tabla 53**

Datos pronosticados obtenidos por medio del modelo cinético de la fermentación por medio de la cepa de *Lactobacillus plantarum* adaptada al glicerol crudo para la síntesis de ácido láctico

Tiempo (h)	Glicerol (%m/v)	Ácido láctico (%m/v)	Ácido acético (%m/v)	Etanol (%m/v)	Biomasa (%m/v)
0	2.523402	0	0	0	0.01749091
3	2.33568814	0.21300324	0.1083488	0.0197655	0.13864229
6	2.17172966	0.39008357	0.13087682	0.03563905	0.18337307
9	2.04107542	0.52445884	0.13087682	0.04724375	0.2124397
12	1.93798906	0.62379773	0.13087682	0.05536343	0.23513023
24	1.7056215	0.7929547	0.13087682	0.06517344	0.28625152
48	1.58814379	0.69156413	0.13087682	0.04114728	0.31209661

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 54**

Suma de errores al cuadrado para cada modelo generado para las especies presentes en la fermentación láctica de glicerol crudo usando la cepa *Lactobacillus plantarum*

Tiempo (h)	Glicerol (%m/v) <sup>2</sup>	Ácido láctico (%m/v) <sup>2</sup>	Ácido acético (%m/v) <sup>2</sup>	Etanol (%m/v) <sup>2</sup>	Biomasa (%m/v) <sup>2</sup>
0	0	0	0	0	-9.09091E-10
3	0.07666586	0.096640093	0.008651056	0.013971351	0.019224377
6	0.05782354	0.03644443	0.001677404	-0.03563905	0.00162693
9	0.01070018	0.01476116	-0.005585124	0.015637157	0.008018633
12	0.01891694	0.016253603	-0.000133012	-0.011186005	0.030036437
24	0.1149525	-0.092960033	-0.000464138	0.010937708	-0.039584853
48	-0.01037179	0.030399203	-0.005990908	-0.000887503	-0.01419661
<b>SSE total</b>	<b>0.023015212</b>	<b>0.020715255</b>	<b>0.000144972</b>	<b>0.001955409</b>	<b>0.003107214</b>
<b>RMSE total</b>	<b>0.057340103</b>	<b>0.054399652</b>	<b>0.004550858</b>	<b>0.016713592</b>	<b>0.021068643</b>

Nota. Elaboración propia.

## XV. Anexo D. Cálculo de muestra

En este anexo, se presentan los cálculos realizados para obtener las propiedades del glicerol por medio de los datos medidos durante la experimentación. Asimismo, también se presentan los cálculos de los parámetros sobre el consumo del glicerol durante la fermentación. Por último, se presenta el cálculo del logaritmo natural de la concentración de microorganismos con respecto al tiempo que permite evaluar la condición de crecimiento de la cepa durante el tiempo.

### Figura 49

*Determinación de la densidad de una medición del volumen de glicerol crudo a una temperatura de 24 °C*

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Masa de glicerol}(g)}{\text{Volumen de glicerol}(mL)} = \frac{50.9 g}{50 mL} = 1.019 \frac{g}{mL}$$

Este cálculo se realizó para las cuatro mediciones de la densidad del glicerol crudo por medio de dicho análisis.

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 50

*Concentración de glicerina presente en la muestra de glicerol crudo analizada*

$$\text{Valor original} = \text{Dilución (1:100)} * 100 mL = 0.536 \% \left(\frac{v}{v}\right) * 100 mL = 53.6 \% \left(\frac{v}{v}\right)$$

Este cálculo se realizó para poder llevar a su valor original al valor obtenido de la cantidad de glicerina en la muestra. El glicerol se diluyó en una proporción 1:100 para poder ser analizado en HPLC. Este cálculo se repitió para las cuatro mediciones.

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 51

*Determinación la concentración de glicerol en % (m/v) partiendo de su porcentaje % (v/v)*

$$\% \frac{m}{v} = \% \frac{v}{v} * \text{densidad} = 1.2412 \% \left(\frac{v}{v}\right) * 1.26 \frac{g}{mL} = 1.5639 \% \left(\frac{m}{v}\right)$$

Este cálculo se realizó para poder llevar los datos obtenidos de concentración por HPLC que estaban en % v/v y llevarlos todos al mismo tipo de unidad. Este cálculo se realizó para las demás especies analizadas durante la experimentación tales como el etanol, ácido acético y ácido láctico.

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 52

Porcentaje de conversión de glicerol crudo durante la fermentación usando la cepa *Lactobacillus plantarum*

$$CG = \frac{Glicerol_i - Glicerol_x}{Glicerol_i} * 100 = \frac{(0.5349\% - 0.4605\%) \left(\frac{v}{v}\right)}{0.5349\% \left(\frac{v}{v}\right)} * 100 = 39.90\%$$

Este cálculo fue realizado para un dato de la experimentación realizada a una concentración de 0.5 % (v/v) de glicerol crudo. Este cálculo se repitió para todas las mediciones realizadas con las tres concentraciones de glicerol estudiadas.

Nota. Elaboración propia.

### Figura 53

Rendimiento de glicerol crudo durante la fermentación usando la cepa *Lactobacillus plantarum*

$$Y'_{ps} = \frac{\text{Ácido láctico producido (g)}}{\text{Glicerol consumido (g)}} = \frac{0.07\% \frac{v}{v}}{0.1516\% \frac{m}{v}} = 0.4291$$

Este cálculo fue realizado para un dato de la experimentación realizada a una concentración de 0.5 % (v/v) de glicerol crudo. Este cálculo se repitió para todas las mediciones realizadas con las tres concentraciones de glicerol estudiadas.

Nota. Elaboración propia.

### Figura 54

Variación del logaritmo natural de la concentración de microorganismos presentes en el medio de fermentación respecto al tiempo

$$\begin{aligned} \ln X &= \ln \left( 0.1566\% \frac{m}{v} \right) = -1.85 \\ \frac{d\ln X}{dt} &= \left( \frac{-1.85 - (-2.13)}{24 \text{ horas} - 11 \text{ horas}} \right) = 0.021 \end{aligned}$$

Este cálculo consistió en obtener el logaritmo natural de la concentración de biomasa en el medio. Luego, se obtuvo un diferencial aproximado por un cambio del logaritmo natural de la concentración de biomasa y el tiempo en el que se dio dicho cambio. Este cálculo se repitió para los sets de datos obtenidos para la curva de crecimiento en la fermentación y sirvió para poder analizar el comportamiento de estas mismas curvas.

Nota. Elaboración propia.

## XVI. Anexo E. Análisis de error

En este anexo, se presentan los cálculos relacionados a parámetros estadísticos realizados para poder obtener los valores promedios de mediciones realizadas en la experimentación. Asimismo, se presenta también el cálculo de las pruebas ANOVA y la prueba t para poder determinar la variable que causaba una variación significativa en las mediciones. Por último, se presenta el análisis de la incertidumbre que se realizó para colocarlo en los datos calculados e incluir la variación de los instrumentos utilizados para su medición y cálculo.

### Figura 55

*Promedio de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado*

$$\text{Promedio de glicerina} = \frac{53.6 \% + 55.1 \% + 57.3\% + 57.1 \%}{4} = 55.775\% \frac{v}{v}$$

Se realizó el cálculo anterior para determinar el promedio de una serie de datos medidos y/o calculados. Se realizó este cálculo para determinar el valor promedio de las concentraciones de las especies presentes en el glicerol crudo. También se realizó para encontrar el promedio de los metabolitos analizados en las curvas de crecimiento de la fermentación con *L. plantarum*.

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 56

*Varianza de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado*

$$\sigma^2 = \frac{(53.6 - 55.775)^2 + (55.1 - 55.775)^2 + (57.3 - 55.775)^2 + (57.1 - 55.775)^2}{4}$$
$$= 3.089 \% \left(\frac{v}{v}\right)^2$$

Se realizó el cálculo anterior para determinar la varianza de una serie de mediciones y/o cálculos. Se realizó este cálculo para determinar la varianza de las mediciones de caracterización del glicerol crudo que se realizaron.

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 57

Desviación estándar de la concentración de glicerina presente en el glicerol crudo utilizado

$\sigma = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{3.089} = 1.757 \% \left(\frac{v}{v}\right)$
Se realizó el cálculo anterior para determinar la desviación estándar de una serie de mediciones y/o cálculos. Se realizó este cálculo para determinar la desviación estándar de las mediciones de caracterización del glicerol crudo que se realizaron.

Nota. Elaboración propia.

### Tabla 55

ANOVA de un factor para el efecto de la concentración de glicerol crudo por medio de la conversión de glicerol crudo a ácido láctico

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0,50%	18	9.333194467	0.518510804	0.022565144
1,0%	18	11.54415108	0.641341726	0.049488395
2,0%	18	12.54596705	0.696998169	0.014984684

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.30025689	2	0.150128445	5.174569533	0.00899339	3.178799292
Dentro de los grupos	1.479649783	51	0.029012741			
Total	1.779906672	53				

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

- Prueba F:  $F > F_{critico} \rightarrow$  Se rechaza  $H_0$

$$5.174 > 3.1788$$

Por ende, se rechaza la hipótesis nula y hay evidencia significativa que hay diferencia en los promedios del grupo para las concentraciones de glicerol crudo evaluadas. Este cálculo se repitió para las otras dos variables analizadas que fueron el efecto de la temperatura y el tiempo.

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 56**

*Prueba t con una significancia del 0.05 para determinar la muestra de la concentración de glicerol crudo que tiene una diferencia significativa en su conversión a ácido láctico*

Concentración de glicerol	0,50%	1,0%
Media	0.518510804	0.641341726
Varianza	0.022565144	0.049488395
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	0.036026769	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-1.941405741	
P(T<=t) una cola	0.030266976	
Valor crítico de t (una cola)	1.690924255	
P(T<=t) dos colas	0.060533951	
Valor crítico de t (dos colas)	2.032244509	
$H_o : \mu_1 = \mu_2$ $H_a : \mu_1 \neq \mu_2$		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba p: <math>P_{significancia} &gt; P_{critico} \rightarrow</math> Se rechaza <math>H_o</math>  <math>0.05 &gt; 0.06 \rightarrow</math> No se rechaza <math>H_o</math></li> </ul>		
<p>Por ende, no se rechaza la hipótesis nula y no hay evidencia significativa de que hay diferencia en los promedios del grupo para las concentraciones de glicerol crudo evaluadas. Este cálculo se repitió para los otros dos grupos de datos para lograr determinar entre cuales grupos de muestras existía diferencia significativa debido al análisis ANOVA de un factor.</p>		

*Nota.* Elaboración propia.

### Figura 58

*Incertidumbre de la concentración de glicerina en el glicerol crudo utilizado*

$$S_{\text{glicerina}} = \sqrt{(0.4288 \%)^2 + (0.4342 \%)^2 + (0.4124)^2 + (0.4322)^2} = \pm 0.20 \text{ g de peso}$$

$$S_{\text{glicerina}} = 53.6\% * \sqrt{\left(\frac{0.0001 \text{ g}}{50.9 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.4 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right)^2} = \pm 0.4288 \%$$

Se realizó el cálculo anterior para determinar la incertidumbre de un valor calculado por medio de sumas o restas y también para las operaciones que involucraban multiplicaciones y divisiones. Se realizó este cálculo para determinar la incertidumbre del promedio de la incertidumbre del promedio de la concentración de glicerina en el glicerol crudo. Se repitió este cálculo para las demás variables fisicoquímicas analizadas cuantitativamente para la caracterización del glicerol.

*Nota.* Elaboración propia.

## XVII. Anexo F. Ilustraciones

A continuación, se presentan algunas ilustraciones realizadas al momento de la experimentación tales como la recolección de la materia prima, el cultivo de la cepa *Lactobacillus plantarum*, la adaptación de la cepa al glicerol crudo, el crecimiento de biomasa en el medio de cultivo, las fermentaciones realizadas y las muestras recolectadas para realizar los análisis de metabolitos.

**Figura 59**

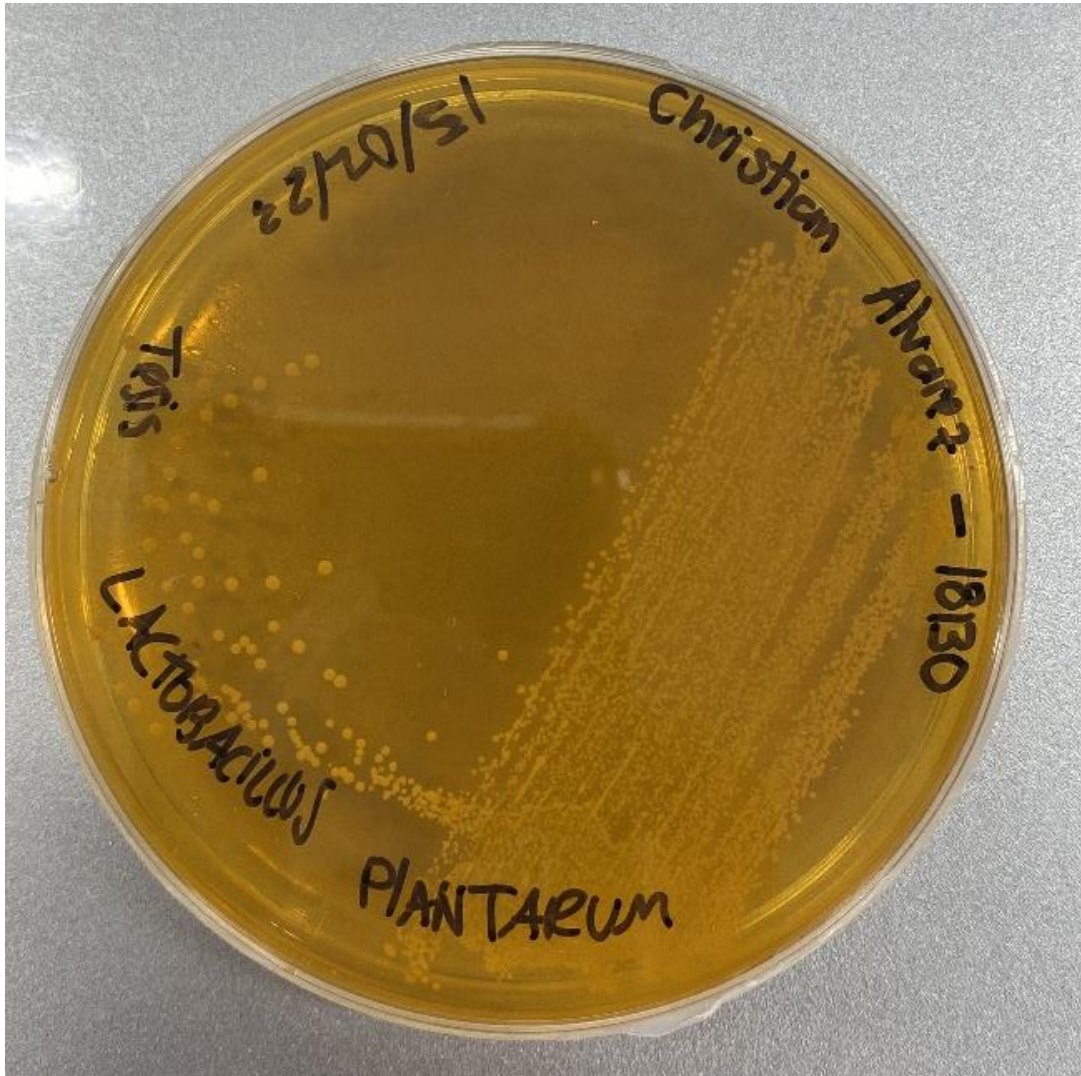
*Muestra de glicerol crudo utilizado para las fermentaciones*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de operaciones unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 60**

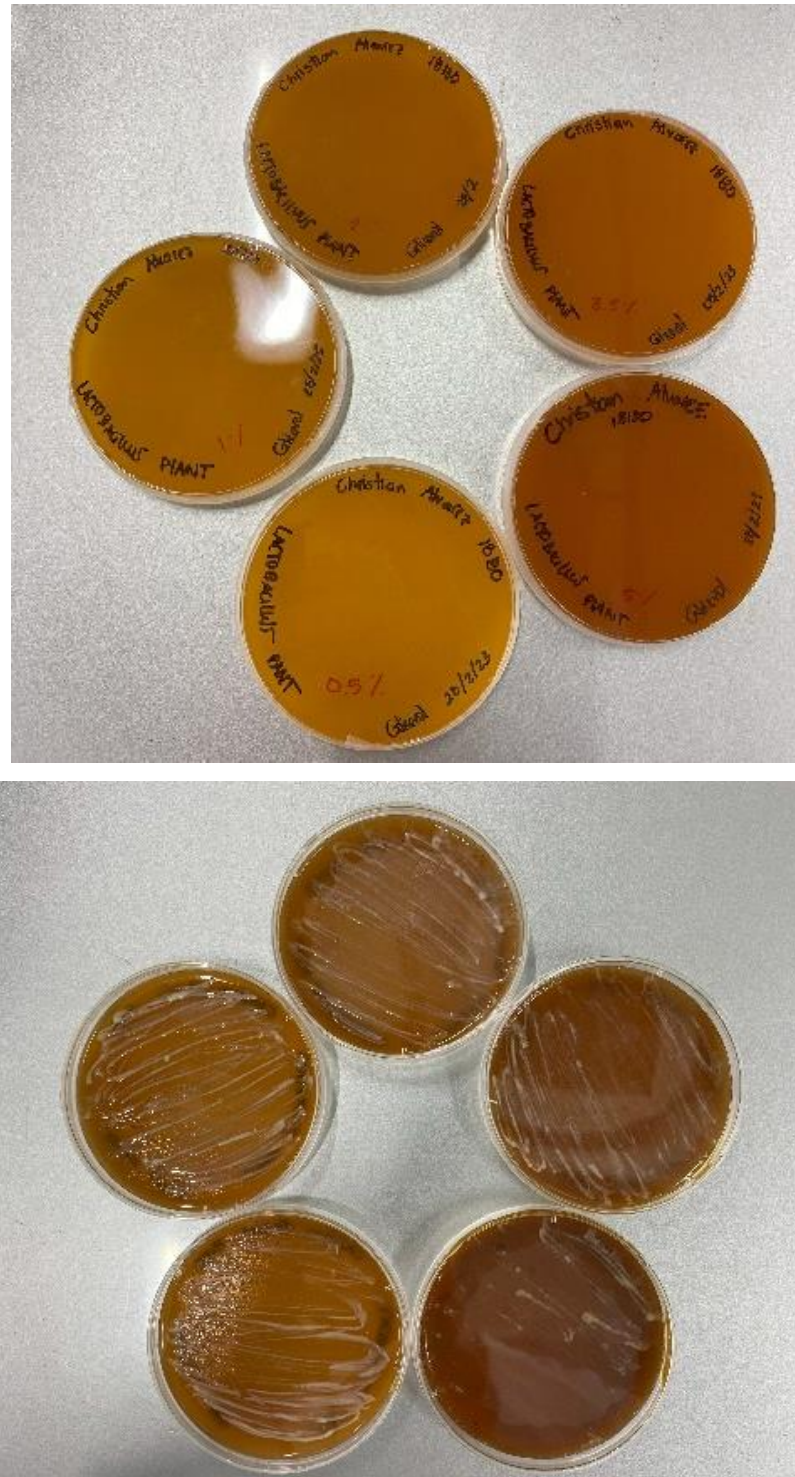
*Cepa de Lactobacillus plantarum utilizada para la adaptación y fermentación*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 61**

*Evaluación de la tolerancia de la cepa utilizada contra la presencia de glicerol crudo en un medio de agar MRS*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 62**

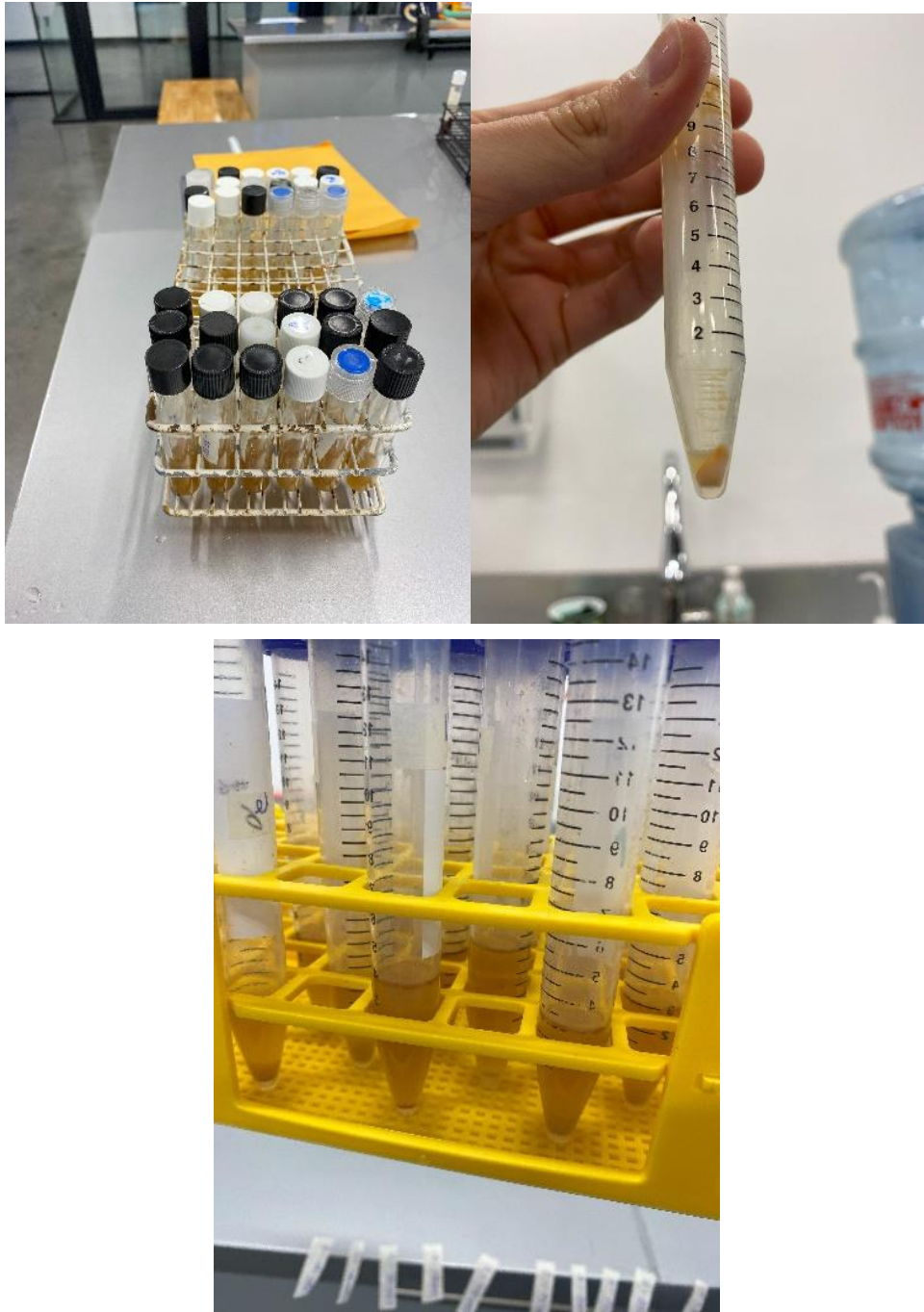
*Adaptación de la cepa utilizada a diferentes concentraciones de glucosa y de glicerol crudo en caldo MRS*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 63**

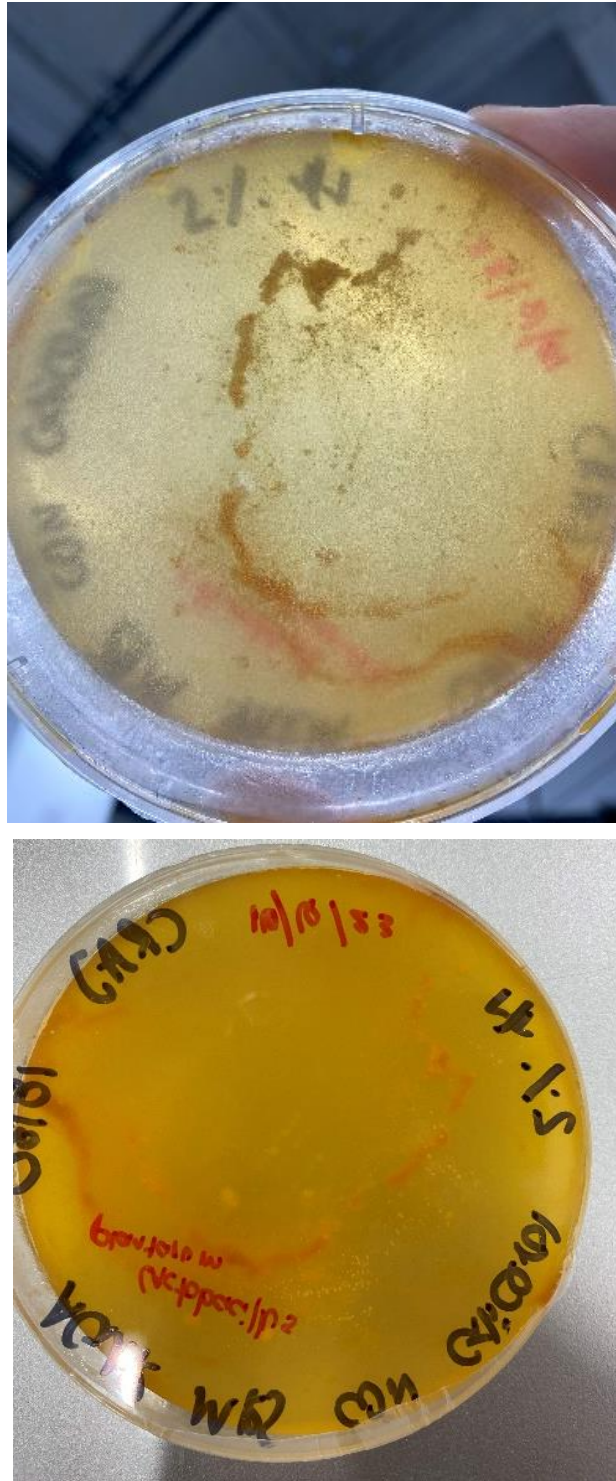
*Preparación de las muestras tomadas para ser enviadas a HPLC y la evaluación del crecimiento microbiano por medio del peso seco*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 64**

*Crecimiento en caja Petri de la cepa Lactobacillus plantarum adaptada a glicerol crudo*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 65**

*Preparación del caldo a ser utilizada para la fermentación láctico de glicerol crudo medidas a diferentes variables de concentración de sustrato, tiempo de fermentación y temperatura de fermentación utilizando la cepa *Lactobacillus plantarum* adaptada*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 66**

*Fermentación final a 37 °C a una concentración de 2 % v/v de glicerol crudo utilizando Lactobacillus plantarum adaptada*



*Nota.* Ilustración obtenida en el laboratorio de bioprocesos industriales (CIT -113) de la Universidad del Valle de Guatemala.

## XVIII. Glosario

**Ácido láctico:** Carbohidrato orgánico que se produce como producto final de la fermentación láctica. Es un ácido débil que tiene un sabor agrio y que se encuentra en muchos alimentos fermentados, como el yogur, el kéfir, el chucrut y el kimchi.

**Ácidos grasos:** Compuestos orgánicos que contienen una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada y un grupo carboxilo (-COOH). Los ácidos grasos se encuentran en una amplia variedad de alimentos, como los aceites vegetales, las grasas animales y los frutos secos.

**Adaptación de cepa:** Proceso por el cual una cepa de bacteria se adapta a un nuevo medio de cultivo. Este proceso puede tomar varios días o semanas, durante los cuales la bacteria se adapta a las condiciones del medio, como la temperatura, el pH y la composición nutricional.

**Agar MRS:** Medio de cultivo selectivo para bacterias lácticas. Se utiliza para el aislamiento y el cultivo de estas bacterias.

**Autoclave:** Equipo que se utiliza para esterilizar materiales a altas temperaturas y presiones. Se utiliza para esterilizar medios de cultivo, materiales de laboratorio y equipos.

**Bacteria:** Microorganismo unicelular que carece de un núcleo definido. Las bacterias son muy diversas y se encuentran en todos los ecosistemas del planeta.

**Biodiésel:** Combustible renovable que se produce a partir de lípidos de origen vegetal o animal. Los lípidos más utilizados para la producción de biodiésel son los aceites vegetales y las grasas animales.

**Biomasa:** Cantidad de materia viva presente en un sistema. En el contexto de la fermentación láctica, la biomasa se refiere a la cantidad de células bacterianas presentes en un cultivo.

**Cajas Petri:** Recipientes de vidrio o plástico que se utilizan para el cultivo de microorganismos. Están hechas de un material transparente que permite la observación del crecimiento de las bacterias.

**Caldo MRS:** Medio de cultivo general para bacterias. Se utiliza para el cultivo de una amplia gama de bacterias, incluidas las bacterias lácticas.

**Centrifugación:** Proceso que se utiliza para separar partículas de diferentes tamaños. En el contexto de la fermentación láctica, la centrifugación se utiliza para separar las células bacterianas del medio de cultivo.

**Cepa:** Variante de una especie bacteriana que tiene características distintivas. Las cepas de bacterias lácticas se clasifican según sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas.

**Curva de crecimiento:** Gráfico que representa el crecimiento de una población bacteriana en función del tiempo. La curva de crecimiento se divide en cuatro fases: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

**Fermentación aerobia:** Proceso catabólico que se produce en presencia de oxígeno. En la fermentación aerobia, los microorganismos utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones.

**Fermentación heterogénea:** En este tipo de fermentación se produce ácido láctico y otros compuestos tales como ácidos acético y fórmico (*Bifidobacterium*), dióxido de carbono y etanol (*Leuconostoc*).

**Fermentación:** Proceso catabólico que se produce en ausencia de oxígeno. En la fermentación láctica, las bacterias utilizan los azúcares como fuente de energía y producen ácido láctico como producto final.

**GC/MS:** Técnica analítica que se utiliza para identificar y cuantificar compuestos orgánicos. En el contexto de la fermentación láctica, la GC/MS se utiliza para analizar los productos de la fermentación.

**Glicerina:** Alcohol de tres carbonos que se produce como subproducto de la fermentación láctica. La glicerina se utiliza en una variedad de aplicaciones, como la industria alimentaria, la industria farmacéutica y la industria cosmética.

**Glicerol crudo:** Glicerina que no ha sido purificada. El glicerol crudo suele contener impurezas, como agua, azúcares y sales.

**HPLC:** Técnica analítica que se utiliza para separar y cuantificar compuestos orgánicos. En el contexto de la fermentación láctica, la HPLC se utiliza para analizar los productos de la fermentación.

**Incubadora:** Equipo que se utiliza para mantener una temperatura constante. En el contexto de la fermentación láctica, las incubadoras se utilizan para mantener las condiciones óptimas de crecimiento para las bacterias lácticas.

**Lactobacillus:** Género de bacterias que producen ácido láctico. Las bacterias Lactobacillus son las responsables de la fermentación láctica en una variedad de alimentos, como el yogur, el kéfir, el chucrut y el kimchi.

**Mantenimiento celular:** Proceso por el cual las bacterias mantienen su viabilidad en un medio de cultivo. El mantenimiento celular es importante para la conservación de cepas bacterianas.

**Microorganismo:** Ser vivo unicelular que puede verse a través de un microscopio. Los microorganismos incluyen bacterias, hongos, protozoos y algas.

**Transesterificación:** Reacción química que consiste en la sustitución de un grupo hidroxilo (-OH) por un grupo alquilo (-R) en un compuesto orgánico. La transesterificación se utiliza en la producción de biodiésel, un combustible renovable que se produce a partir de lípidos.