

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS EN EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL CRUDO UTILIZANDO UN
MICROORGANISMO NATIVO**

DAVID ARMANDO PRIETO MONTAÑEZ

LEIDY PATRICIA ROJAS ALARCÓN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE FÍSICOQUÍMICA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2011

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS EN EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL CRUDO UTILIZANDO UN
MICROORGANISMO NATIVO**

DAVID ARMANDO PRIETO MONTAÑEZ

LEIDY PATRICIA ROJAS ALARCÓN

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de ingeniero
Químico**

Directoras

CAROLINA GUZMÁN LUNA

Microbióloga Ambiental, Ph.D

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA

Química, Ph.D.

Codirectora

Paolo Andrea Moreno Yáñez

Ing. Química, candidata a doctor en Ing. Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Fisicoquímica.

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2011

En este momento el que culminamos nuestra vida universitaria dedicamos este logro, a nuestros queridos padres quienes con su infinita adhesión nos han brindado todo su apoyo sin limitar sacrificio alguno. A nuestros hermanos, porque han sido los amigos, los compañeros fieles en el camino hasta aquí recorrido; en general a toda nuestra familia que de una u otra manera contribuyeron para el logro de nuestra carrera, a nuestros profesores por su insistencia en nuestro aprendizaje.

A Dios por guiar nuestros pasos y ayudarnos a superar los obstáculos que se nos presentaron a lo largo del camino; y, por último queremos dedicar este logro a todos nuestros amigos testigos de nuestros triunfos y fracasos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a:

La Escuela de Ingeniería química, la facultad de salud, de la universidad Industrial de Santander y a los profesores que nos han transmitido sus conocimientos y fundamentos ingenieriles.

A las Doctoras Carolina Guzmán, Yajaira Combariza y a la Ingeniera Paolo Moreno por permitirnos desarrollar éste trabajo bajo su dirección, por su apoyo, confianza e invaluable colaboración no sólo en el transcurso de esta tesis, sino también en nuestra formación como profesionales.

Al personal del laboratorio de Bacteriología y Toxicología de la Facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander por su colaboración e interés para realizar este trabajo.

Al CEIAM (Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales) por su disponibilidad y amabilidad durante nuestra estadía en el grupo.

A NEOMUNDO Y DIEF SALUD, por su apoyo financiero y prestación de servicios.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	17
1. MARCO TEORICO	18
1.1 GLICEROL.....	19
1.2 PROCESOS DE BIOCONVERSIÓN	20
1.2.1 Alcoholes.....	20
1.2.2 Ácidos.....	21
1.2.3 Otros	22
1.3 VARIABLES FISICOQUIMICAS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO MICROBIANO	22
1.3.1 Temperatura	22
1.3.2 pH.....	23
1.3.3 Concentración de nutrientes	24
2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
2.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO	25
2.1.1 Bacillus circulans y Consorcio bacteriano	26
2.1.2. <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
2.1.3 Curva de crecimiento celular	27
2.1.4 Productividad	28
2.1.5 Rendimiento.....	28
2.2 SELECCIÓN DE CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO ELEGIDO	28
2.2.1 Fuente nutricional del preinóculo.....	28
2.2.2 Temperatura	29
2.2.3 pH.....	29
2.2.4 Afinidad por el sustrato:	29
2.3 FERMENTACIÓN	30
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
3. RESULTADOS Y ANALISIS.....	32
3.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO	32
3.1.1. Fermentación bacteriana.....	32
3.1.2. Fermentación Fúngica.....	33

3.2. SELECCIÓN DE CONDICIONES	34
3.2.1 Fuente nutricional del preinóculo.....	34
3.2.2 Temperatura.	36
3.2.3 pH.....	36
3.2.4 Afinidad por el sustrato.	37
3.3. FERMENTACIÓN	40
3.3.1 DNS.....	41
3.3.2 Cuantificación de metabolitos	42
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de Producción de Biodiesel en Colombia (Federacion Nacional de biocombustibles).....	19
Tabla 2. Descripción caldos de cultivo.....	29
Tabla 3. Fermentación de glicerol crudo 50g/L con <i>B. circulansa</i> 37°C y pH de 6,5	42
Tabla 4. Producción de PHA por <i>B. circulans</i> utilizando glicerol crudo (50g/L).....	43
Tabla 5. Producción de PHA por <i>B. circulans</i> en diferentes fuentes de carbono	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reaccion de Esterificación (Zapata <i>et al.</i> , 2006)	18
Figura 2. Clase de microorganismos según la temperatura [Michael T. Madigan, John M. Martinko. 2004. Brock Biología de los Microorganismos 10ed.].....	23
Figura 3. Rangos de pH para hongos(a) y bacterias (b) Concentración de nutrientes	23
Figura 4. Diagrama de la metodología experimental	25
Figura 5. Crecimiento de <i>Bacillus circulansa</i> diferentes tiempos de fermentación (coloración de Gram)	41

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento y consumo de glicerol de <i>Bacillus circulans</i>	32
Gráfica 2. Crecimiento y consumo de glicerol de consorcio bacteriano.	32
Gráfica 3. Crecimiento y consumo de glicerol de <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
Gráfica 5. Crecimiento de <i>B. circulans</i>	35
Gráfica 6. Crecimiento de <i>B. circulans</i> a diferentes temperaturas en caldo nutritivo, sin agitación, pH 7.5 y 24 horas de incubación	36
Gráfica 7. Crecimiento de <i>B. circulans</i> a diferentes valores de pH en caldo nutritivo, sin agitación, 37°C y 24 horas de incubación.	37
Gráfica 8. Crecimiento de <i>B. circulans</i> a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 24 horas de incubación.....	38
Gráfica 9. Crecimiento de <i>B. circulans</i> a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 48 horas de incubación.....	38
Gráfica 10. Crecimiento de <i>B. circulans</i> a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 72 horas de incubación.....	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS	51
ANEXO B. COMPOSICIÓN DE CALDOS DE CULTIVO.....	51
ANEXO C. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE GLICEROL CRUDO (Grupo CEIAM UIS)	52
ANEXO D. CONSUMO DE GLICEROL Y VARIABLES DE RESPUESTA CONSULTADAS EN LA LITERATURA.....	52

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES FISICOQUIMICAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL CRUDO UTILIZANDO UN MICROORGANISMO NATIVO. *

AUTOR: DAVID PRIETO; LEIDY ROJAS. **

Palabras claves: Microorganismos, glicerol, fermentación, polihidroxicanoatos, *Bacillus circulans*.

Descripción: El biodiesel es el único biocombustible que tiene el potencial para desplazar completamente a su homólogo del petróleo. Es producido a partir de una reacción de transesterificación en la que se genera 10%p/p de glicerol como subproducto, por tanto el incremento en la producción de biodiesel ha generado un superávit de glicerol crudo que ha causado una disminución en su precio y ha hecho necesaria la investigación de las opciones para su conversión. En este trabajo se valoraron tres microorganismos previamente aislados de muestras de glicerol crudo proveniente de dos empresas Colombianas productoras de biodiesel. Con cada uno de ellos se realizaron fermentaciones utilizando glicerol USP como única fuente de carbono, con el fin de evaluar el crecimiento y consumo de glicerol. A partir de estas fermentaciones se encontró que *B. circulans* fue el microorganismo que presentó mayor incremento de biomasa y consumo de glicerol, por lo tanto, se buscaron sus mejores condiciones de crecimiento. Habiéndose establecido las mejores condiciones de fermentación: caldo nutritivo para la preparación del preinóculo, temperatura de 37°C; pH de 6,5 y una concentración de glicerol crudo 50 g/L, se procedió a detectar los metabolitos producidos por *B. circulans*. Como productos de fermentación, se encontraron polihidroxicanoatos, etanol y propanol. En comparación con la literatura, se observó que los valores de biomasa obtenidos en este trabajo, fueron bajos comparados con otros microorganismos nativos utilizados por diferentes autores. Se encontró que los valores de eficiencia y productividad del etanol estuvieron por debajo de los reportados, sin embargo, se resalta el consumo de glicerol y la productividad de polihidroxicanoatos similar a los reportados por otros investigadores.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directoras: Carolina Guzmán Luna, Ph. D. Marianny Yajaira Combariza Ph. D. Codirectora: Paolo Andrea Moreno Ing. Química

ABSTRACT

TITLE: PHYSICOLCHEMICAL VARIABLES INFLUENCE EVALUATION IN RAW GLYCEROL FERMENTATION PROCESS USING A NATIVE MICROORGANISM.*

AUTHOR: DAVID PRIETO; LEIDY ROJAS. **

KEYWORDS: Microorganisms, glycerol fermentation, polyhydroxyalkanoates, *Bacillus circulans*.

Description: Biodiesel is the only bio-fuel capable of replacing its petroleum derived counterpart. It is produced from a transesterification reaction which has a 10% w/w glycerol generation. Since biodiesel has production increase, there's a glycerol accumulation causing a price decrease and it's necessary to research conversion alternatives. In this paper three microorganisms previously isolated from raw glycerol samples from two biodiesel plant in Colombia were evaluated. Each microorganism was fermented using USP glycerol as sole carbon source, in order to assess growth and glycerol consumption. From the previous fermentations, *B. circulans* was found as the microorganism with the highest increase in biomass and glycerol consumption, therefore, best growing conditions were sought. As the best conditions for fermentation process were established as, nutrient broth for the preparation of preinoculum, 37 ° C, pH 6.5 and a concentration of crude glycerol 50 g / L, we proceeded to detect the metabolites produced by *B. circulans*. The Fermentation products obtained were, polyhydroxyalkanoates, ethanol and propanol. Compared with the literature, obtained biomass values in this study were low in contrast to other native organisms used by different authors. Values of efficiency and productivity of ethanol were below those reported; however, we highlight glycerol consumption and polyhydroxyalkanoates productivity, similar to the ones reported by other researchers.

* Grade work

** Physical Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Directoras: Carolina Guzmán Luna , Ph. D. Marianny Yajaira Combariza. Codirector: Paolo Andrea Moreno. Ing. Química.

INTRODUCCION

La economía y estilo de vida de la sociedad actual se basan en el uso de los recursos fósiles para la generación de combustibles y materiales, sin embargo, el aumento en el costo, sostenibilidad, disponibilidad y el impacto que causan sobre el medio ambiente son de gran preocupación, por tanto la búsqueda de nuevas alternativas de energía renovables es de gran interés (González *et al.*, 2007). El biodiesel es el único biocombustible que tiene el potencial para desplazar completamente a su homólogo el petróleo, debido a que es un recurso renovable y es compatible con los motores diesel (Taconi & Jhonson, 2007).

Como resultado del incremento en la producción de biodiesel en el mundo, hay un superávit de glicerol crudo correspondiente al 10% p/p de la producción total, a raíz de este exceso el precio del glicerol ha disminuido y el costo de su refinación se ha vuelto económicamente inviable. Siendo Colombia y Brasil los principales productores de biodiesel en Latinoamérica gracias a que cuentan con abundantes materias primas, se busca que el glicerol no se vuelva una problemática como lo es eventualmente en otros países como Estados Unidos, Europa y Asia.

Entre las opciones para su conversión, están las transformaciones microbiológicas, las cuales buscan microorganismos con la capacidad de utilizar el glicerol como única fuente de carbono para la obtención de productos de interés industrial a condiciones de temperatura y presión moderadas (Silva *et al.*, 2009).

Dado que las variables fisicoquímicas influyen de forma significativa en el metabolismo del microorganismo, este proyecto estudia la influencia de las temperatura, pH y concentración de sustrato, en la fermentación de glicerol crudo utilizando un microorganismo nativo aislado de una muestra de glicerol de una empresa colombiana productora de biodiesel, con el fin de obtener productos de valor agregado y generar menos problemática ambiental.

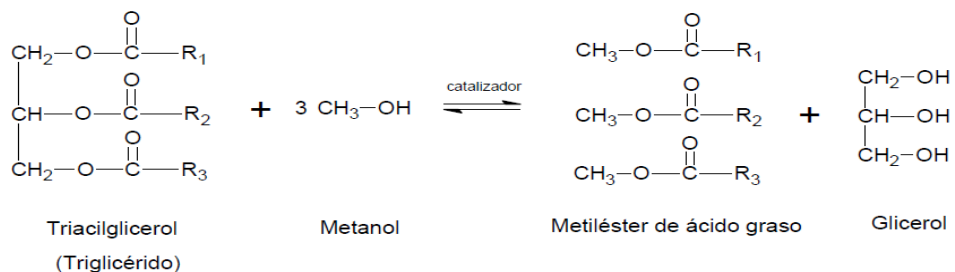
1. MARCO TEORICO

El petróleo es la principal fuente de energía en el mundo, y debido a su acelerado consumo este recurso se está agotando. Como consecuencia de esto, los precios de sus derivados han aumentado considerablemente, siendo los biocombustibles una de las opciones más importantes para su reemplazo, ya que se obtienen a partir de biomasa celular y generan menos problemas ambientales. La principal ventaja del biodiesel se debe a su proceso de producción simple y a la gran variedad de materias primas para su fabricación (Taconi & Jhonson, 2007).

La actual infraestructura de suministro de combustibles consiste en una mezcla de biodiesel con diesel de petróleo que puede estar en diferentes proporciones. En Colombia se ha establecido que esta mezcla debe tener de 5 a 7% de biodiesel y uno de los retos es llegar al 10% (Federación nacional de biocombustibles de Colombia).

La producción de biodiesel se realiza por medio de una reacción de transesterificación a partir de grasas animales o vegetales con un alcohol, en presencia de un catalizador que puede ser KOH o NaOH. En esta reacción, las moléculas de triglicéridos de gran tamaño y ramificadas se transforman a moléculas de menor tamaño de esteres alquílicos de ácidos grasos (Biodiesel) y glicerol (Ver figura 1) (Zapata *et al.*, 2007; Papanikolaou *et al.*, 2004).

Figura 1. Reaccion de Esterificación



Fuente. (Zapata *et al.*, 2006)

Colombia es uno de los principales productores de biodiesel en Latinoamérica, con una producción cercana a 516.000 toneladas en el 2010. En la actualidad cuenta con 7 plantas de biodiesel (Tabla 1), las cuales utilizan el aceite de palma africana como materia prima en su elaboración. (Federación nacional de biocombustibles de Colombia).

Tabla 1. Plantas de Producción de Biodiesel en Colombia

Región	Empresa	Capacidad (ton/año)	Fecha entrada en operación
Norte Codazzi	Oleo flores	50.000	Enero 2008
Norte de Santa Marta	Odin Energy	36.000	Junio 2008
Norte de Santa Marta	Biocombustibles sostenibles del caribe	100.000	Marzo 2009
Oriental Facatativá	Bio D	100.000	Febrero 2009
Central B/bermeja	Ecodiesel de Colombia	100.000	Junio 2010
Norte Barranquilla	CleanEnergy	30.000	Junio 2010
Oriental San Carlos de Guaroa, Meta	Aceites Manuelita	100.000	Julio 2009

Fuente. (Federación nacional de biocombustibles)

1.1 GLICEROL

El glicerol también conocido como glicerina es un alcohol con tres grupos hidroxilos. Es un líquido de aspecto viscoso, incoloro e higroscópico (Ficha internacional de seguridad química), se puede obtener a partir de fermentaciones microbianas o síntesis química de materias primas de los derivados del petróleo, y también puede ser recuperado de la manufactura de jabones. Se usa principalmente en las industrias de alimentos, bebidas, farmacéutica, y cosmética. El glicerol no solo es económico y abundante, sino también ofrece una oportunidad de producir sustancias químicas con rendimientos más altos que los

obtenidos con los azúcares por tener mayor grado de reducción (Silva *et al.*, 2009; Taconi & Jhonson, 2007).

1.2 PROCESOS DE BIOCONVERSIÓN

Los procesos microbiológicos se basan en el uso de microorganismos, cultivados generalmente a gran escala para obtener productos industriales de gran valor o para llevar a cabo procesos de fermentación (Najafpour 2007; Ertola *et al.*, 2007)

El proceso de fermentación se define como la transformación química de compuestos orgánicos realizada por microorganismos con la ayuda de enzimas, llevada a cabo en un fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados a biomasa y metabolitos (Najafpour 2007; Ertola *et al.*, 2007).

Un microorganismo industrial se debe caracterizar por crecer rápidamente y sintetizar el producto deseado en un periodo de tiempo corto. Además debe garantizarse que no sea patógeno y se desarrolle en un medio de cultivo económico. Se ha encontrado que hay una gran variedad de microorganismos que son capaces de desarrollarse utilizando el glicerol como única fuente de carbono y energía en presencia o ausencia de oxígeno. Algunos de estos géneros son *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Yarrowia*, *Saccharomyces* y *Bacillus* (Ertola *et al.*, 2007; Taconi & Jhonson, 2007; González *et al* 2007; Taconi *et al.*, 2009).

Entre los principales productos obtenidos a partir de la fermentación de glicerol se encuentran:

1.2.1 Alcoholes

- 1,3 Propanodiol: utilizado para la producción de plásticos con propiedades específicas, como poliésteres y poliuretanos (Yang *et al.*, 2007).

Butanol: es utilizado como intermediario en procesos de síntesis química y como solvente para una amplia variedad de aplicaciones químicas y en la industria textil. Además se considera que es mejor biocombustible que el etanol por tener menor solubilidad en el agua y ser menos corrosivo, siendo un combustible más adecuado para las máquinas de combustión interna utilizadas actualmente en los automóviles (Keeling *et al.*, 2008).

- Etanol: ha adquirido un gran valor por la posibilidad de su uso como combustible, ya sea mezclado con gasolina o con petróleo y sobre todo porque es una fuente renovable de energía. Su mezcla con los productos anteriores proporciona un combustible de mejor calidad (Hernández, 2007).

1.2.2 Ácidos

- Ácido succínico: ampliamente utilizado en la industria de alimentos, farmacéutica, surfactante y detergentes. Además, es un producto intermedio que puede dar lugar a la formación de 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, γ -butirolactona, ácido adípico, n-metilpirolidona y ésteres lineales (Zeikus *et al.*, 1999).
- Ácido propiónico: usado como un agente antifúngico en alimentos, además puede ser la base para la elaboración de plásticos a base de celulosa, herbicidas, solventes y perfumes (Barbirato *et al.*, 1997).
- Ácido cítrico: es de gran importancia en la industria de alimentos y bebidas, también se utiliza como aditivo en los detergentes, productos farmacéuticos y artículos de tocador (Soccol *et al.*, 2006).
- Ácido láctico: es un producto químico versátil que tiene una amplia gama de aplicaciones en alimentos, cuero, farmacéutica y la industria textil. En la industria química sirve como materia prima para la obtención de otros productos de interés industrial. En las últimas décadas la producción biotecnológica de ácido láctico ha ganado una posición privilegiada en la industria, ya que es rentable y respetuoso del medio ambiente (Rojan *et al.*, 2009).

1.2.3 Otros

- Dihidroxiacetona: usada frecuentemente en la industria cosmética y como elemento versátil para la síntesis orgánica de una gran variedad de productos de química fina (Hekmat *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2005).
- Polihidroxialcanoatos (PHA): son una clase de poliésteres biodegradables producidos y acumulados intracelularmente principalmente por bacterias Gram positivas y Gram negativas, bajo condiciones limitadas de nutrientes en presencia de un exceso de fuente de carbono se acumulan como material de reserva dentro de las células microbianas. Estos son usados en embalaje, medicina y agricultura por su gran variedad de aplicaciones, y se han convertido en fuertes candidatos para el desarrollo de plásticos que sean amigables con el medio ambiente (Sayyed *et al.*, 2008, Yilmaz *et al.*, 2005).

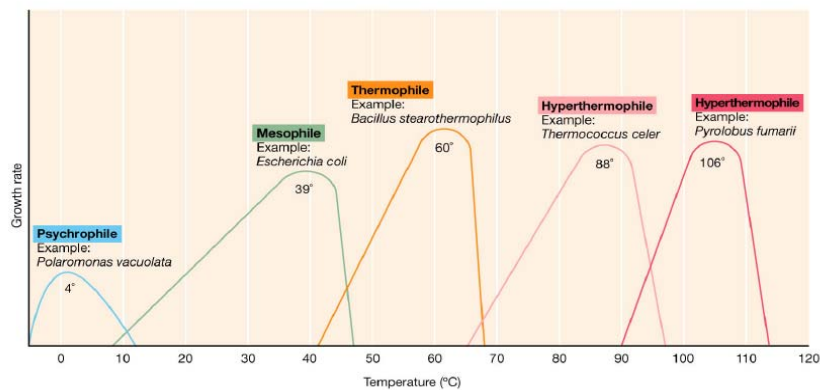
1.3 VARIABLES FISICOQUIMICAS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Los principales factores que afectan el crecimiento y formación de productos son la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes (incluyendo el oxígeno) (Gaden *et al.*, 1959).

1.3.1 Temperatura

Los microorganismos muestran temperaturas de crecimiento mínimas, máximas y óptimas. Estos a su vez se pueden clasificar en: psicrófilos, psicrótrofos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Najafpour 2007; Ertola *et al.*, 2007; Lee 2001) (Figura 2).

Figura 2. Clase de microorganismos según la temperatura

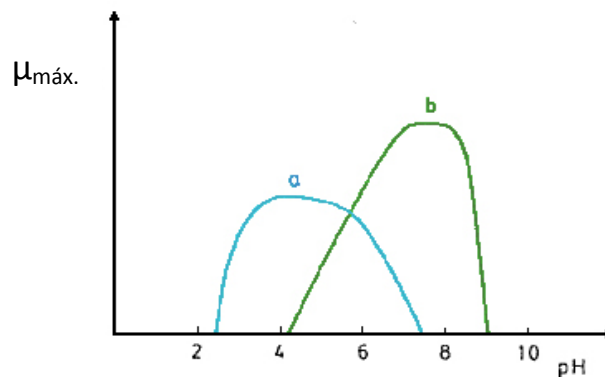


Fuente. (Michael T. Madigan, John M. Martinko. 2004. Brock Biología de los Microorganismos 10ed.)

1.3.2 pH

En general, las bacterias crecen en un intervalo de pH de 4 a 8, con un óptimo entre 6,5 y 7,5, las levaduras de 3 a 6, los mohos de 3 a 7 y las células eucarióticas superiores de 6,5 a 7,5. A medida que crecen los microorganismos estos alteran el pH del medio de cultivo, aumentándolo o disminuyéndolo (Ertola *et al.*, 2007).

Figura 3. Rangos de pH para hongos(a) y bacterias (b) Concentración de nutrientes



Fuente. El Autor

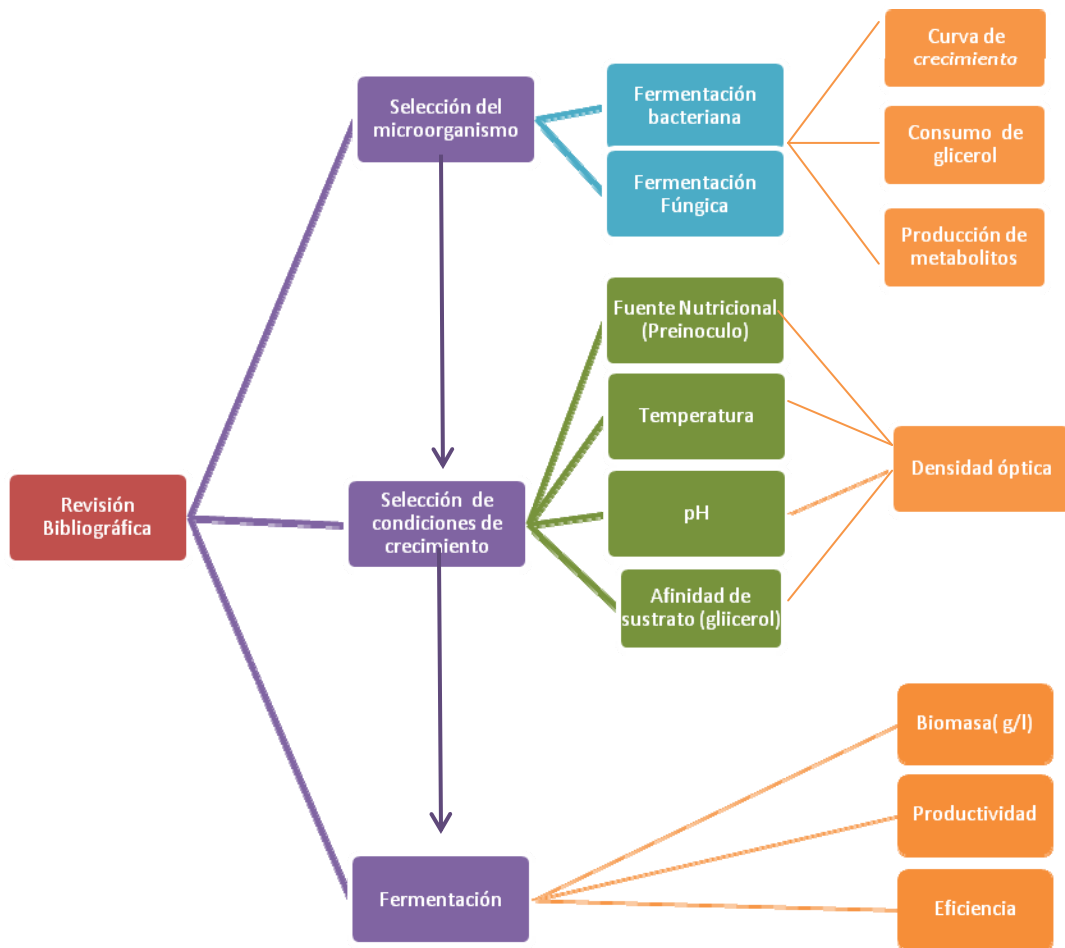
1.3.3 Concentración de nutrientes

Los medios en los que se lleva a cabo la fermentación deben tener los nutrientes necesarios para asegurar una alta productividad de metabolitos de interés. Los nutrientes de naturaleza química deben favorecer los requerimientos del crecimiento y la formación de productos, que garanticen la energía suficiente para la síntesis de metabolitos, así como el mantenimiento celular. Es posible distinguir las siguientes clases de componentes: a) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; b) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan al medio en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y c) Factores de crecimiento que están constituidos por componentes orgánicos en baja concentración y que no son metabolizados ni sintetizados por la célula, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, entre otros (Ertola *et al.*, 2007).

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Un diagrama general de la metodología empleada se presenta en la Figura 4.

Figura 4. Diagrama de la metodología experimental



Fuente. El Autor

2.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

Para seleccionar el microorganismo, se llevaron a cabo fermentaciones utilizando condiciones reportadas en la literatura de temperatura, pH y concentración de

glicerol que favorecen el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos industriales.

Para esto se utilizaron tres cepas nativas –*Aspergillus fumigatus*, *Bacillus circulans* y un consorcio bacteriano- aisladas previamente de muestras de glicerol crudo provenientes de dos empresas colombianas productoras de biodiesel (Ramírez, 2010).

2.1.1 Bacillus circulans y Consorcio bacteriano

Con el fin de potencializar el crecimiento durante la fermentación bacteriana, se preparó un preinóculo de cada cultivo en caldo Luria Bertani (LB) (Xiao *et al.*, 2009), donde el microorganismo creció a una temperatura de 37°C y agitación constante a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5. Una vez alcanzada esta DO se llevó el preinóculo al medio de fermentación (Salinas *et al.*, 2008) con 31,5 g/l de glicerol USP del 85% de pureza (27,4 g/L) como fuente de carbono, a una temperatura de 37°C y un pH de 7 durante 48 horas. El ensayo de fermentación se realizó por duplicado, con una proporción de 5% v/v preinóculo/medio de sales.

2.1.2. Aspergillus fumigatus

Se preparó una suspensión de esporas del hongo al 10% v/v a partir del raspado superficial de un Agar Papa Dextrosa (PDA) con cultivo fresco y mediante diluciones decimales seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (Lemus, 2008), se ajustó a una concentración de 1×10^7 esporas/mL realizando el conteo en cámara de Neubauer (Chaparro, 2010). La fermentación se llevó a cabo en el mismo medio mineral de la fermentación bacteriana con una proporción de 7,4% v/v pre-inóculo/medio de sales (Cruz, 2007). El ensayo se realizó con una velocidad de agitación de 180 rpm a temperatura de laboratorio (21°C) durante 4 días utilizando muestras destructivas.

2.1.3 Curva de crecimiento celular

Para observar el comportamiento microbiano se realizaron curvas de crecimiento con la variable tiempo (h) en el eje de las X y Absorbancia o peso seco (g/L) en el de las Y.

a) Peso seco: se tomaron alícuotas de 4ml en tubos de ensayo previamente pesados y mantenidos en un desecador, posteriormente se centrifugaron para recuperar la biomasa celular y se llevaron a un horno a 105°C hasta peso constante. Con la diferencia de peso se determinó la concentración de biomasa en gramos por litro.

b) Densidad óptica: el crecimiento microbiano se determinó mediante la lectura de las muestras en un espectrofotómetro (*Genesys 20. Thermo Spectronic, NY, USA*) UV-VIS a 540 nm utilizando medio de fermentación como blanco.

c) Cuantificación de consumo de glicerol y metabolitos: el sobrenadante recuperado de la centrifugación del cultivo bacteriano para las bacterias o el obtenido por membranas de filtración para *Aspergillus*, fue analizado por un método cromatográfico.

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido *Agilent technologies* 1100, con detector de índice de refracción (RID) *Agilent technologies* 1200. Se empleó una columna Supelcogel™ C610-H a 40°C, utilizando como fase móvil una solución de ácido sulfúrico 0,8mM con un flujo de 0,8 ml/min. De cada una de las muestras fueron inyectados 25 µL, previa filtración con una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) de 0,45 µm de tamaño de poro. La determinación y cuantificación de las posibles sustancias presentes, se llevó cabo mediante la técnica de patrón externo, usando materiales de referencia grado analítico. Este método cuantifica los ácidos: cítrico, succínico, láctico, acético, y butírico; los alcoholes: metanol, etanol, propanol y butanol; el 1,3-propanodiol y el glicerol.

Con el fin de evaluar la producción de metabolitos, se tuvieron en cuenta dos criterios que relacionan la cantidad de sustrato consumido, la formación de productos y el tiempo de fermentación.

2.1.4 Productividad: la productividad es definida como la concentración final de producto dividido por el tiempo desde la inoculación hasta el final (Gaden, 1959).

$$Q_i = \frac{\text{Masa formada de } l}{V * t}$$

2.1.5 Rendimiento: El rendimiento de sustrato en producto se obtiene de la siguiente forma:

$$Y_{ps} = \frac{\Delta P}{(-\Delta S)_t} = \frac{\text{Producto formado}}{\text{Glicerol total consumido}}$$

En donde el producto formado se expresa en gramos de metabolito sobre la cantidad consumida de glicerol en gramos, como única fuente de carbono (Gaden, 1959).

Al final de la fermentación bacteriana y fúngica se escogió la cepa que mostró mayor aumento de biomasa, consumo de glicerol y producción de metabolitos.

2.2 SELECCIÓN DE CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO ELEGIDO

2.2.1 Fuente nutricional del preinóculo: se inoculó el microorganismo seleccionado en tres diferentes caldos: Luria Bertani (LB), Nutritivo (CN) e infusión cerebro corazón (BHI). LB es rico en péptidos, peptonas, vitaminas y elementos trazas, es comúnmente utilizado en el campo de la microbiología; CN es el más usado cuando se trabaja con microorganismos de escasos requerimientos nutricionales; y BHI es rico en nutrientes y adecuado para el cultivo de

microorganismos exigentes. Se midió la densidad óptica a 540 nm después de 15 horas de crecimiento a 37°C y 200 rpm. Posteriormente con el caldo seleccionado se construyó una curva de crecimiento con el microorganismo para identificar su fase exponencial tardía y poderlo utilizar como preinóculo en las pruebas de fermentación.

2.2.2 Temperatura

Tubos de ensayo que contenían el caldo seleccionado, fueron inoculados con la cepa elegida y se llevaron a incubación a diferentes temperaturas, para observar el crecimiento y la supervivencia del microorganismo. Las temperaturas a consideración fueron: la temperatura del lugar de trabajo (21°C), temperatura ambiente (25°C), temperatura estándar para la mayoría de los microorganismos (37°C) y una temperatura mayor para observar la resistencia del mismo (45°C).

2.2.3 pH se tomaron tubos de ensayo que contenían 3 mililitros del caldo escogido y se inocularon con la cepa elegida, valorando la escala de pH de 3 a 9 (con intervalos de 0,5) a 37°C y sin agitación por un tiempo de 24 horas.

2.2.4 Afinidad por el sustrato: se realizaron siembras del microorganismo en dos caldos de cultivo (tabla 2), para observar y comparar su capacidad de adaptación.

Tabla 2. Descripción caldos de cultivo

COMPONENTE	CALDO 1	CALDO 2
Peptona	Si	Si
Extracto de levadura	Si	Si
Cloruro de sodio	Si	Si
Glucosa	No	No
Glicerol	USP	Crudo

Fuente. El Autor

En cada tubo se evaluaron diferentes concentraciones del glicerol correspondiente y se incubaron a 37°C sin agitación, realizando un ensayo de viabilidad a las 24,

48 y 72 horas. Se construyeron gráficas de Absorbancia Vs concentración de glicerol. Teniendo en cuenta el grado de pureza de cada sustrato (USP y crudo), se hizo la corrección respectiva antes de su valoración.

Todas las pruebas de este capítulo, fueron realizadas por duplicado, utilizando un medio de cultivo como control.

2.3 FERMENTACIÓN

A partir de los valores que mostraron el mayor crecimiento del microorganismo en las pruebas anteriores, se realizó el proceso de fermentación con una proporción 10% preinóculo/medio de sales, tomando muestras cada doce horas durante tres días. Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando un medio de sales como control.

A cada muestra se le realizaron las siguientes pruebas:

- **Medición de biomasa:** Se determinó por el método de peso seco y densidad óptica.
- **Coloración de Gram:** Esta prueba permite la clasificación de las bacterias como Gram positivas o Gram negativas de acuerdo a la composición de su pared celular, mediante el uso de los colorantes cristal violeta y safranina.
- **pH:** Se midió con un pHmetro digital Hanna Instruments pH 211
- **DNS (Acido 3-dinitrosalicílico):** es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácido dinitrosalicílico para la identificación de azúcares reductores mediante determinación espectrofotométrica a 540 nm. Se realizó para determinar si el crecimiento microbiano era producto del consumo de glicerol o de la glucosa proveniente del preinóculo.

- Cuantificación de glicerol y metabolitos: Se determinó por el método de cromatografía líquida (HPLC) citado anteriormente.
- Determinación de la productividad y rendimiento del proceso de fermentación.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software estadístico Statgraphics plus 5.1, StatPointInc, Virginia, USA. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0,05$.

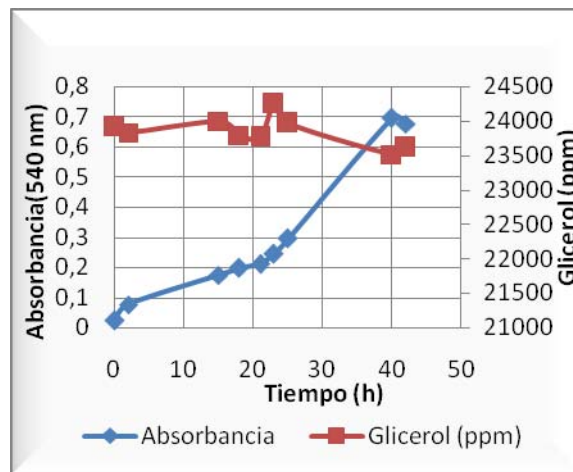
3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

En las gráficas 1 y 3 se observa el crecimiento de las tres cepas aisladas y el consumo de glicerol como única fuente de carbono.

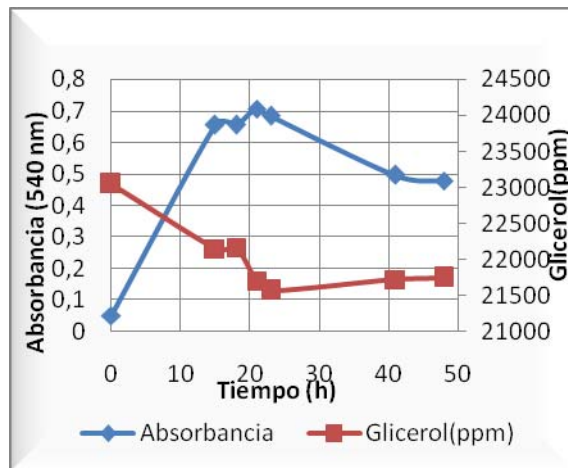
3.1.1. Fermentación bacteriana

Gráfica 1. Crecimiento y consumo de glicerol de *Bacillus circulans*



Fuente. El Autor

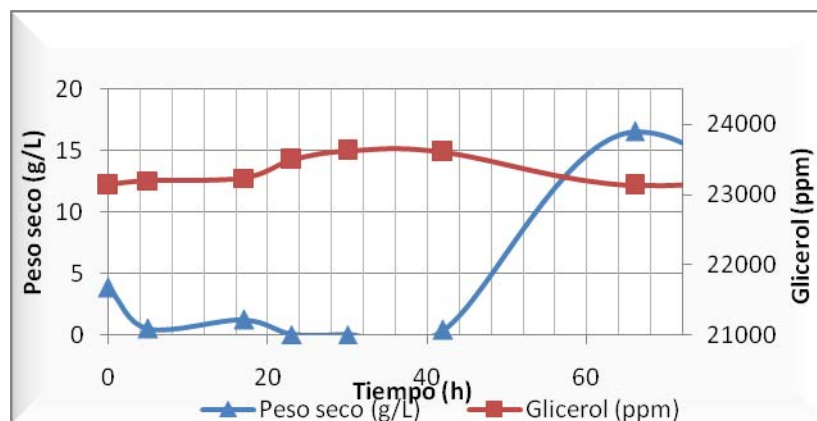
Gráfica 2. Crecimiento y consumo de glicerol de consorcio bacteriano.



Fuente. El Autor

3.1.2. Fermentación Fúngica

Gráfica 3. Crecimiento y consumo de glicerol de *Aspergillus fumigatus*



Fuente. El Autor

Se observa un crecimiento exponencial de las bacterias a diferentes tiempos de incubación. Sin embargo, el consumo de sustrato de *Bacillus circulans* fue significativamente mayor (1295 ppm), que el presentado por el consorcio bacteriano (294,5 ppm).

En el caso del hongo, se observa un crecimiento significativo a partir de las 40 horas de fermentación. El consumo de glicerol fue menor (5,1 ppm) comparado con el obtenido por *Bacillus circulans*.

Las concentraciones de glicerol superiores a la inicial, pueden estar relacionadas con la variabilidad del método de cuantificación del sustrato.

Bajo las condiciones experimentales establecidas, no se detectó la producción de algún metabolito (ácido o alcohol) esperado, a pesar de un descenso en los valores de pH durante la fermentación. Es posible que las concentraciones de los productos de fermentación estén por debajo del límite de detección del método o

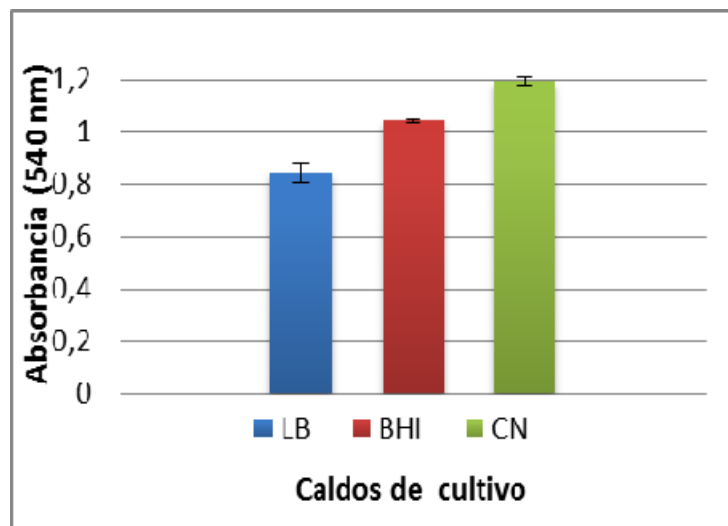
que la naturaleza del compuesto no puede identificarse por el método estandarizado. Análisis por espectroscopia de masas de ionización por electro spray (ESI-MS), detectaron en el sobrenadante la presencia de iones que pueden ser precursores de polihidroxicanoatos (PHA) de muy bajo peso molecular. Dado que especies nativas de *B. Circulans* producen polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxivalerato (PHV), se desarrollo un protocolo usando cloroformo como solvente para la extracción de este metabolito intracelular en la biomasa producida (anexo A).

Teniendo en cuenta el anterior análisis, el microorganismo elegido para evaluar la influencia de las variables fisicoquímicas en el proceso de fermentación con glicerol crudo es *Bacillus circulans*.

3.2. SELECCIÓN DE CONDICIONES

3.2.1 Fuente nutricional del preinóculo

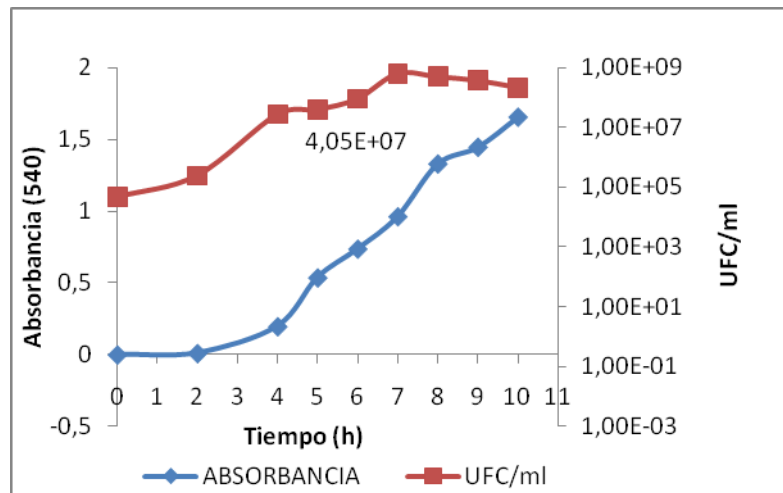
Grafica 4. Crecimiento de *B. circulans* en diferentes medios de cultivo a 37°C, 200 rpm y 15 horas de incubación



Fuente. El Autor

Aunque el caldo Luria Bertani presenta todos los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, *Bacillus circulans* alcanzó un mayor crecimiento en los medios que contenían glucosa como fuente de carbono(anexo B).Adicionalmente se determinó que *B. circulans* no es exigente, debido a que muestra el mejor comportamiento cuando se utiliza caldo nutritivo. A continuación se construyó la curva de crecimiento del microorganismo para identificar su fase exponencial tardía y poderlo utilizar como preinóculo.

Gráfica 4. Crecimiento de *B. circulans*



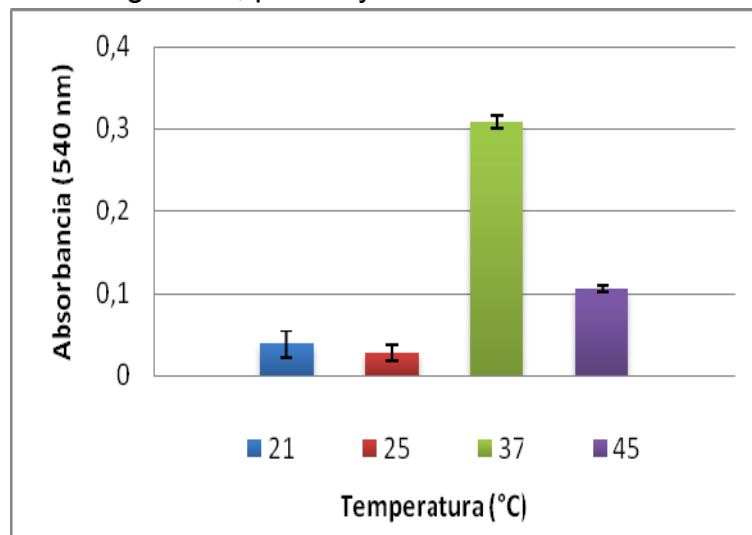
Fuente. El Autor

En la curva de crecimiento de *Bacillus circulans* en caldo nutritivo se observan dos de las 4 fases presentes en el ciclo de vida de una población bacteriana: adaptación y exponencial. La corta fase de adaptación, ratifica la decisión del medio seleccionado. La fase exponencial es donde se encuentra la mayor actividad fisiológica del microorganismo y tiene una duración de 5 horas. Considerando lo anterior y para asegurar una mejor adaptación y crecimiento en el medio de sales, el preinóculo será agregado cuando alcance una densidad óptica de 0,5 ó un recuento de $4,05 \times 10^7$ UFC/mL, lo cual ocurre aproximadamente a las 5 horas del inicio de la inoculación.

3.2.2 Temperatura.

Los resultados evidencian que la mayor producción de biomasa se alcanza a 37°C, siendo este el valor más referenciado en la literatura para el crecimiento microbiano

Gráfica 5. Crecimiento de *B. circulans* a diferentes temperaturas en caldo nutritivo, sin agitación, pH 7.5 y 24 horas de incubación

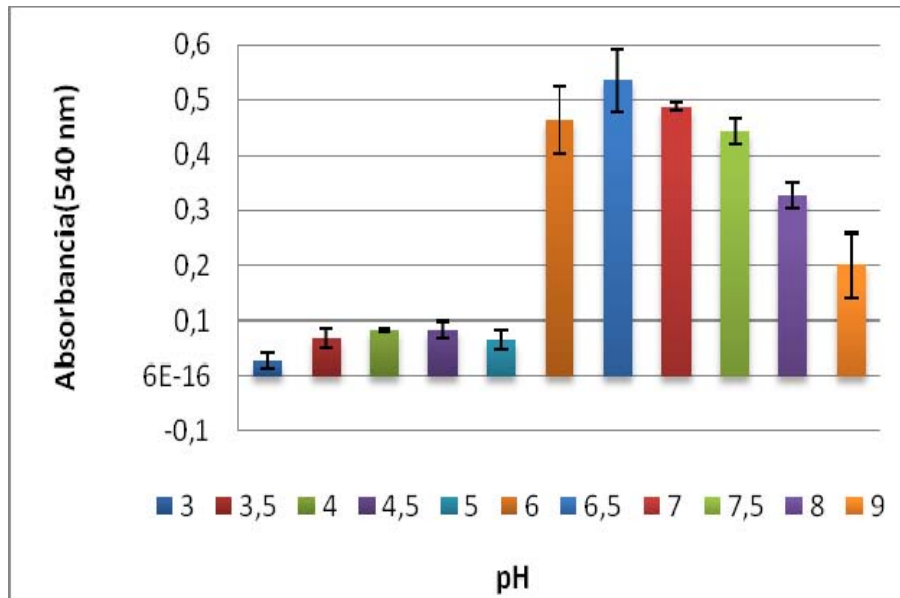


Fuente. El Autor

3.2.3 pH.

Realizando un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de los valores de absorbancia a diferentes pH, se concluyó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pH de 3 a 9, sin embargo, esta diferencia se hace insignificante en el rango comprendido entre 6 y 7.5, coincidiendo con el rango de pH óptimo referenciado en la literatura para el crecimiento bacteriano (Ertola *et al.*, 2007)

Gráfica 6. Crecimiento de *B. circulans* a diferentes valores de pH en caldo nutritivo, sin agitación, 37°C y 24 horas de incubación.

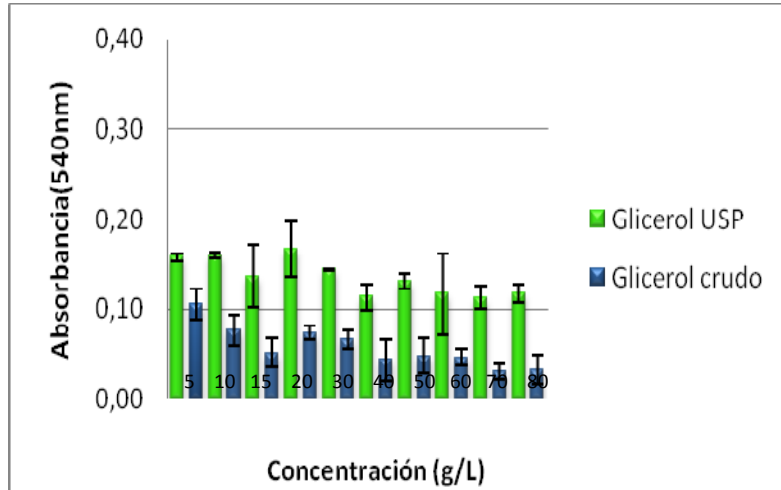


Fuente. El Autor

3.3.4 Afinidad por el sustrato.

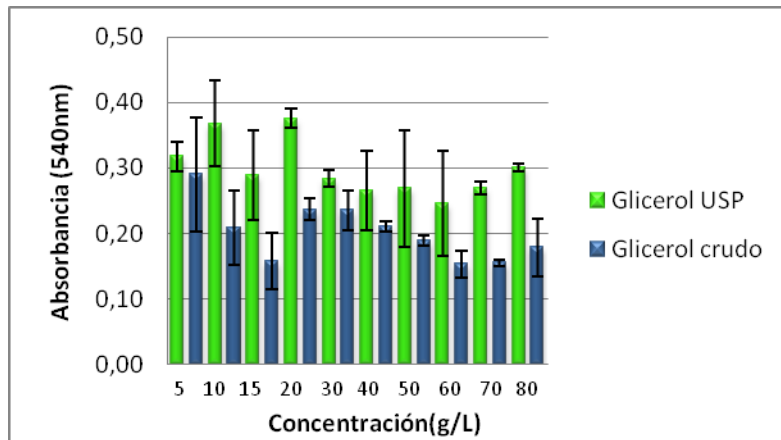
Esta prueba evaluó el crecimiento microbiano en presencia de contaminantes presentes en el glicerol crudo (Anexo C. Caracterización fisicoquímica y espectroscópica de glicerol crudo por el grupo de investigación) y determinó la concentración de sustrato apropiada para agregar al medio de fermentación.

Gráfica 7. Crecimiento de *B. circulans* a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 24 horas de incubación



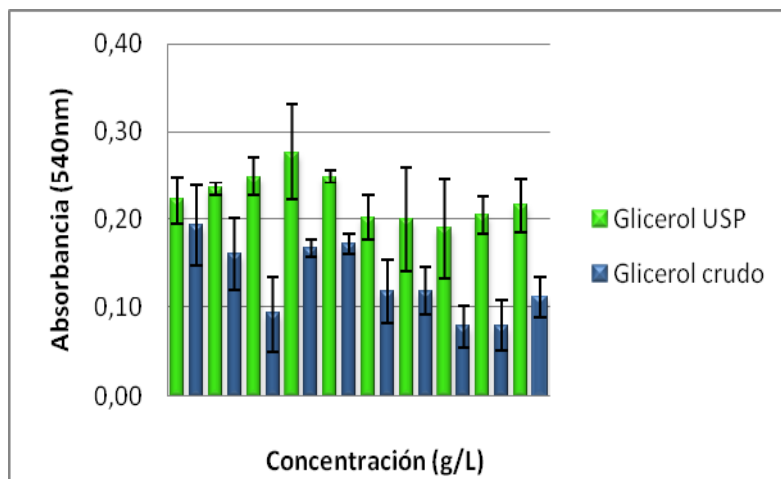
Fuente. El Autor

Gráfica 8. Crecimiento de *B. circulans* a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 48 horas de incubación



Fuente. El Autor

Gráfica 9. Crecimiento de *B. circulans* a diferentes concentraciones de glicerol (Crudo y USP) en caldo nutritivo, pH 7.5, 37°C, sin agitación y 72 horas de incubación



Fuente. El Autor

En cuanto a la calidad del sustrato, hay diferencias estadísticamente significativas ($P: 0.0001$) entre las medias de las lecturas de absorbancia (IC: 95%) en glicerol USP y el glicerol crudo en los diferentes tiempos de fermentación (24, 48 y 72 h). La mayor lectura de densidad óptica (D.O: 0,38) se consiguió a las 72 h de fermentación en glicerol USP (20g/L) y una D.O: 0,29 a las 72 h en presencia de glicerol crudo (5g/L). Es posible que los contaminantes presentes en el glicerol crudo afecten negativamente el crecimiento del microorganismo. Este comportamiento ha sido citado previamente en la literatura (Taconi *et al*, 2009).

En cuanto a la concentración del sustrato, no hay diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$) entre las medias de las lecturas de absorbancia (IC: 95%) de las concentraciones de glicerol USP analizadas (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 g/L) a las 24, 48 y 72 horas de fermentación.

En presencia del glicerol crudo, hay diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre las concentraciones de glicerol crudo analizadas a las 24 y 48 h de

fermentación. A las 72 h de fermentación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$).

Dado que el mayor crecimiento se obtuvo a las 72 h de incubación, y tomando como referencia que no hay diferencias entre las concentraciones de glicerol crudo, se seleccionó la concentración de 50 g/L, por ser ampliamente citada en la literatura (Mohammad *et al.*, 2009).

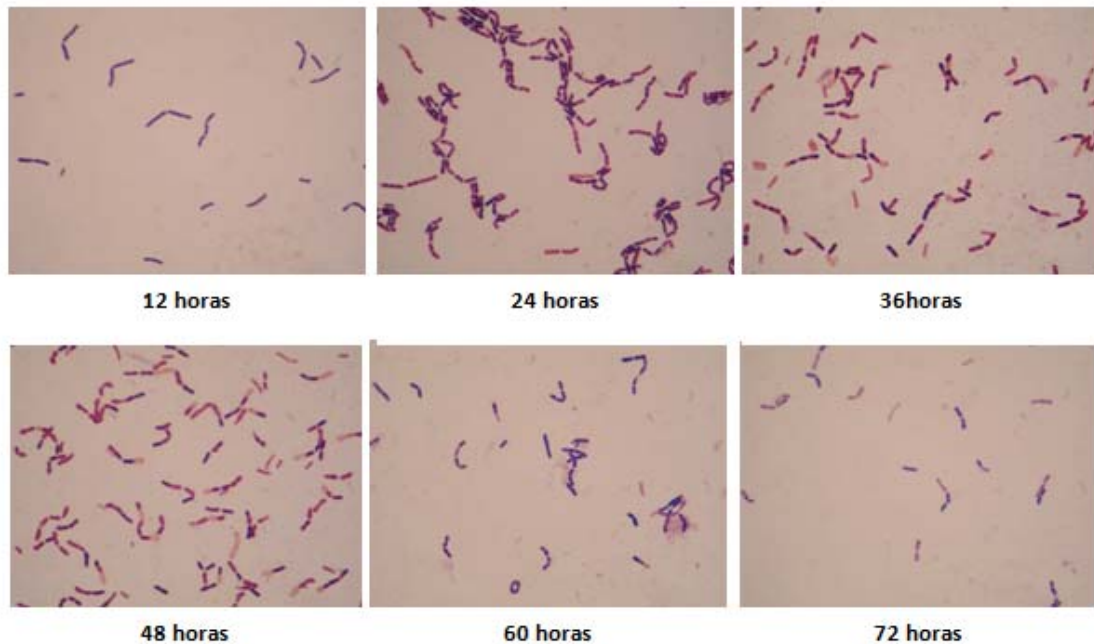
Luego del análisis general de las variables fisicoquímicas: **fente nutricional del preinóculo, temperatura, pH y afinidad por sustrato**, sobresalen las diferencias de lecturas de absorbancia obtenidas por el microorganismo en cultivos con agitación: 200 rpm evaluadas en el primer ítem.

3.3. FERMENTACIÓN

Habiéndose establecido las condiciones de fermentación: caldo nutritivo para la preparación del preinóculo; temperatura de 37°C; pH de 6,5; agitación constante a 200 rpm y una concentración de glicerol crudo de 50 g/L, se procedió nuevamente a detectar los metabolitos producidos *B. circulans*. Al igual que los ensayos realizados, no se realizó ninguna corrección de pH durante el tiempo de fermentación.

En la figura 5, se observan coloraciones de Gram realizadas en los diferentes tiempos de fermentación

Figura 5. Crecimiento de *Bacillus circulans* a diferentes tiempos de fermentación (coloración de Gram)



Fuente. El Autor

Se observa que los microorganismos se tiñeron del color violeta característico de bacterias Gram (+), estas presentan formas bacilares finas y se acomodan en cadenas cortas. Adicionalmente, se puede afirmar que el medio de fermentación permaneció libre de contaminación, garantizando que los metabolitos obtenidos fueron producto de la actividad metabólica de *B. circulans*.

En las coloraciones se observa el deterioro en la membrana del microorganismo (poca retención del colorante) a medida que transcurre la fermentación.

3.3.1 DNS

La concentración de azúcares reductores totales se mantiene constante durante el tiempo de fermentación (1,3 - 1,7 g glucosa/L). Por tanto, se puede afirmar que el

crecimiento y producción de metabolitos de origen bacteriano se dá a expensas del consumo de glicerol como única fuente de carbono.

3.3.2 Cuantificación de metabolitos

En la tabla 3, se observan los resultados obtenidos del proceso de fermentación.

Tabla 3. Fermentación de glicerol crudo 50g/L con *B. circulans* a 37°C y pH de 6,5

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	Metanol(g/L)	Etanol (g/L)	Propanol (g/L)	Y(g metabolito/g glicerol consumido)		Q (g/Lh)	
							Etanol	Propanol	Etanol	Propanol
0	0,1	6,47	56,20	2,04	ND	ND	0	0	0	0
12	0,6	6,40	48,56	1,75	ND	ND	0	0	0	0
24	0,8	5,66	48,37	2,67	0,11	0,08	0,0141	0,0101	0,0046	0,0033
36	1,0	4,85	46,79	2,43	0,12	0,09	0,0123	0,0095	0,0032	0,0025
48	1,2	4,73	45,31	2,77	0,20	0,12	0,0183	0,0110	0,0042	0,0025
60	0,9	4,76	45,73	2,66	0,19	0,12	0,0180	0,0115	0,0031	0,0020
72	1,2	4,73	45,44	2,42	0,24	0,15	0,0220	0,0137	0,0033	0,0020

Fuente. El Autor

En comparación con los resultados obtenidos en la selección del microorganismo, se observa un mayor consumo de glicerol a las 48 h de fermentación (1295 ppm de glicerol USP 27,4 g/L Vs 10890 ppm de glicerol crudo 50 g/L).

En cuanto al pH, es de resaltar la acidificación del cultivo durante el proceso de fermentación.

La biomasa obtenida por *B. circulans* (1,2 g/L a las 72 h de fermentación) es menor que la citada en la bibliografía revisada (Das *et al.*, 2009: 5 g/L, 60 h de fermentación; Ibrahim *et al.*, 2009: 3,7 g/L, 100 h de fermentación y Mohammad *et al.*, 2009: 81,2 g/L, 50 h de fermentación). Los dos últimos investigadores utilizaron *Zobellella denitrificans*, optimizaron el medio de fermentación y realizaron un cambio del tipo de fermentación “batch” a “feed batch”, aumentando la producción de biomasa más de 20 veces su valor inicial.

B. circulans utiliza el glicerol crudo como única fuente de carbono y energía adaptándose a los contaminantes presentes en esta matriz. El consumo de este sustrato a las 72 h de fermentación de 10,76 g/L es comparable con lo citado en la literatura con otros microorganismos nativos (anexo D): Murarka *et al.*, 2010: 8 g/L, *E. coli*; Ibrahim *et al.*, 2009: 10 g/L, *Zobellella denitrificans*; Cárdenas *et al.*, 2006: 15 g/L, *Clostridium* sp.; Mohammad *et al.*, 2009: 81,15 g/L, *Zobellella denitrificans*.

En cuanto a los metabolitos extracelulares determinados por el método de HPLC, se encontró etanol y propanol a partir de las 24 horas de fermentación en concentraciones inferiores a 0,5g/L. Es posible que estos metabolitos sean productos secundarios del metabolismo de *B. circulans*. La producción de etanol en este trabajo (0,24 g/L; Y: 0,0220; Q: 0,0033) es menor comparada con la citada en la literatura (Murarka *et al.*, 2010: 4 g/L; Y: 0,50; Q: 0,0417; Choi *et al.*, 2011: 27 g/L; Y: 0,39; Q: 0,6136).

En la tabla 4, se observan los resultados obtenidos por la cepa en estudio y en la tabla 5, los encontrados con *B. circulans* nativo en diferentes fuentes de carbono.

Tabla 4. Producción de PHA por *B. circulans* utilizando glicerol crudo (50g/L)

Tiempo(h)	Biomasa(g/L)	PHA (g/L)	%PHA	Productividad (g/(L*h))
0	0,1	0,0600	60,0	0,0000
12	0,6	0,0680	11,3	0,0057
24	0,8	0,0700	8,9	0,0029
36	1,0	0,0780	7,9	0,0022
48	1,2	0,0620	5,2	0,0013
60	0,9	0,0560	6,2	0,0009
72	1,2	0,0820	6,8	0,0011

Fuente. El Autor

Tabla 5. Producción de PHA por *B. circulans* en diferentes fuentes de carbono

Autor	Fuente de carbono	Biomasa(g/L)	PHA (%)	Productividad
Shamala et al 2003	Sacarosa (20g/L)	0,2	0,0736	0,0010
Yilmaz et al 2005	Extracto de levadura (2g/L)	1	0,0210	0,0004
Kaynar et al 2009	Extracto de levadura (2g/L)	0,63	0,0620	0,0013

Fuente. El Autor

Al igual que los resultados citados por otros autores, se observa una baja producción de biomasa y PHA por *B. circulans*.

Durante el proceso de fermentación se observa una disminución en la concentración de PHA. Al analizar el medio de sales minerales utilizado y comparar su composición con la literatura, es necesario evaluar otras fuentes de nitrógeno para mejorar la producción de PHA.

En general, los resultados encontrados pueden estar relacionados con la alta presencia de sales de sodio en el medio de fermentación, las cuales provenían de el medio mineral de fermentación, el glicerol crudo y aquellas formadas por la solución de NaOH utilizada en la neutralización en planta de producción de Biodiesel.

CONCLUSIONES

- La selección de variables fisicoquímicas como la temperatura, pH, fuente nutricional del preinóculo, concentración de sustrato y agitación, tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de *Bacillus circulans*. La identificación de rangos favorables determinan la formación de biomasa, así como la producción de metabolitos de interés industrial.
- Comparado con los demás microorganismos nativos identificados, *Bacillus circulans* puede considerarse como un microorganismo de interés industrial dado su crecimiento en compuestos orgánicos de difícil asimilación.
- *Bacillus circulans* produce metabolitos intracelulares como polihidroxicanoatos y metabolitos extracelulares como etanol y propanol utilizando glicerol como única fuente de carbono.
- El aumento en el consumo de glicerol a pesar del cambio del grado de pureza (grado USP a crudo), así como el crecimiento del microorganismo a mayores concentraciones del sustrato, permiten hacer inferencia sobre un posible proceso de adaptación.

RECOMENDACIONES

- Optimizar el medio de cultivo e identificar las rutas metabólicas desarrolladas por el microorganismo para incrementar los rendimientos y las productividades de los metabolitos obtenidos y lograr una mejor rentabilidad del proceso.
- Estandarizar otros métodos analíticos de laboratorio que permitan la identificación de otros metabolitos de interés industrial, como por ejemplo, ciclodextrinas y los biosurfactantes.
- Continuar con la búsqueda de otros microorganismos nativos presentes en muestras de glicerol crudo.

BIBLIOGRAFÍA

BARBIRATO F, Chedaille D, Bories A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *ApplMicrobiolBiotechnol*, 1997.a; 47,P. 441–446.

BAUER R. KatsikisN.Varga S. Hekmat D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacteroxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocessbiosyst*, 2005. Vol 5, p. 37-43

CHAPARRO Pedraza A.P., “Aislamiento e Identificación de Metabolitos Producidos por la Cepa Nativa SPG 321 de *Mucorcircinelloidesy* Evaluación de su Actividad Antimicrobiana”. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2010.

CRUZ Martínez L.C., “Estandarización del Proceso de Producción Masiva del Hongo *Trichodermakoningii* Th003 Mediante Fermentación Bifásica a Escala Piloto”. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2007.

ERTOLA R. Yantorno O. &Mignone C. Microbiología Industrial: medio de fermentación. *BiologíaUnalM* citado el 25 de septiembre, 2007. Disponible en internet. <http://biounalm.blogspot.com/2007/09/libro-microbiologia-industrial-ebook.html>

Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. “Plantas productoras de Biodiesel”. *Fedebiocombustibles*, 11/02/11. Disponible en internet. <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/nota-web-id-271.htm>.

GADEN E. Fermentation process kinetic.En: *Biochemical and Microbiological Technology an Engineering*, 1959. Vol 1 N° 4.p 63.

GONZALEZ R. Yazdani S. Anaerobic Fermentation of Glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry, *Energy biotechnology*, 2007. Vol 18.p 213-216.

HEKMAT D, Bauer R, Fricke J. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacteroxydans*. *BioprocessBiosystEng*, 2003. 26: p109–16.

Hernández M. Tendencias Actuales en la Producción de Bioetanol, - Universidad Rafael Landívar, 2007. [online] 3p.(http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf)

KAYNAR, P & Beyatly, Y. Determination of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. Isolated from intestines of various fishes. Chemistry and Biochemistry, 2009.p. 439-443.

KEELING, C.I. and Bohlmann, J. *Terpenoids in Plants*, in press: Wiley Encyclopaedia of Chemical Biology, 2008. Vol 54.

LEE James. Biochemical Engineering. Version 2.1. Washington State University, Pullman, 2001.p 49-52.

LEMUS G. M, Yuly A. Rodríguez, R. A. Cuervo, J. A. D. V, Zuluaga C. L, Rodríguez G.R. "Determinación de la Factibilidad del Hongo *Metarhiziumanisopliae* Para ser Usado Como Control Biológico de la Hormiga Arriera (*Attacephalotes*)". *Revista Científica Guillermo de Ockham*. 6., 1., 2008. P.91-98.

MOHAMMAD H. Ibrahim A. Steinbuchel A. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. Applied and Environmental Microbiology, 2009.p .6222–6231.

NAJAFPOUR Ghasem D. Biochemical engineering and biotechnology. 1 ed. The Netherlands The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, 2007.P. 1-2-100.

PAPANIKOLAOS. Fick M. Aggelis G. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3propanediol by *Clostridium butyricum*. En: J Chem Technol Biotechnol, 2004. Vol 79.p.1189 - 1191.

RAMIREZ Nathaly, Tarazona Natalia. Utilización de cepas nativas para procesos de fermentación de glicerol crudo proveniente del biodiesel, orientados a la obtención de subproductos de mayor valor agregado. Trabajo de Grado. Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2010.

ROJAN P. John. Anisha G.S., K. Mandhavan Nampoothiri. Ashok Pandey. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. En biotechnology advances, 2009. Volume 27.p.145-152.

SALINAS-Martinez A. De los Santos-Cordoba M. Soto-Cruz O. Delgado E. Perez-Andrade H. Haúad-Marroquin L.A. Medrano-Roldan H. “ Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique”. Environ. Manag. 88,2008. p.115-119.

SAYYED R. Z, Gangurde. N. S, Chincholkar. S.B. Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB *Alcaligenes faecalis*. Indian J Microbiol, 2009. P. 230-332

SILVA G. Mack M. Glicerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: Biotechnology Advances, 2009. Vol 27.P. 30-34.

SOCCOL CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. Food Technol Biotechnol, 2006. 44:p 141–9.

TACONI K. Venkataramanan K. and Johnson D. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC^R6013TM utilizing Biodiesel – derived Crude Glycerol as the sole carbon source. En: Environmental progress & Sustainable Energy, 2009. Vol 28 N° 1.p. 100-104.

TACONI K. Johnson D. The Glycerol Glut: Options for the Value- Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production, 2007. Vol 26 N° 4.P. 338- 345.

XIAO- JUA JI. He Huang. Jun Du. Jian-Guo Zhu. Lu-Jing Ren. Nan Hu. Shuang Li. “Enhanced 2,3 butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two- stage agitation speed control strategy”. Bioresour. Technol, 100, 2009. P.3410-3414.

YANG G, Tian J, LI J. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. 73:p. 1017–24.

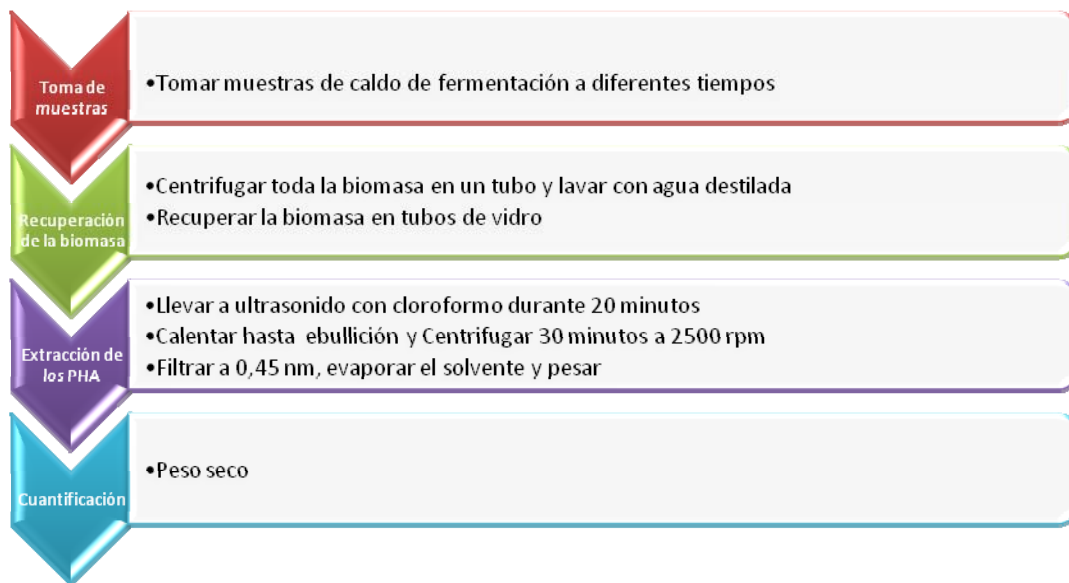
YILMAZ M. Soran h. Beyatli y. Determination of poly- β - hydroxybutyrate (PHA) production by some *Bacillus* spp. World journal of biotechnology, 2005.P. 565-566.

ZAPATA C. Martínez I. Arenas E. Henao C. Producción de biodiesel a partir de aceite crudo de palma: 1. Diseño y simulación de dos procesos continuos. En: Dyna, 2007. Vol 4.

ZEIKUS JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999. 51:5 p. 45–52.

ANEXOS

ANEXO A. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS



ANEXO B. COMPOSICIÓN DE CALDOS DE CULTIVO

Caldo de cultivo	Componente	Cantidad g/L
Luria Bertani	Peptona de caseína	10
	Extracto de levadura	5
	Cloruro de sodio	10
BHI(Cerebro corazón)	Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)	27,5
	D (+) –glucosa	2
	Cloruro de sodio	5
	Hidrógeno fosfato disódico	2,5
Nutritivo	Peptona	15
	Extracto de levadura	3
	Cloruro de sodio	6
	D (+) –glucosa	1

ANEXO C. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE GLICEROL CRUDO (Grupo CEIAM UIS)

PARÁMETRO	RESULTADOS
pH	7,08 ± 0,02
Densidad	1,06 ± 0,01
% Jabones (p/p)	2,29 ± 0,13
% Glicerol (p/p)	49,84 ± 0,06
% Metanol	4,62 ± 0,20
%Sales minerales	2,63± 0,37
%Humedad	41,51± 0,003

ANEXO D. CONSUMO DE GLICEROL Y VARIABLES DE RESPUESTA CONSULTADAS EN LA LITERATURA.

Autor	Microorganismo	t (h)	X (g/L)	C (g/L)	ΔC (g/L)	Metabolito	Y (g/g)	Q (g/Lh)
Cárdenas <i>et al</i> 2006	<i>Clostridium s.p.</i>	72	16	50	15	1,3 PDO (5 g/L)	0,33	0,0694
Mohammadet <i>al</i> 2009	<i>Zobellella denitrificans</i>	50	81,2	15 (Fed batch)	81,15	PHB (54,3 g/L)	0,67	1,0858
Murarka <i>et al</i> 2010	<i>Escherichia coli</i>	96	8	10	8	Etanol (4g/L)	0,50	0,0417
Ibrahim <i>et al</i> 2009	<i>Zobellella denitrificans</i>	100	3.7	20	10	PHB (2.7 g/L)	0,74	0,0272
Das <i>et al</i> 2009	<i>Bacillus circulans</i>	60	5.0	20	N.R.	Biosurfactant e (2.9g/L)	N.R.	0,0483
Choi <i>et al</i> 2011	<i>Kluyveracryocrescens</i>	44	4,9	70	70	Etanol (27.0 g/L)	0,39	0,6136
Vishnuvardhan <i>et al</i> 2009	<i>Bacillus megaterium</i>	48	2482,8	15	N.R.	PHB (15.5 g/L)	0,62	0,3229

t=tiempo; X=Biomasa; C=Concentraci3n de glicerol;ΔC=Consumo de glicerol; Y=Rendimiento; Q=Productividad