

Escalamiento y efecto de los componentes del glicerol crudo sobre la productividad
volumétrica en la fermentación de ácido láctico

Laura Johana Castellanos Suárez

Tesis para optar por el título de Magíster en Ingeniería Química

Director

Luis Javier López Giraldo

Doctor en Química, bioquímica y ciencia de alimentos

Codirectora

Viviana Sánchez Torres

Doctora en Ingeniería Química

Codirector

Said Toro Uribe

Doctor en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Maestría en investigación en Ingeniería Química

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

"... a Dios, el único que es sabio, vaya la gloria mediante Jesucristo para siempre. Amén." Romanos 16:27 A Jehová, porque observo que nunca me ha dejado sola, que es un padre amoroso, que siempre me ha cuidado y guiado a lo largo de la vida. A cada una de las personas que hicieron posible el cumplimiento de esta meta, que con sus palabras, tiempo, presencia y apoyo, me dieron ánimo para continuar, aún en los tiempos más difíciles.

Tabla de Contenido

Introducción	12
1.Objetivos	17
1.1Objetivo General	17
1.2Objetivos específicos.....	17
2.Cuerpo del trabajo	18
2.1Marco referencial	18
2.1.1Glicerol crudo (GlyC)	18
2.1.2Impurezas del GlyC y su influencia en procesos fermentativos	20
2.1.3Ácido láctico	20
2.1.4Escalamiento de procesos fermentativos.....	21
2.1.5Dinámica computacional de fluidos (CFD)	22
2.1.6Modelos cinéticos.....	22
2.2Metodología objetivo 1	24
2.2.1Reactivos	24
2.2.2Caracterización del glicerol crudo.....	24
2.2.3Propiedades físicas del glicerol	25
2.2.4Propiedades químicas del glicerol.....	26
2.2.5Activación e inóculo.....	27
2.2.6Fermentaciones.....	28
2.2.7Cuantificación de biomasa, sustrato y producto.....	28
2.2.8Análisis estadístico	29
2.3Metodología objetivo 2	30
2.3.1Fermentaciones.....	30
2.3.2Efecto individual de los componentes minoritarios	30
2.3.3Efecto de los jabones.....	31
2.3.4Efecto del metanol.....	32
2.3.5Efecto de la FO.....	33
2.3.6Efecto del KCl y del NaCl.....	33
2.3.7Efecto de la interacción de los componentes minoritarios	34
2.3.Diseño de experimentos	35

2.3.9	Cuantificación de biomasa, sustrato y metabolitos.....	36
2.3.10	Análisis estadístico.....	37
2.4	Metodología objetivo 3.....	37
2.4	Fermentaciones.....	37
2.4.2	Cuantificación de biomasa, sustrato y producto.....	37
2.4.3	Análisis estadístico.....	38
2.4	Escalamiento.....	38
2.4.5	Análisis de parámetros reológicos hidrodinámicos.....	38
2.4.6	Análisis CFD.....	40
2.4.6.1	Diseño geométrico.....	40
2.4.6.2	Definición del dominio rotatorio.....	41
2.4.6.3	Selección de la malla y el paquete de fluidos.....	41
2.4.6.4	Simulación.....	42
2.5	Metodología objetivo 4.....	42
2.5.1	Fermentaciones.....	42
2.5.2	Estimación de los parámetros cinéticos.....	43
2.5.3	Selección del modelo.....	45
2.5.4	Identificabilidad de los parámetros cinéticos.....	46
2.6	Resultados objetivo 1.....	47
2.6.1	Caracterización del glicerol crudo.....	47
2.6.1.1	Propiedades físicas del glicerol.....	47
2.6.1.2	Propiedades químicas del glicerol.....	48
2.6.2	Fermentación.....	51
2.6.2.1	Fermentación con GlyP y GlyC como fuente de carbono.....	52
2.7	Resultados objetivo 2.....	58
2.7.1	Efectos individuales de los componentes minoritarios.....	58
2.7.2	Efecto de los jabones.....	59
2.7.3	Efecto del metanol.....	61
2.7.4	Efecto de la FO.....	62
2.7.5	Efecto de KCl y NaCl.....	62
2.7.6	Efectos de la interacción de los componentes minoritarios.....	63
2.8	Resultados objetivo 3.....	72
2.8.1	Fermentaciones.....	72

2.8.2 Escalamiento	76
2.8.3 Análisis de parámetros reológicos e hidrodinámicos:.....	77
2.8.4 Análisis CFD	80
2.8.4.1 Diseño geométrico.....	81
2.8.4.2 Diseño del dominio rotatorio.....	81
2.8.4.3 Selección de la malla y el paquete de fluidos.....	81
2.8.4.4 Simulación.....	82
2.9 Resultados objetivo 4	88
2.9.1 Resultados de las fermentaciones.....	88
2.9.2 Resultados de la estimación de los parámetros cinéticos	91
2.9.3 Resultados selección del modelo.....	92
2.9.4 Resultados análisis de identificabilidad de los parámetros	95
3. Conclusiones	98
Referencias Bibliográficas	100

Lista de Tablas

Tabla 1. Composición general de las muestras de glicerol crudo de distintos países.	19
Tabla 2. Composición general de las muestras de glicerol crudo de industrias colombianas.....	19
Tabla 3. Concentraciones de jabón adicionado (g/L).....	32
Tabla 4. Concentraciones de metanol adicionado (g/L).....	32
Tabla 5. Concentraciones de FO adicionado (g/L).	33
Tabla 6. Concentraciones de Cloruro de potasio (KCl) adicionado (g/L).	33
Tabla 7. Concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) adicionado (g/L).....	33
Tabla 8. Factores y niveles evaluados en el CCD.	36
Tabla 9. Ecuaciones usadas para el análisis reológico he hidrodinámico.	39
Tabla 10. Dimensiones y configuraciones de los biorreactores de 500, 2500 y 5000 mL.....	40
Tabla 11. Expresiones cinéticas aplicadas en la fermentación de ácido Láctico.	45
Tabla 12. Propiedades físicas del glicerol crudo.	47
Tabla 13. Contenido de glicerol, metanol y fracción orgánica.	48
Tabla 14. Composición de la fracción orgánica con saponificación.	49
Tabla 15. Composición de la fracción orgánica sin saponificación.	49
Tabla 16. Análisis elemental del GlyC.....	50
Tabla 17. Composición general de las muestras de GlyC.....	51
Tabla 18. Valores máximos de parámetros de fermentaciones.	53
Tabla 19. Efecto de las concentraciones en la PAL con respecto al blanco.	59
Tabla 20. Resultados del diseño central compuesto para productividades de ácido láctico (PAL)	64
Tabla 21. ANOVA del diseño de superficie de respuesta.....	65

Tabla 22. Parámetros de ajuste y coeficientes para los modelos de regresión de superficie de respuesta	66
Tabla 23. Productividades obtenidas de las pruebas para el análisis de las condiciones de aireación.	72
Tabla 24. Test multivariable de significancia.	73
Tabla 25. Resultado ANOVA univariante multifactorial productividad de biomasa y ácido láctico	74
Tabla 26. Test Tukey para la productividad de ácido láctico.....	75
Tabla 27. Porcentajes de aumento en la productividad de ácido láctico entre los factores.	76
Tabla 28. Resumen del escalamiento adimensional.....	77
Tabla 29. Parámetros medidos para el escalamiento.....	78
Tabla 30. Parámetros reológicos e hidrodinámicos calculados.....	78
Tabla 31. Criterio de selección de propuesta de mejora para 5000 mL.	86
Tabla 32. Comparación de los parámetros principales de los agitadores con volumen de 5000 mL.	86
Tabla 33. Porcentajes de eficiencia de la distribución de la velocidad en el fluido.....	88
Tabla 34. Porcentajes de eficiencia de la distribución de la velocidad en las paredes.....	88
Tabla 35. Estimación de parámetros cinéticos en la fermentación de ácido Láctico.....	92
Tabla 36. Resultados del criterio de selección AIC.	93
Tabla 37. Rendimientos y constantes de mantenimiento para el modelo tipo T1.....	93
Tabla 38. Análisis de sensibilidad de los parámetros cinéticos utilizando el modelo tipo T1 en volúmenes de 500 y 5000 mL.	98

Listas de Figuras

Figura 1. Métodos de caracterización fisicoquímicos del GlyC.	25
Figura 2. Esquema del fraccionamiento químico del glicerol crudo. Adaptado de (Hu et al., 2012)	27
Figura 3. Reacciones químicas que se producen en el fraccionamiento de glicerol crudo.	32
Figura 4. Captación de sustrato para formación de producto, (Doran, 2007).	43
Figura 5. Curva de calibración de densidad óptica vs concentración de biomasa.	52
Figura 6. Logaritmo natural de la densidad óptica en función del tiempo.....	53
Figura 7. Concentración de glicerol en función del tiempo.....	54
Figura 8. Concentración de ácido láctico en función del tiempo hasta la t=60 h.....	55
Figura 9. Perfiles de pH en función del tiempo.....	56
Figura 10. Porcentaje de conversión de glicerol.....	57
Figura 11. Productividad de ácido láctico en función del tiempo.....	58
Figura 12. Efecto de los componentes minoritarios a diferentes concentraciones sobre la productividad del ácido láctico.....	60
Figura 13. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados.	65
Figura 14. Superficies de respuesta para la productividad de ácido láctico.....	67
Figura 15. Perfiles de deseabilidad para la productividad de ácido láctico.....	70
Figura 16. Diagrama de barras de la productividad de ácido láctico y biomasa en diferentes volúmenes de fermentación.....	73
Figura 17. Resultados de la productividad de ácido láctico en diferentes volúmenes de fermentaciones aerobias y anaerobias.	74
Figura 18. Relación volumen de fermentación versus tiempo de mezcla.	80
Figura 19. Aplicación de booleanos en el diseño geométrico de los biorreactores.....	81
Figura 20. Modelos geométricos de los fermentadores de izquierda a derecha de los volúmenes de fermentación de 500, 2500 y 5000 mL con malla de tamaño normal.	81
Figura 21. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 500 mL.....	82
Figura 22. Perfil de velocidad para volumen de fermentación de 2500 mL.	83
Figura 23. Perfil de velocidad para volumen de fermentación de 5000 mL.	85

Figura 24. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL con la implementación de las mejoras.	87
Figura 25. Curva de concentración de AL en función del tiempo.	89
Figura 26. Curva de concentración de biomasa en función del tiempo.	90
Figura 27. Curva de concentración de GlyC en función del tiempo.	90
Figura 28. Representación gráfica de los datos experimentales y modelos cinético tipo T1 ajustado para el volumen de 25 mL.	94
Figura 29. Representación gráfica de los datos experimentales y modelo cinético tipo T1 ajustados para el volumen de 500 mL.	94
Figura 30. Representación gráfica de los datos experimentales y modelo cinético tipo T1 ajustados para el volumen de 5000 mL.	95
Figura 31. Análisis de sensibilidad de los parámetros cinéticos utilizando el modelo tipo T1 en el volumen de 25 mL.	96

Resumen

Título: Escalamiento y efecto de los componentes del glicerol crudo sobre la productividad volumétrica en la fermentación de ácido láctico *

Autor: Laura Johana Castellanos Suárez **

Palabras Clave: Glicerol, ácido láctico, caracterización, componentes minoritarios, escalamiento, hidrodinámica, reología, modelo cinético.

Descripción:

El glicerol crudo (GlyC) es el principal subproducto en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales, actualmente este se considera un residuo industrial, lo que le otorga un gran potencial como materia prima para otros procesos. Una alternativa reciente para su valorización es la bioconversión del GlyC en metabolitos de interés industrial como lo es el ácido láctico (AL). No obstante, uno de los principales retos en su utilización es la variabilidad en su composición que depende de múltiples factores relacionados con la producción de biodiesel. Por otro lado, para la implementación de este bioproceso a gran escala existen desafíos en cuanto a su escalamiento asociados con la transferencia de calor y masa en los biorreactores. De igual forma, también se requiere conocer el comportamiento cinético microbiano para analizar la influencia de las variables químicas, físicas y operacionales.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica de tres GlyC colombianos, muestras (S1, S2 y S3), donde se encontró que la muestra S3 tenía mayor potencial como fuente de carbono por su alto contenido de glicerol y bajo contenido de impurezas. Luego se determinó la influencia de los componentes minoritarios en las fermentaciones de AL empleando la bacteria *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469 y se obtuvo que los jabones y fase orgánica (FO) tenían un efecto positivo en la productividad volumétrica del AL, por el contrario, el metanol ejercía un efecto negativo. Después se estudiaron las condiciones de agitación (190, 167 y 210 rpm) en cambios de escala de (500, 2500 y 5000 mL), mediante parámetros reológicos y hidrodinámicos empleando la dinámica computacional de fluidos. Por último, se realizó el ajuste de 6 modelos cinéticos en tres volúmenes de fermentación (25, 500 y 5000 mL) obteniendo los mejores resultados con el modelo tipo Tessier (T1).

* Trabajo de Grado

** Facultad de ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Luis Javier López Giraldo. PhD. Codirector: Viviana Sánchez Torres. PhD. Codirector: Said Toro Uribe. PhD.

Abstract

Title: Scaling and effect of crude glycerol components on volumetric productivity in lactic acid fermentation*

Author: Laura Johana Castellanos Suárez**

Key Words: Glycerol, lactic acid, characterization, minor components, scaling, hydrodynamics, rheology, kinetic model.

Description:

Crude glycerol (GlyC) is the main by-product in the production of biodiesel from vegetable oils and is currently considered an industrial waste, which gives it great potential as a raw material for other processes. A recent alternative for its valorization is the bioconversion of GlyC into metabolites of industrial interest such as lactic acid (AL). However, one of the main challenges in its use is the variability in its composition, which depends on multiple factors related to the production of biodiesel. On the other hand, for large-scale implementation of this bioprocess there are scaling challenges associated with heat and mass transfer in bioreactors. Likewise, it is also necessary to know the microbial kinetic behavior to analyze the influence of chemical, physical and operational variables.

Therefore, in the present work, the physicochemical characterization of three Colombian GlyC samples (S1, S2 and S3) was carried out, where it was found that sample S3 had greater potential as a carbon source due to its high glycerol content and low impurity content. The influence of minority components on AL fermentations was then determined using the bacterium *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469 and it was found that soaps and organic phase (FO) had a positive effect on the volumetric productivity of AL; on the contrary, methanol exerted a negative effect. Then, the agitation conditions (190, 167 and 210 rpm) were studied at scale changes of (500, 2500 and 5000 mL), by means of rheological and hydrodynamic parameters using computational fluid dynamics. Finally, 6 kinetic models were fitted in three fermentation volumes (25, 500 and 5000 mL) obtaining the best results with the Tessier type model (T1).

* Degree Work

** Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Luis Javier López Giraldo.

Chemical Engineer, PhD. Codirector: Viviana Sánchez Torres. PhD. Codirector: Said Toro Uribe. PhD.

Introducción

En los últimos años, el uso de biocombustibles ha sido ampliamente desarrollado y su producción ha crecido exponencialmente. El glicerol crudo (GlyC) es el principal subproducto obtenido de la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales, en cantidades que varían del 10 - 40% en peso (Dobson et al., 2012). En Colombia, en el 2019 la producción de biodiesel alcanzó las 535.416,70 toneladas, lo cual representa aproximadamente 59 mil toneladas de GlyC y se estima que su manufactura sea 6 veces mayor que la demanda en el mercado (Ciriminna et al., 2014; Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2020). Esta sobreproducción ha convertido al GlyC en un residuo industrial, lo cual le otorga un gran potencial para ser usado como materia prima en otros procesos debido a su bajo precio comercial y abre oportunidades para su valorización (F. Yang et al., 2012).

En Colombia, la disposición de la mayor parte de dichas cantidades, que actualmente ya supera en gran medida el consumo nacional, se exporta al mercado internacional, destinada a plantas reprocesadoras en Estados Unidos o Canadá donde se refina para atender mercados especializado (Indupalma, 2003). Pero incluso este mercado se ha reportado como inestable e incapaz de absorber el aumento en la producción de GlyC generado (F. Yang et al., 2012). Así mismo, los contaminantes que se encuentran en éste hacen que su purificación sea costosa y que requieran procesos especializados de alto valor en la industria (Cardeño et al., 2011; Chol et al., 2018; Nanda et al., 2014).

Está claro que se necesitan nuevos procesos, químicos y biotecnológicos, para transformar el GlyC en productos de mayor valor agregado (Abdel-Rahman et al., 2011; Aragón C. & Montoya C., 2010; Posada Duque & Cardona Alzate, 2010). Algunas de las aproximaciones que se usan

actualmente son su combustión, producción de biogás a partir de digestión anaerobia (Vlysidis et al., 2011), procesos de purificación (Nanda et al., 2014; Santibáñez et al., 2011) , además de procesos biotecnológicos en los cuales se da bioconversión del GlyC a metabolitos de interés industrial (Dobson et al., 2012; Lizcano-Gonzalez, Victor Alexis, Escalante Hernández, Humberto, Quintero Silva, 2017). Dentro de los procesos biotecnológicos se pueden mencionar la obtención de 1,3 propanodiol (Aragón C. & Montoya C., 2010; Petrov & Stoyanov, 2012; Song et al., 2013), ácido cítrico, etanol, butanol (Dobson et al., 2012), y polihidroxicanoatos (Lizcano-Gonzalez, Victor Alexis, Escalante Hernández, Humberto, Quintero Silva, 2017). La producción de ácido láctico (AL) se presenta como una opción innovadora y competitiva (de Lima et al., 2010; Diaz Ruiz & Prada Palomo, 2012a; Gamboa & Lizcano, 2013; Pansuriya & Singhal, 2011), dada la gran cantidad de aplicaciones que éste tiene dentro de la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y química (Kennedy et al., 1982; Young-Jung Wee, Hyang-Ok Kim, 2006).

Sin embargo, uno de los principales desafíos para la utilización de GlyC como sustrato es la variabilidad de su composición, ya que depende de las materias primas, los procesos de producción y los tratamientos posteriores involucrados en la producción de biodiesel. A pesar de la importancia de la composición química del GlyC, se han encontrado pocos referentes sobre la caracterización del mismo (Hu et al., 2012; Nanda et al., 2014; Pal & Chaurasia, 2016). Entre las impurezas del GlyC se encuentran jabones, ácidos grasos libres (FFA), ésteres metílicos de ácidos grasos FAMES, glicéridos, metanol, cenizas y metales (Pal & Chaurasia, 2016; Venkataramanan et al., 2012) .

Las impurezas presentes afectan significativamente las propiedades del GlyC y, por lo tanto, su conversión a productos de valor agregado. Por ejemplo, se ha encontrado que el jabón y el metanol influyen negativamente en la producción de ácido docosahexaenoico (DHA) por algas

a partir de GlyC (Ethier et al., 2011), y la alta salinidad del GlyC puede inhibir la actividad microbiana en su digestión anaeróbica (Santibáñez et al., 2011). Así mismo, Gamboa & Lizcano (2015) evidenciaron que el GlyC empleado como sustrato en fermentación ácido-láctica, permite obtener mayores productividades de ácido láctico en comparación con las obtenidas en las pruebas empleando glicerol puro (GlyP), sin embargo, no identificaron la causa de este fenómeno (Gamboa-Rueda et al., 2015).

Por otra parte, El escalamiento es un tema muy importante en el desarrollo de procesos, pues de él depende la producción en grandes volúmenes de un producto de interés y la rentabilidad de éste (Imamoglu & Sukan, 2013; Liew, 2004; Marques et al., 2010b). Sin embargo, existen desafíos importantes debido a los problemas asociados a la transferencia de calor y masa en los biorreactores, dado que afectan la distribución de los nutrientes, generando gradientes de de concentración (Bylund et al., 1998; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; Hewitt et al., 2000). Lo anterior, genera un distanciamiento de las condiciones óptimas en escala laboratorio con las encontradas a mayores escalas (P. M. Doran, 2007; Gelves et al., 2013; Margaritis & Zajic, 1978). En consecuencia, la mayoría de los procesos de fermentación a gran escala obtienen rendimientos y productividades menores a los esperados.

Un escalamiento exitoso depende de la correcta selección de parámetros como la aireación y la agitación, que permitan una distribución uniforme de los nutrientes. Existen herramientas para evaluar el escalamiento de los bioprocesos como la dinámica computacional de fluidos (CFD), la cual consiste en el uso de software para obtener una aproximación de la hidrodinámica del fluido utilizando diseños de los biorreactores en 3D. Esta aproximación permite simular como varía el comportamiento hidrodinámico de la fermentación, empleando diferentes configuraciones y variables del proceso, con el fin de determinar las mejores condiciones de diseño y operación sin

generar costos adicionales (Aballay et al., 2012; Aslanbay Guler et al., 2019; Buss et al., 2017; Rana, 2015).

En la implementación de los procesos fermentativos a gran escala, también se requieren conocer el comportamiento cinético microbiano. Su importancia deriva en que las ecuaciones resultantes permiten analizar la influencia de variables químicas, físicas y operacionales, que controlan el comportamiento metabólico de los microorganismos (P. M. Doran, 2007; Michael L Shuler; Fikret Kargı; Matthew DeLisa, 2017); es decir el crecimiento de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico (Cheng et al., 2019; Gamboa-Rueda et al., 2015).

De acuerdo con lo expuesto en los párrafos anteriores, es vital comprender el efecto de las impurezas del GlyC sobre las reacciones catalizadas por microorganismos, de igual manera, es necesario conocer la influencia del aumento de escala en el proceso fermentativo. En este sentido, este proyecto de investigación explica el efecto de la composición química del GlyC sobre la productividad volumétrica del ácido láctico. Así mismo analiza el comportamiento de los parámetros reológicos e hidrodinámicos en diferentes volúmenes de fermentación (500, 2500 y 5000 mL). Por último, realiza un ajuste y validación de un modelo cinético para los volúmenes de fermentación anteriormente mencionados.

Cumpliendo con este alcance, en el presente trabajo de investigación se desarrollaron las siguientes etapas: a) caracterización química de tres muestras de GlyC y una muestra GlyP, b) identificación de los compuestos del GlyC que afectan significativamente la productividad volumétrica del AL, c) diseño de experimento de mezclas para evaluar la productividad de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en un medio de fermentación en donde se usa GlyP y se adicionan los compuestos identificados en el literal b, d) determinación de las condiciones de oxígeno que favorecen la producción de AL, e) estudio de los parámetros reológicos e

hidrodinámicos en el proceso de escalamiento, f) simulación de las condiciones de mezclado en los volúmenes de fermentación empleados en el literal e) utilizando dinámica computacional de fluidos (CFD), g) ajuste de un modelo cinético para la producción de AL por vía fermentativa.

Palabras claves: caracterización, cinética, modelo, productividad, glicerol crudo GlyC, ácido láctico, escalamiento, CFD.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la influencia de las condiciones de proceso sobre la productividad volumétrica en la obtención de ácido láctico por vía fermentativa, empleando glicerol residual de la industria del biodiesel colombiana.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la variabilidad de los compuestos minoritarios del GlyC proveniente de 3 plantas de biodiesel colombianas, mediante su caracterización fisicoquímica.
- Evaluar la influencia de los compuestos identificados como potenciales sustratos en el proceso de producción fermentativa del ácido láctico.
- Estudiar la influencia de los parámetros reológicos e hidrodinámicos sobre el proceso de producción de ácido láctico en diferentes volúmenes de fermentación (25, 500 y 2500 mL).
- Evaluar el efecto del cambio de volumen de fermentación sobre los parámetros cinéticos de modelos no segregados – no estructurados.

2. Cuerpo del trabajo

2.1 Marco referencial

2.1.1 Glicerol crudo (GlyC)

El glicerol crudo (GlyC) por sus siglas en inglés es el principal subproducto de la producción de biodiesel por transesterificación de lípidos y generalmente, equivale al 10% del biodiesel total producido (F. Yang et al., 2012), actualmente existe un interés global por la producción de biodiesel y, en consecuencia, la necesidad de formular alternativas de gestión sostenible de sus subproductos. Sin embargo, el GlyC que se produce no es lo suficientemente puro para usarse directamente en aplicaciones tradicionales, lo que supone un problema debido a las grandes cantidades generadas, haciendo difícil su disposición final. Los principales componentes del GlyC son el glicerol libre y el agua (Pal & Chaurasia, 2016); además, presenta un contenido de impurezas o componentes minoritarios tales como jabones, metanol, cenizas y sales. La composición del GlyC tiene una alta variabilidad, dependiendo de la materia prima (aceite vegetal o grasa), el catalizador del proceso de transesterificación, separación y purificación del biodiesel; como se evidencia en la Tabla 1, donde se reportan la composición del GlyC a nivel mundial. Así mismo, En la Tabla 2 se observan las composiciones para GlyC de origen nacional, entre los cuales se destaca su alto contenido de glicerol libre.

La purificación del GlyC da como resultado un glicerol con condiciones aptas para ser utilizado como materia prima en la industria farmacéutica y cosmética. No obstante, las empresas productoras de biodiesel optan por vender el GlyC sin ningún tratamiento adicional, ya que actualmente el proceso de purificación es muy costoso (Chol et al., 2018). En el área de bioprocesos, el GlyC es un subproducto de gran interés, como una fuente de carbono para la síntesis

de diferentes bioproductos, tales como biopolímeros, hidrógeno, diferentes ácidos como el cítrico y el ácido láctico (AL), etc.; lo que, sumado a su abundancia y a su bajo costo, hacen del GlyC un compuesto con gran potencial para ser usado como materia prima en la generación de productos con un mayor valor agregado (Posada Duque & Cardona Alzate, 2010).

Tabla 1.

Composición general de las muestras de glicerol crudo de distintos países.

Parámetro\ País	Japón	Korea del Sur	Tailandia	Malasia	Polonia		
Materia prima	Girasol	Soya	Residuos de aceite vegetal	Palmiste	Colza		
pH	12,5	--	--	9,08	12,8	--	--
Glicerol libre p/p%	30	75,56	63,7	36,7	20,2	76	65
Humedad p/p%	2	12,6	0,07	14,7	3	19,5	26
Cenizas p/p%	3	3,93	2,27	4,31	64,3	4	5
Mong p/p%	Metanol	50	0,2	2,66		0,1	3
	Jabones	13		44	12,4	0,8	1
	OMO	2	7,71	31,3			

Mong: Materia orgánica no glicerol; OMO: Otra materia orgánica. Tomada de (Moreno, 2015)

Tabla 2.

Composición general de las muestras de glicerol crudo de industrias colombianas.

Parámetro\ (Referencia)	(Moreno, 2015)	(Mellow & Banana, 2016)	(Cardeño, 2011)
pH	6,41 ± 0,12	7,66	--
Glicerol libre p/p%	47,42 ± 0,02	84,03	84,6
Humedad p/p%	45,42 ± 0,02	10,63	4,82
Cenizas p/p%	2,85 ± 0,25	4,57	5,17
Mong p/p%	Metanol	3,57 ± 0,05	≤0,02
	Jabones		
	OMO	1,34 ± 0,17	0,79

Mong: Ma Mong: Materia orgánica no glicerol; OMO: Otra materia orgánica (Cardeño et al., 2011; Mellow & Banana, 2016; Moreno, 2015).

2.1.2 Impurezas del GlyC y su influencia en procesos fermentativos

En estudios anteriores, han encontrado que las impurezas o componentes minoritarios presentes pueden afectar significativamente las propiedades del GlyC y, por tanto, se espera que influyan en los procesos fermentativos. Por ejemplo se ha encontrado que el jabón y el metanol impactan negativamente en la producción de ácido docosahexaenoico (DHA) usando algas y GlyC como fuente de carbono (Beckers et al., 2016; Poblete-Castro et al., 2014), además, la alta salinidad del glicerol crudo puede inhibir la actividad microbiana en su digestión anaeróbica (Santibáñez et al., 2011). En contraste, se obtuvieron mayores productividades empleando GlyC en fermentaciones ácido-lácticas, comparadas con las obtenidas usando glicerol puro (GlyP) (Gamboa & Lizcano, 2013). Así mismo, en el capítulo 1 se encontraron diferencias entre las productividades obtenidas de cada muestra de GlyC, de acuerdo con la variabilidad en los componentes minoritarios.

De acuerdo con lo expuesto en párrafos anteriores es imperativo evaluar el efecto de las impurezas o componentes minoritarios del GlyC de forma individual y su interacción, sobre la productividad volumétrica en reacciones catalizadas por microorganismos. Por un lado, se espera tener una mayor comprensión de cómo afectan las impurezas a los procesos microbiológicos, y por otro, determinar las concentraciones de impurezas que favorecen las fermentaciones ácido-lácticas, de tal suerte que se puedan considerar para mejorar los procesos fermentativos.

2.1.3 Ácido láctico

El ácido láctico (AL) es un compuesto orgánico utilizado en la industria alimentaria como aditivo y conservante de productos cárnicos, lácteos, cereales, bebidas y en la producción de plásticos biodegradables (Fernández & Rendueles De La Vega, n.d.; Okano et al., 2010). La síntesis

de este compuesto puede darse por fermentación o síntesis química. Ésta última no es fácil de implementar debido a que los procesos no son viables ni técnica, ni económicamente (John et al., 2007). En contraste, se han implementado bioprocesos que involucran la fermentación de distintos tipos de materia orgánica como fuente de carbono, entre los cuales se destaca el glicerol crudo (GlyC), el cual es el principal subproducto de la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (Dobson et al., 2012). Así mismo, en el proceso de obtención del AL se emplean diferentes tipos de microorganismos (MO), como es el caso de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 que en estudios anteriores demostró sintetizar el metabolito de interés con conversiones de hasta 94,5% (Gamboa-Rueda et al., 2015).

2.1.4 Escalamiento de procesos fermentativos

La fermentación para obtención de AL a escala industrial presenta retos importantes con respecto a su escalamiento debido a que, durante el cambio de volumen de trabajo, surgen problemas asociados con la hidrodinámica de los biorreactores, como lo son la distribución no homogénea de los nutrientes, problemas asociados con transferencia de calor y masa, entre otros. Lo anterior, genera un distanciamiento de las condiciones óptimas encontradas a escala laboratorio, lo que afecta de manera negativa la productividad del bioproceso (Bylund et al., 1998; Hewitt et al., 2000). Un escalamiento exitoso depende de la selección correcta de parámetros de agitación y aireación efectivos de los fluidos presentes, propiciando la distribución uniforme de los nutrientes durante el proceso fermentativo (Gelves et al., 2013). Para cumplir este propósito, existen distintos tipos de aproximaciones de escalamiento, los cuales dependen de las variables adimensionales que describen el comportamiento hidrodinámico (Marques et al., 2010a).

Hiruta (1996) realizó un escalamiento de 30 L a 1 m³, para la producción de un lípido con alto contenido de ácido γ -linolénico, manteniendo constante la velocidad de la punta del impulsor; se logró aumentar 18,3% el valor de γ -ácido linolénico en los lípidos (Hiruta et al., 1996). Para el caso de Esra (2013), se realizó el escalamiento de 100 mL a 10 L para la producción de bioetanol, empleando como criterio de escalamiento el número de Reynolds (Re) y la velocidad de la punta de impulsor (V_{tip}), obteniendo una productividad volumétrica de 0,21 gL⁻¹h⁻¹, 88% mayor en el reactor de 10 L en comparación con el valor alcanzado en el reactor de 100 mL (Imamoglu & Sukan, 2013). Las metodologías empleadas en los estudios mencionados demuestran que los parámetros seleccionados son apropiados para la evaluación del escalamiento.

2.1.5 Dinámica computacional de fluidos (CFD)

El comportamiento hidrodinámico de los procesos fermentativos también es analizado por la dinámica computacional de fluidos (CFD), la cual permite obtener aproximaciones del fluido cuando se modifican variables como el tipo de agitador (Buss et al., 2017), las condiciones de mezclado (Aballay et al., 2012), comparación entre equipos (Aslanbay Guler et al., 2019), entre otros. Este tipo de análisis también puede ser usado en procesos donde se realizan cambios de escala utilizando parámetros reológicos e hidrodinámicos como criterios de escalado (Rana, 2015), debido a que se pueden realizar aproximaciones previas de los equipos para determinar las mejores condiciones de diseño y operación sin generar costos adicionales.

2.1.6 Modelos cinéticos

La importancia de la cinética microbiana deriva en que las ecuaciones resultantes permiten evaluar la influencia de diversas variables que se presentan en el bioproceso: químicas, físicas, operacionales y fenómenos de transporte, que generan cambios en el comportamiento metabólico

de los MO; por lo tanto, éstas deben ser evaluadas en cada bioproceso para ahorrar costos y mejorar la eficiencia de este (Michael L Shuler; Fikret Kargı; Matthew DeLisa, 2017). Generalmente, se emplean expresiones para la velocidad de crecimiento microbiano conocidas, lo que facilita la evaluación y el análisis de los parámetros resultantes.

Así mismo, existen diferentes tipos de modelos: estructurados, no estructurados, segregados y no segregados. Los no estructurados expresan en términos de biomasa la dinámica del microorganismo y los no segregados, consideran la población como una unidad homogéneamente distribuida, donde una célula puede representar toda la población. Esta combinación, de ‘caja negra’, aunque simplifica las reacciones biológicas reales, es útil para fines tecnológicos debido a que son ecuaciones matemáticas sencillas con sentido físico para variedad de reacciones (Almquist et al., 2014a).

Por su parte, los estructurados consideran el metabolismo del sustrato nitrogenado, describiendo el crecimiento mediante esquemas simplificados de reacción. De los anteriores, se derivan los modelos químicamente estructurados en donde se considera al MO como una variedad de componentes celulares que interactúan entre sí. Finalmente, los segregados consideran que una población está formada por células discretas, donde se presentan distribuciones diferentes de alguna propiedad. (González-Figueroa et al., 2019)

A la fecha, se tienen avances en modelos cinéticos no segregados- no estructurados, empleando glicerol puro (GlyP) como fuente de carbono. En los resultados de Gamboa (2015), se ajusta el modelo para obtención de AL por vía fermentativa para 25 mL, muestran una desviación media relativa del 88% utilizando los modelos de Aiba y Tessier para analizar el comportamiento microbiano (Gamboa-Rueda et al., 2015).

Dentro de los estudios cinéticos de la fermentación de AL utilizando GlyC como fuente de carbono también destaca el de Cheng (2019), en el cual realizan el ajuste de un modelo cinético para realizar estudio del comportamiento del proceso cuando hay una modificación en la temperatura y así poder evaluar con cual condición de temperatura se obtienen los mejores resultados en cuestión de la producción de biomasa, consumo del sustrato y generación del AL (Cheng et al., 2019).

2.2 Metodología objetivo 1

2.2.1 Reactivos

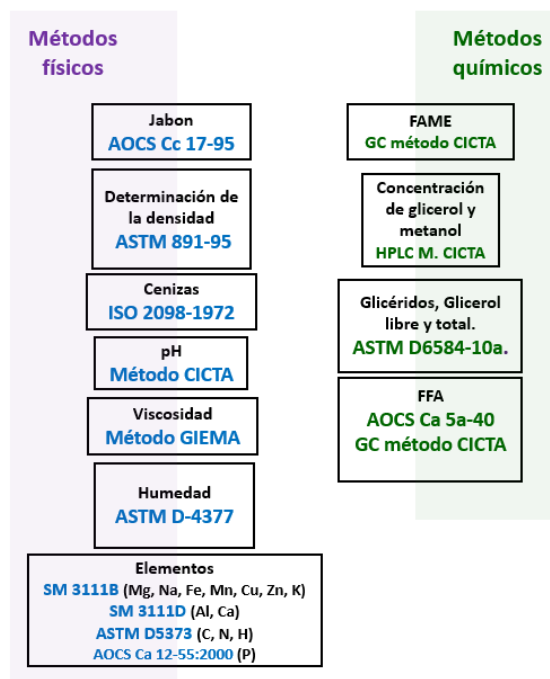
Todos los reactivos eran de grado analítico, sales para preparación de medios, reactivos para caracterización de GlyC etc. El GlyC fue obtenido de tres fábricas de producción de biodiesel colombianas, cuyo muestreo se realizó en una sola época del año.

2.2.2 Caracterización del glicerol crudo

La caracterización del GlyC se realizó por diferentes métodos fisicoquímicos estandarizados bajo diferentes normas, cada método es descrito en el diagrama de la Figura 1.

Figura 1.

Métodos de caracterización fisicoquímicos del GlyC.



2.2.3 Propiedades físicas del glicerol

La densidad del GlyC se determinó bajo la norma ASTM 891-95 (2004) usando un picnómetro calibrado a temperatura ambiente. La viscosidad se obtuvo usando un reómetro (MCR 302 Anton Paar), mediante una curva de flujo con variación de velocidad de deformación a temperatura ambiente (25 ± 0.5 °C). Para el pH de la solución se disolvieron las muestras de glicerol (1.00 ± 0.1 g) en 50 mL de agua desionizada, luego se determinó el pH usando un pH-metro digital (SCHOTT Instruments Handylab pH11) a temperatura ambiente (23 ± 0.5 °C). El contenido de ceniza, se determinó bajo norma ISO 2098-1972, en horno a alta temperatura (Pal & Chaurasia, 2016). El contenido de jabón se estableció siguiendo la metodología de AOCs Cc 17-95 y ASTM

D 4662-08 (Hu, Luo, Wan, & i, 2012) y el contenido de humedad se realizó mediante titulación volumétrica de Karl-Fischer, empleando un titulador automático (Mettler Toledo T50) y balanza analítica (Mettler Toledo AB204) con referencia al método oficial ASTM D 4377 (Hu et al., 2012).

2.2.4 Propiedades químicas del glicerol

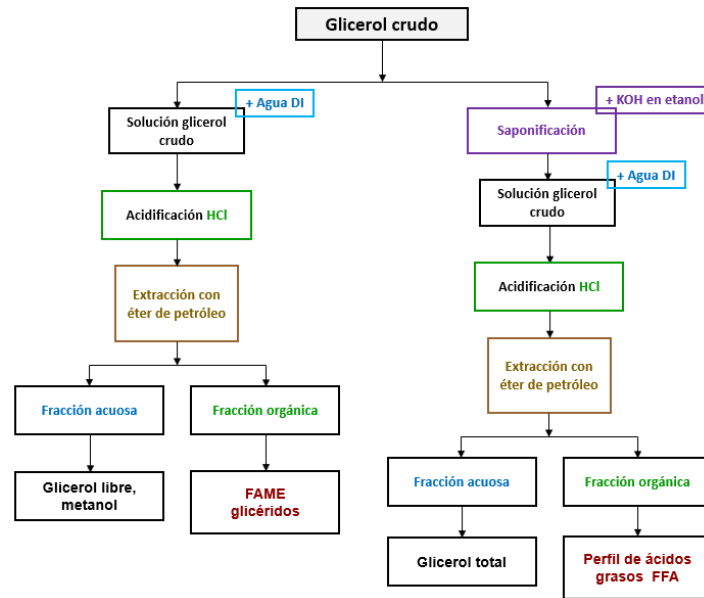
Se determinaron monoglicéridos totales (MONG), diglicéridos totales, triglicéridos totales y glicerina libre y total en ésteres metílicos (FAME) por el método ASTM D 6584 mediante cromatografía de gases Agilent Technologies. El análisis elemental se realizó por absorción atómica (Agilent SpectraAA 240 S) método SM 3111B para magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn) y potasio (K), y el método SM 3111 D para el aluminio (Al) y el calcio (Ca). Por otro lado, el carbono (C), nitrógeno (N), e hidrógeno (H) se determinaron por el método ASTM D 5373 por combustión (LECO CHN 2000 Analyser) y el fósforo (P) por el método de la AOCS Ca 12-55:2000 modificado CICTA por espectrofotometría (Thermo Spectronic Genesys 20).

A continuación, se realizó el fraccionamiento del GlyC con éter de petróleo por el método AOCS G 3-53 y se obtuvieron dos fases: acuosa y orgánica, cada una de éstas fue caracterizada, el esquema de fraccionamiento químico del GlyC se muestra en la figura 2. El contenido de glicerol libre y metanol se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia – HPLC con la columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000), 300*7,9mm. La determinación volumétrica de los ácidos grasos libres (FFA) se realizó de acuerdo con el método Oficial AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 2017). El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó mediante cromatografía de gases Agilent Technologies 7890A con la columna HP-88 por

metodología CICTA (Nanda et al., 2014) y el análisis de glicéridos se hizo de acuerdo con el procedimiento recomendado por ASTM método estándar D6584-10 (ASTM, 2017).

Figura 2.

Esquema del fraccionamiento químico del glicerol crudo. Adaptado de (Hu et al., 2012)



2.2.5 Activación e inóculo

En primer lugar, se realizó la activación de una colonia del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en tubo falcón con 5 mL en un medio agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) por 12 horas a 37 °C y a 200 rpm. Luego, antes de realizar el inóculo en el medio de fermentación, se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C por 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Luego, se cambió el sobrenadante por MRS modificado y se aplicó vórtex (Gamboa & Lizcano, 2013). Posteriormente, se inocularon los 5 mL en un volumen de 45 mL de MRS modificado, empleando GlyP y GlyC según el caso, y se fermentó entre 2 a 3 horas en estas condiciones anteriormente

mencionadas. Finalmente, se obtuvo un inóculo 10% v/v para las fermentaciones de MRS modificado para las tres muestras de GlyC.

2.2.6 Fermentaciones

El propósito de estas fermentaciones fue seleccionar la muestra de GlyC con la cual se obtuvieran los mejores resultados de fermentación en términos de tiempo, cambio de pH, fases de crecimiento bacteriano, concentración de biomasa, conversión de GlyC y GlyP; y productividad volumétrica de AL.

Todas las fermentaciones se desarrollaron por triplicado, con volumen de fermentación total (Vf) de 500 mL y concentración inicial de sustrato (So) de 10 g/L, concentración adecuada para la síntesis de ácido láctico sin presentar inhibición por sustrato en trabajos anteriores (Gamboa-Rueda et al., 2015). Así mismo, las condiciones de fermentación se mantuvieron a temperatura de 37 °C, agitación constante a 200 rpm y pH inicial (pHo) de 6,5 para todos los casos, dado que se ha demostrado que son las variables óptimas de fermentación (Gamboa & Lizcano, 2013). El tiempo de seguimiento de las fermentaciones fue en promedio de 50 horas, tiempo en el cual se presenta agotamiento por sustrato.

2.2.7 Cuantificación de biomasa, sustrato y producto

En general, toda la cuantificación del AL y el sustrato (GlyC y GlyP) se determinó mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficacia – HPLC con la columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000). El equipo operó en modo isocrático, a una temperatura de 80 °C, con flujo de 0.6 mL/min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8mM y el tiempo de cada análisis fue de 20 minutos.

La cuantificación de biomasa se realizó por dos métodos diferentes. En el primero, se realizó un seguimiento por D.O. en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO), a una longitud de onda de 540 nm. Luego, para la determinación del peso seco, se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugó (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R) a 5000 rpm 4°C por 15 minutos; finalmente el precipitado se secó a 60 °C en horno hasta peso constante por 24 horas. Así mismo, se construyó la relación entre la absorbancia y el peso seco que permitió determinar la concentración de biomasa en cada caso.

Para ambos casos, la toma de muestras se realizó en intervalos de dos horas las primeras diez horas de fermentación, y el tiempo restante en lapsos de tres horas. Al respecto, el seguimiento del proceso de fermentación se desarrolló de forma tal que se garantizarán al menos 10 puntos muestrales en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria.

2.2.8 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando *Statistica* (TIBCO versión 13.5.0.17). Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA y Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) entre las tres muestras de GlyC con cada uno de los parámetros caracterizados. De esta manera, se identificó si las muestras eran estadísticamente diferentes mediante los resultados de componentes minoritarios de las mismas.

2.3 Metodología objetivo 2

2.3.1 Fermentaciones

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un medio agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) modificado, empleando como fuente de carbono GlyP y GlyC para la muestra 3 analizada anteriormente, con un volumen de fermentación (Vf) de 25 mL, en un Erlenmeyer de 250 mL, por triplicado; con una concentración de GlyC y GlyP de 10 g/L (Gamboa & Lizcano, 2013). Las condiciones de fermentación se mantuvieron constantes a 37 °C y a 200 rpm pH inicial (pH₀) de 6,5 para todos los casos. Para el inóculo se empleó la misma metodología de activación para el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 del capítulo 1.

2.3.2 Efecto individual de los componentes minoritarios

A partir de los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las muestras de GlyC y del análisis estadístico de varianza, se seleccionaron los componentes minoritarios que presentaron diferencias significativas entre las muestras. A continuación, se analizó de manera individual la influencia que tiene cada componente minoritario sobre la concentración de ácido láctico (AL) y la PAL en la fermentación. Es por esto que se realizaron fermentaciones con medio MRS modificado, con GlyP a 10 g/L como fuente de carbono y con adición del componente minoritario a analizar.

Para la adición del componente minoritario, se tuvo en cuenta el rango de concentración de los parámetros, obtenido en la caracterización fisicoquímica de cada una de las muestras de GlyC y los valores de literatura. Así las cosas, se asignó una ponderación de valor alto, medio y bajo para cada caso. Además, se realizó una fermentación de control sin adición de componente minoritario

para que el experimento fuera comparable y permitiera la evaluación de la influencia del componente.

2.3.3 Efecto de los jabones

Los jabones que se encuentran en el GlyC son producto de la saponificación de los ácidos grasos libres (FFA) del aceite vegetal que se emplea como materia prima. La reacción de saponificación compite con la transesterificación, por tanto, no es un compuesto minoritario deseable en el producto final. Sin embargo, es un problema común de la industria, como se muestra en la estequiometría de la Figura 3, y por tanto es deseable determinar su influencia, rangos presentes en las muestras, y rangos presentes en bioprocesos para generación de productos de valor agregado.

El jabón empleado en el presente trabajo se obtuvo de la muestra S2 de GlyC, debido a que contiene mayor FO. La síntesis se realizó de acuerdo con el método descrito por Sarma et al (Sarma et al., 2013), de la siguiente forma; una muestra de 10 g GlyC se disolvió en 100 mL de agua destilada, la solución se mezcló con 100 mL de solución de NaOH-etanol 50 g/L. A continuación, la mezcla se trasvasó en Erlenmeyer y se mantuvo en un baño de agua a 90°C con una agitación 50 rpm durante 1 hora.

Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se añadió un volumen igual de agua destilada y el jabón se precipitó usando NaCl (10% p/v). El jabón se separó de la solución por centrifugación (5000 g durante 20 minutos) y se dejó en el horno durante 2 horas antes de su aplicación. Se adicionaron las siguientes concentraciones de jabón:

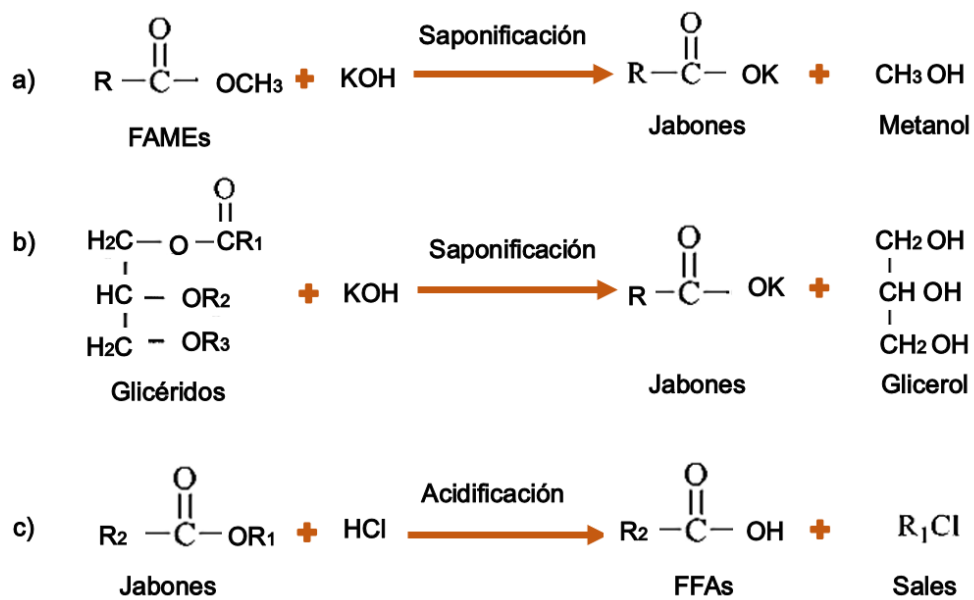
Tabla 3.

Concentraciones de jabón adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0,03	0,5	1

Figura 3.

Reacciones químicas que se producen en el fraccionamiento de glicerol crudo.



2.3.4 Efecto del metanol

El metanol empleado fue de tipo analítico MERCK EMSURE®. Se adicionaron las siguientes concentraciones de metanol:

Tabla 4.

Concentraciones de metanol adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0,5	1	2

2.3.5 Efecto de la FO

La FO empleada para este análisis fue obtenida previamente por el fraccionamiento del GlyC de la muestra S2 con éter de petróleo, como se describe en la sección 2.1.2 del capítulo 1.

Así, se adicionaron las siguientes concentraciones:

Tabla 5.

Concentraciones de FO adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0,04	0,1	0,2

2.3.6 Efecto del KCl y del NaCl

Los reactivos empleados para este análisis (KCl y del NaCl) fueron obtenidos de reactivos de grado analítico MERCK EMSURE®. Se adicionaron las siguientes concentraciones de Cloruro de potasio (KCl):

Tabla 6.

Concentraciones de Cloruro de potasio (KCl) adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0,05	0,5	1

De igual manera, se adicionaron las siguientes concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl):

Tabla 7.

Concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0,5	1	1,5

2.3.7 Efecto de la interacción de los componentes minoritarios

Para la selección de las concentraciones para el diseño de experimental se tuvo en cuenta la caracterización realizada en el capítulo 1; así como, la experimentación con los efectos individuales. En el caso de los jabones y FO, se aumentó el rango analizado en los efectos individuales.

En primer lugar, se descartaron las sales debido a que no presentaban efectos significativos en el análisis individual, aunque se tienen referentes de que concentraciones mayores podrían tener efectos positivos en el crecimiento de los microorganismos (Gao et al., 2016), sin embargo en el contexto de las empresas productoras de biodiesel implicaría costos en el aumento de los catalizadores que se encuentran estrechamente relacionados con la concentración de sales en el GlyC (Thompson & He, 2006).

Los componentes minoritarios jabón, metanol y FO se incluyeron dentro del diseño experimental; La FO, aunque no presento efectos positivos en el análisis individual, se incluyó dado que se tienen referentes de que podría tener un efecto positivo a mayores concentraciones, y se amplió el rango establecido anteriormente.(Beopoulos et al., 2009)

El jabón fue incluido en el diseño de experimentos puesto que mostró efectos positivos y significativos en las concentraciones más altas evaluadas en el análisis individual. Para este componente también se ampliaron los rangos.

El metanol, aunque no mostró tener efectos significativos en los análisis individuales, en estudios anteriores ha demostrado tener un efecto negativo dada su toxicidad para las bacterias (X. Yang et al., 2014), por lo que se quiere comprobar si en la interacción se obtienen los mismos

resultados. Las concentraciones se mantuvieron iguales, teniendo en cuenta que los valores son los encontrados en GlyC colombianos.

2.3.8 Diseño de experimentos

Con el objetivo de estudiar la influencia de la interacción de los componentes minoritarios sobre la PAL, se realizó un diseño experimental con superficie de respuesta, donde la variable a optimizar fue la productividad volumétrica. Los componentes minoritarios a evaluar se tomaron como variables independientes; estos, junto con los niveles de los factores se determinaron teniendo en consideración la caracterización de los componentes minoritarios y el análisis de los efectos individuales, obtenidos en el capítulo 1 y en la sección 3.1.

Se eligió el diseño central compuesto (CCD), debido a que proporciona una distribución razonable de los puntos en toda la región de interés. Este diseño de experimentos (DOE) es usado comúnmente para experimentos secuenciales como es el caso, proporcionando una robustez contra los puntos atípicos, comunes en el área de bioprocesos, sin requerir un gran número de corridas. (Montgomery, 2001)

El diseño de experimentos sigue la ecuación (1), con tres factores ($k=3$) y dos puntos centrales ($N_c=2$), para un total de 16 experimentos que se realizaron por duplicado. La Tabla 8 se muestra las variables independientes y los niveles en el CCD.

$$N = 2^k + 2k + N_c \quad (\text{Ec 1})$$

Para el análisis del modelo de superficie de respuesta se empleó el software *Statistica* (TIBCO versión 13.5.0.17), en donde se genera un modelo matemático que representa las curvaturas del efecto de los factores (concentraciones de componentes minoritarios) que optimizan la variable de respuesta empleando la ecuación (2)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_0 \chi_i + \sum_{i=1}^k \beta_0 \chi_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (\text{Ec 2})$$

Tabla 8.

Factores y niveles evaluados en el CCD.

Factores (Concentración g/L) \ Niveles codificados	-1	0	1
Jabones	0,5	1	3
Metanol	0,5	1	2
FO	0,2	2	3,8

2.3.9 Cuantificación de biomasa, sustrato y metabolitos.

En general, toda la cuantificación de metabolitos (AL) y fuente carbono (GlyC y GlyP) se determinó mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con la columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000), 300*7,9mm. El equipo operó en modo isocrático, a una temperatura de 80 °C, con flujo de 0,6 mL/min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8mM y el tiempo de cada análisis fue de 20 minutos.

La cuantificación de la biomasa se realizó por densidad óptica (D.O) en espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO Thermo Scientific, usando la curva de calibración de D.O vs absorbancia determinada en el Capítulo 1. Para este caso, se realizaron sólo dos muestreos: uno inicial y otro final (Gamboa & Lizcano, 2013).

Como sustrato se empleó la muestra de GlyC-S3 del Capítulo 1, que de acuerdo con los resultados de las fermentaciones tuvo una mayor PAL.

2.3.10 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando *Statistica* (TIBCO versión 13.5.0.17). Para la determinación de diferencias significativas entre los parámetros a estudiar y las medias de los experimentos, se realizaron pruebas de significancia empleando un análisis de varianza ANOVA unidireccional y una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

2.4 Metodología objetivo 3

2.4.1 Fermentaciones

El medio utilizado para las fermentaciones fue el Man, Rogosa y Sharpe modificado (MRS modificado), con el GlyC S3 del capítulo 1 como fuente de carbono. Una vez obtenido el medio se procedió a realizar fermentaciones por duplicado durante 24 horas a 37 °C, 200 rpm, con pH inicial de 6,5 en medios con presencia y ausencia de oxígeno (O y SO respectivamente) en volúmenes de fermentación de 10, 25 y 50 mL. Se utilizó la bacteria ácido láctica *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 para determinar las condiciones de oxígeno en las que se obtenía la mejor productividad volumétrica de ácido láctico (PAL).

2.4.2 Cuantificación de biomasa, sustrato y producto

Para la determinación de la concentración de AL se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) equipado con una columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000), 300*7,9mm. El equipo operó en modo isocrático, a una temperatura de 80 °C, con flujo de 0,6 mL/min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8mM y el tiempo de cada análisis fue de 20 minutos. La cuantificación de la biomasa se realizó por densidad óptica (D.O) en

espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO Thermo Scientific, usando la curva de calibración de D.O vs absorbancia determinada en el objetivo 1.

2.4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *Statistica* (TIBCO versión 13.5.0.17) para determinar si existía una diferencia significativa en la producción de AL en condiciones aerobias o anaerobias modificando los volúmenes de fermentación, empleando un análisis de varianza ANOVA unidireccional y una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

2.4.4 Escalamiento

El escalamiento se realizó en dos partes, en la primera se seleccionó el número adimensional de Reynolds de impulsor (Re_i) como parámetro de escalamiento manteniéndose constante, esto debido a que la geometría del vial de 100 mL y el vaso del fermentador Bioflo 110 New Brunswick de 1,3 L no son comparables. A continuación, con la Ecuación (1), se determinaron las condiciones de agitación teniendo en cuenta la relación de diámetros impulsor-vial y que los parámetros físicos del fluido (densidad y viscosidad) se mantuvieron constantes dado a que no existen diferencias significativas entre los caldos de fermentación utilizados. Para determinar la viscosidad el caldo de fermentación se empleó viscosímetro Anton Paar Physica MCR 302, con curvas de flujo donde se varió la velocidad de deformación.

En la segunda parte, para el escalamiento entre los biorreactores donde existe similitud geométrica, se usó la V_{tip} de la Ecuación (3), manteniéndose constante en volúmenes de fermentación con biorreactores para determinar la velocidad de agitación.

2.4.5 Análisis de parámetros reológicos hidrodinámicos

Se calcularon los parámetros reológicos y números adimensionales importantes en el escalado empleando las Ecuaciones (3) a (19) de la Tabla 9, tomando las dimensiones del vial y del biorreactor Bioflo 110 New Brunswick (1,5 y 7,5 L) con un calibrador pie de rey digital Sata ST91512SC (0 a 200 mm).

Tabla 9.

Ecuaciones usadas para el análisis reológico he hidrodinámico.

Ecuación	#	Ecuación	#
$Re_i = \frac{N_i \rho D^2}{\eta}$	3	$\lambda = \left(\frac{v^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}$	12
$Re_f = \frac{nd_f^2}{v}$	4	$\gamma = kN_i$	13
$v = \frac{\eta}{\rho}$	5	$\tau = -\eta\gamma$	14
$\vartheta_{tip} = \pi N_i D_i$	6	$\tau_f = \left(\frac{\varepsilon}{v}\right)^{1/2} n$	15
$P_o = N_p \rho N_i^3 D_i^5$	7	$Fr_i = \frac{N_i^2 D_i}{g}$	16
$P_f = N'_p \rho n^3 d_f^4 V_L^{1/3}$	8	$Fr_f = \frac{(2\pi n)^2 d_o}{2g} > 0,4$	17
$N'_p = 70Re_f^{-1} + 25Re_f^{-0.6} + 1,5Re_f^{-0.2}$	9	$Ph = \frac{d_o}{d_f} \left\{ 1 + 3 \log_{10} \left[\frac{\rho(2\pi n) d_f^2}{\eta} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left[\frac{V_L^{0.33}}{d_f} \right]^2} \right)^2 \right] \right\}$	18
$A_c = \frac{\pi D_{int}^2}{4}$	10	$t_m = \frac{1,54 * v}{D^3 * N_i}$	19
$\varepsilon = N_p N_i^3 D_i^2$	11		

2.4.6 Análisis CFD

2.4.6.1 Diseño geométrico. Se utilizó el programa Comsol Multiphysics V 5.5 de prueba para realizar el diseño geométrico de los biorreactores New Brunswick BioFlo 110 para volúmenes de 500, 2500 y 5000 mL. Los diseños fueron realizados utilizando las dimensiones de los biorreactores de 1,5 y 7,5 L (incluyendo sensores y tuberías de alimentación) y la altura se ajustó al volumen de reacción, las dimensiones utilizadas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10.

Dimensiones y configuraciones de los biorreactores de 500, 2500 y 5000 mL

Parte	Medición	500 mL	2500 mL	5000 mL
Tanque	Numero de deflectores	4,000	4,000	4,000
	Anchura del deflector [cm]	1,296	1,930	1,930
	Diámetro del impeler [cm]	10,5423	18	18
	Diámetro del tanque [cm]	11,419	18,6	18,6
	Alto del tanque [cm]	7,000	13,927	27,854
Impeler Rushton	Diámetro del buje del impeler [cm]	1,040	1,200	1,200
	Longitud de álabes del impeler [cm]	1,725	1,826	1,826
	Número de álabes del impeler	6	6	6
	Ancho del álabe del impeler [cm]	1,620	1,630	1,630
	Diámetro de disco para turbinas de Rushton y Smith [cm]	2,356	3,146	3,146
	Diámetro del eje del impeler [cm]	1,040	1,200	1,200
	Eje Del Impeler	Diámetro del eje de impeler [cm]	1,040	1,200
Longitud del eje de impeler [cm]		5,500	8,541	22,400
Tuberia De Alimentación 1	Radio interno [mm]	1,800	2,400	2,400
	Longitud [cm]	5,500	7,817	21,750
	Grosor de pared [mm]	1,480	1,230	1,230

Tubería De Alimentación 2	Radio interno [mm]	1,8	NA	NA
	Longitud [cm]	5,0	NA	NA
	Grosor de pared [mm]	1,48	NA	NA
Sensor De Temperatura	Radio interno [cm]	0,100	0,090	0,9
	Longitud [cm]	5,500	8,239	22,150
	Grosor de pared [cm]	0,600	0,792	0,792
Sensor De Ph	Radio interno [mm]	0,015	0,900	0,900
	Longitud [cm]	5,500	8,239	22,150
	Grosor de pared [mm]	5,900	5,000	5,000

2.4.6.2 Definición del dominio rotatorio. Se aplicaron booleanos para generar una unión entre el eje del impulsor y el impeler Rusthon, utilizando una función de diferencia se realizó una separación del tanque de fermentación. Una vez aplicados los booleanos se procedió a seleccionar el dominio rotatorio como la superficie interna del biorreactor y la unión del eje de impulsor con el impeler, en este dominio se definió la velocidad rotacional especificada en revoluciones por tiempo, utilizando los valores determinados en el escalamiento dimensional.

2.4.6.3 Selección de la malla y el paquete de fluidos. Para cada diseño geométrico realizado se definió un tamaño de malla normal, debido a que este es utilizado para objetos que tienen tamaños entre 0,00372 y 0,0125 m el cual era el caso de los diseños geométricos anteriormente realizados. En el caso del paquete de fluidos se seleccionó el modelo para flujo turbulento k-ε y se definió las propiedades del agua debido a que las propiedades del caldo de fermentación son cercanas a esta.

2.4.6.4 Simulación. Se utilizó el estudio de rotor congelado para realizar las simulaciones de cada biorreactor realizando una comparación entre las líneas de flujo, la magnitud de la velocidad del fluido y la velocidad cerca de las paredes para determinar si las condiciones de agitación obtenidas favorecían el perfil de velocidad del fluido a medida que aumentaba la escala.

2.5 Metodología objetivo 4

2.5.1 Fermentaciones

Para las fermentaciones se utilizó el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) modificando su fuente de carbono con GlyC. Una vez preparado el medio se procedieron a realizar fermentaciones en volumen de reacción de 25, 500 y 5000 mL, a 37 °C, con pH inicial de 6,5, en medios con presencia de oxígeno residual (sin flujo de alimentación de oxígeno) y agitación constante seleccionada del escalamiento (200, 190 y 167 rpm respectivamente). En el caso de la fermentación de 25 mL se utilizaron viales de 120mL y biorreactores New Brunswick Bioflo 110 de 1,3 y 5L para las fermentaciones de 500 y 5000 mL respectivamente. El MO utilizado para las fermentaciones fue la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Para determinar la concentración de GlyC y ácido láctico se utilizó un HPLC con la columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000), 300*7,9mm. El equipo operó en modo isocrático, a una temperatura de 80 °C, con flujo de 0,6 mL/min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8mM y el tiempo de cada análisis fue de 20 minutos.

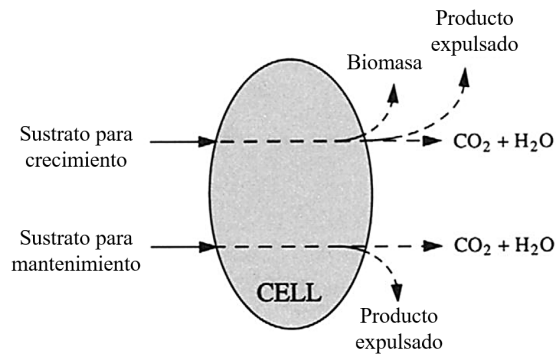
En el caso de la biomasa se utilizó una curva calibración (absorbancia vs concentración) donde la absorbancia fue medida utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO con una longitud de onda de 540 nm.

2.5.2 Estimación de los parámetros cinéticos

Los modelos cinéticos se definen como un conjunto de ecuaciones diferenciales de balance de masa con expresiones cinéticas, que describen los perfiles de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de metabolito de interés, Figura 1 (P. M. Doran, 2007).

Figura 4.

Captación de sustrato para formación de producto, (P. M. Doran, 2007).



El crecimiento bacteriano usualmente se describe como se muestra en la ecuación (20), donde (X) es la concentración de biomasa y (μ) es la velocidad de específica de crecimiento.

Por otro lado, el comportamiento del sustrato que considera consumo para el mantenimiento de las células y la formación de biomasa es descrito como se muestra en la ecuación (21). Donde (S) es la concentración de sustrato, (Y_{xs}) representa el rendimiento estequiométrico de biomasa con respecto al sustrato y (m_s) es un coeficiente de mantenimiento asociado al sustrato.

Por último, la producción del metabolito puede describirse mediante el modelo de Luedeking-Piret que considera los términos asociados al crecimiento, como se muestra en la ecuación (22). Donde (P) es la concentración de producto, (Y_{ps}) representa el rendimiento estequiométrico del producto con respecto al sustrato y (m_p) es un coeficiente de mantenimiento asociado al producto (Almquist et al., 2014b).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{Ec } 20)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s\right) \cdot X \quad (\text{Ec } 21)$$

$$\frac{dP}{dt} = (\mu \cdot Y_{PS} + m_p) \cdot X \quad (\text{Ec } 22)$$

La velocidad específica de crecimiento (μ) puede ajustarse a diferentes funciones que describen el proceso fermentativo. Para los casos donde intervienen sustratos y productos inhibidores se han propuesto distintas expresiones microbianas. Estas se presentan en la Tabla 11.

Para la estimación de los parámetros cinéticos, en primer lugar, se procedió a calcular el valor experimental de la velocidad específica de crecimiento (μ), utilizando la ecuación (20), a partir de los datos de concentración de biomasa.

Luego se estimaron los parámetros de las ecuaciones diferenciales y de las expresiones cinéticas presentadas en la Tabla 11, a partir de la minimización de la función de raíz mínima cuadrada. En este algoritmo los parámetros cinéticos propuestos son utilizados para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales y comparar sus resultados con los datos experimentales por medio de la ecuación (23), en un proceso iterativo.

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_1^n [y_i - \bar{y}_i]^2} \quad (\text{Ec } 23)$$

Donde (\bar{y}_i) son los datos predichos por el modelo, (y_i) los datos experimentales, (n) es el número total de mediciones, y (RMS) es el residual de los mínimos cuadrados (Xue et al., 2010)

Tabla 11. Expresiones cinéticas aplicadas en la fermentación de ácido Láctico.

Ec	Expresión cinética	Ecuación	Referencia
24	Monod	$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S}$	(Fu & Mathews, 1999)
25	Mosser	$\mu = \frac{\mu_{max} * S^n}{k_s + S^n}$	(Ardestani et al., 2017)
26	Tipo Tessier 1	$\mu = -\mu_{max}(a - \mu_{max} * \exp^{(k_s * S)})$	(Gamboa-Rueda et al., 2015)
27	Tipo Tessier 2	$\mu = -\mu_{max}(a - \mu_{max} * \exp^{(k_s^2 * S^2)})$	(Gamboa-Rueda et al., 2015)
28	Aiba	$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S} * \exp^{(\frac{P}{k_p})}$	(Napoli et al., 2011)
29	Haldane	$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S + \frac{S^2}{k_1}}$	(Vlysidis et al., 2011)

Para la solución de este sistema, se utilizó el software Matlab R2020b versión académica y la función *fmincon* utilizando un algoritmo de punto interior, con una tolerancia de $1,0 * 10^{-9}$ y 5000 iteraciones. La tolerancia y el número de iteraciones escogidas permitieron obtener los valores óptimos para los parámetros cinéticos. Para la solución del sistema de ecuaciones diferenciales se utilizó la herramienta ODE15s del programa Matlab (Mathworks).

2.5.3 Selección del modelo

Para determinar cuál de las expresiones cinéticas utilizadas presentaba el mejor ajuste, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC), que es una medida de la calidad relativa de un modelo. El AIC realiza un balance entre la bondad de ajuste del modelo y su complejidad, proporcionando un método de selección, que permite determinar qué tan bueno es el ajuste de un modelo con respecto a los otros. Un valor AIC más bajo significa que el modelo describe mejor un conjunto de datos (Akaike, 1974; Xue et al., 2010) . El criterio AIC se calcula como se muestra en la ecuación (30).

$$AIC_c = n \text{Log} \left(\frac{RMS}{n} \right) + \frac{2mn}{n-m-1} \quad (\text{Ec } 30)$$

Donde (n) es el número de datos, (m) es el número de parámetros desconocidos y (RMS) es el residual de mínimos cuadrados obtenidos de la rutina de ajuste.

2.5.4 Identificabilidad de los parámetros cinéticos

La identificabilidad es una propiedad estadística que un modelo debe satisfacer para que sea posible una inferencia precisa. Este aspecto es muy importante, porque permite estimar el nivel de confianza de la estimación y la posibilidad de asignar valores de forma única a los parámetros (Almquist et al., 2014a).

Los modelos cinéticos de sistemas biológicos generalmente consisten en ecuaciones diferenciales ordinarias que tienen muchos parámetros desconocidos. Para estimarlos con precisión, se requiere un equilibrio entre el contenido de información en los datos experimentales y el nivel de complejidad del modelo.

Existen dificultades en la estimación de algunos parámetros dado que no se pueden determinar valores únicos a partir de la información disponible. Las posibles causas son la complejidad en la estructura de los modelos, la interdependencia entre los parámetros y la mala calidad de los datos.

Un sistema que es algebraicamente identificable puede no serlo, si la cantidad y la calidad de los datos son insuficientes, o si los datos manifiestan grandes desviaciones (Hernandez-Vargas et al., 2014).

Para poder determinar la identificabilidad local y sensibilidad de un parámetro, se debe analizar la variación de la función de minimización con respecto a los cambios en el parámetro.

Primero, se evalúa la sensibilidad de los resultados del modelo con respecto a los cambios en un parámetro mientras los demás se encuentran constantes. Los que no generan mayores

cambios en la función de minimización se consideran no identificables. Este enfoque de sensibilidad global funciona para modelos con pocos parámetros como el del presente estudio (Gábor et al., 2017).

La estrategia consiste en generar gráficos, en los cuales se estudia el comportamiento de la función de ajuste (RMS) haciendo variaciones de uno de los parámetros del modelo en el rango establecido, y manteniendo las demás constantes; esto proporciona evidencia de la tendencia del parámetro y permite concluir cualitativamente si el valor obtenido es identificable.

2.6 Resultados objetivo 1

2.6.1 Caracterización del glicerol crudo

2.6.1.1 Propiedades físicas del glicerol. La densidad de las tres muestras de GlyC varió de 1,24 a 1,26 g/cm³ mostrando un resultado similar al glicerol GlyP (1,26 g/cm³) (Tabla 12), por lo que no se presentan diferencias significativas entre las muestras de GlyC. En cuanto al pH de las muestras S1 y S2, se obtuvieron valores cercanos al pH del glicerol GlyP (pH =5); mientras que el pH de la muestra S3 fue mayor, probablemente debido a la presencia de residuos de catalizador alcalino (NaOH o KOH), proveniente del proceso de producción de biodiesel. La viscosidad medida presenta valores de 164,16 a 362,31 m·Pa·s, ésta difiere en un rango del 64% con respecto al GlyP, como consecuencia de los diferentes compuestos minoritarios que poseen las muestras, especialmente al contenido de agua ausente en el GlyP.

Tabla 12.

Propiedades físicas del glicerol crudo.

Muestra	Densidad (g/cm ³)	pH	Viscosidad (m·Pa·s)
GlyP	1,26 ± 0,00	5,00 ± 0,02	452,26 ± 1,38
S1	1,27 ± 0,00	5,41 ± 0,01	362,31 ± 0,14

S2	1,26 ± 0,00	6,08 ± 0,04	164,16 ± 0,45
S3	1,24 ± 0,00	8,77 ± 0,05	223,56 ± 6,21

* Datos expresados como las medias de tres replicas ± desviación estándar.

2.6.1.2 Propiedades químicas del glicerol. El porcentaje de la fracción orgánica contenida en las muestras de GlyC varió desde 0,38% a 2,01% (Tabla 13). El contenido de metanol en las tres muestras estuvo en el rango de 0,21% a 0,52%, una composición muy baja en todas las muestras colombianas, teniendo en cuenta que es un 98% menos que lo reportado para muestras internacionales provenientes de industrias del aceite de soja, mezclas de diferentes aceites vegetales, entre otros (Hu et al., 2012; Moreno, 2015), pero corresponde a valores cercano a reportados para otros GlyC colombianos (Mellow & Banana, 2016; Moreno, 2015; Yañez Díaz, 2013). Lo anterior, podría indicar que los procesos de purificación de las industrias de biodiesel del presente estudio emplean tecnologías para la separación del metanol con resultados similares. En cuanto al contenido de glicerol total, se puede observar en la Tabla 13 que fue en promedio un 0,5% mayor al glicerol libre; esto se debe a que en la saponificación los glicéridos presentes en el GlyC que no habían reaccionado, se convierten en glicerol (Hu et al., 2012).

Tabla 13.

Contenido de glicerol, metanol y fracción orgánica.

Muestras	Sin saponificación		Con saponificación	
	Glicerol libre (p/p %)	Fracción orgánica (p/p %)	Glicerol total (p/p %)	Metanol (p/p %)
S1	63,33 ± 0,84	0,48 ± 0,00	63,60 ± 0,66	0,52 ± 0,08
S2	69,90 ± 0,40	2,01 ± 0,01	70,19 ± 0,68	0,25 ± 0,07
S3	70,80 ± 1,26	0,38 ± 0,01	71,20 ± 0,27	0,21 ± 0,01

* Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar.

El análisis de los perfiles de ácidos grasos de los FFA de la fracción orgánica (Tabla 14), muestran un alto contenido de ácido palmítico (44,69% - 46,09%), oleico (37,7% - 39,20%) y

linoleico (9,02% - 9,76%) en las tres muestras de GlyC analizadas. Lo anterior, concuerda con la información suministrada por las industrias, que provienen en su mayoría del aceite de palma.

Tabla 14.

Composición de la fracción orgánica con saponificación.

Ácidos grasos (FA)	S1	S2	S3
Mirístico (p/p %)	1,54 ± 0,00	1,00 ± 0,02	1,04 ± 0,33
Palmítico (p/p %)	46,03 ± 0,08	46,09 ± 0,16	44,69 ± 0,12
Esteárico (p/p %)	4,05 ± 0,06	4,47 ± 0,15	4,69 ± 0,46
Oleico (p/p %)	37,7 ± 0,12	39,18 ± 0,04	39,20 ± 0,70
Linoléico (p/p %)	9,76 ± 0,03	9,02 ± 0,02	9,40 ± 0,27
Otros (p/p %)	0,92 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,97 ± 0,35

* Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar.

Los FFA contenidos en las fracciones orgánicas de las tres muestras de GlyC varían de 40,79% a 76,83%. En la Tabla 15 se puede observar que la muestra S3 contiene un 23,93% de glicéridos, superando a S1 y a S2 en un 50% y 40% respectivamente. En contraste, S3 tiene un menor contenido de FFA, lo que puede relacionarse en mejor calidad del biodiesel, e implícitamente del aceite empleado en su producción. En este sentido, se debe recordar que en la reacción de esterificación de los FFA se busca disminuir el valor de acidez con el fin de evitar la formación de jabón y emulsiones que puedan llegar a afectar el rendimiento de la transesterificación para la obtención del biodiesel.

Tabla 15.

Composición de la fracción orgánica sin saponificación.

Muestras (p/p%)		S1	S2	S3
FFA		58,95 ± 2,19	76,83 ± 0,58	40,79 ± 0,51
Glicéridos	mono-	4,81 ± 0,26	3,42 ± 0,02	6,27 ± 0,06
	di-	7,13 ± 0,18	10,86 ± 0,03	17,66 ± 0,27
FAMES	Mirístico	0,28 ± 0,01	0,09 ± 0,08	0,40 ± 0,1
	Palmítico	12,28 ± 0,39	4,29 ± 2,08	15,88 ± 3,2
	Esteárico	1,31 ± 0,02	0,44 ± 0,33	1,57 ± 0,3
	Oleico	12,08 ± 0,24	3,5 ± 0,53	14,32 ± 1,4

Linoleico	2,83 ± 0,16	0,49 ± 2,34	2,77 ± 2,1
Otros	0,33 ± 0,02	0,08 ± 0,18	0,33 ± 0,01

* Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar

Finalmente, en cuanto al análisis de FAMES se muestra un alto contenido de ácido palmítico (4,29% a 15,88%) y oleico (3,5% a 14,32%) en todos los casos, valores que están en concordancia con las materias primas empleadas y relacionados con los análisis anteriormente descritos.

El contenido de carbono en las muestras de GlyC analizadas (Tabla 16) varía de 33,42% a 34,75%, éstos valores se obtienen por la presencia mayoritaria de compuestos minoritarios como jabones, FAMES y glicéridos. Además, estos resultados confirman que el GlyC es un subproducto de valor agregado con potencial para ser un sustrato viable en las fermentaciones. Así mismo, el nitrógeno se presentó en un rango del 0,22% a 0,26%, lo que muestra la baja variabilidad de éste en las muestras y se infiere que, en contraste con el carbono, se necesitarían fuentes nitrogenadas adicionales para los requerimientos de crecimiento y mantenimiento de las bacterias durante el bioproceso.

Tabla 16.

Análisis elemental del GlyC.

Muestras	S1	S2	S3
C (p/p%)	34,75 ± 0,26 ^A	34,63 ± 0,22 ^A	33,42 ± 0,06 ^B
N (p/p%)	0,26 ± 0,03 ^A	0,22 ± 0,02 ^A	0,22 ± 0,00 ^A
H (p/p%)	8,24 ± 0,02 ^B	8,49 ± 0,02 ^A	8,48 ± 0,03 ^A
Na (ppm)	1090,07 ± 10,59 ^A	1479,86 ± 126,89 ^B	934,28 ± 6,61 ^A
K (ppm)	390,73 ± 7,17 ^B	46,37 ± 0,00 ^A	41,42 ± 1,63 ^A
P (ppm)	68,08 ± 8,17 ^B	92,62 ± 2,04 ^B	31,16 ± 0,93 ^B
Ca (ppm)	26,8 ± 0,30 ^B	10,91 ± 0,76 ^B	3,64 ± 0,07 ^B
Mg (ppm)	10,42 ± 0,25 ^B	0,32 ± 0,01 ^A	0,63 ± 0,01 ^A
Fe (ppm)	7,08 ± 0,05 ^B	1,81 ± 0,01 ^B	1,26 ± 0,01 ^B
Cu (ppm)	0,70 ± 0,00 ^B	0,06 ± 0,01 ^B	0,03 ± 0,01 ^B
Al (ppm)	56,21 ± 0,59 ^B	0,68 ± 0,01 ^B	3,80 ± 0,06 ^B
Zn (ppm)	2,22 ± 0,00 ^B	< LC	0,05 ± 0,00 ^B

* Datos expresados como las medias de dos replicas \pm desviación estándar. El supra índice ^A indica que la concentración de los elementos caracterizados no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de GlyC y el índice ^B indica la presencia de diferencias significativas entre sí.

Así mismo, en la muestra S1 se observa un alto contenido de potasio (390,73 ppm) y en la muestra S2 un alto contenido de sodio (1479,86 ppm); esto puede atribuirse al uso de catalizadores basados en K - Na, durante el proceso de producción de biodiesel.

En la Tabla 17 se puede observar la composición de cada una de las muestras representadas en seis componentes: glicerol libre, agua, cenizas, fase orgánica (glicéridos, FFAs y FAMEs), jabón y metanol. El glicerol libre y el agua en las tres muestras de GlyC componen en promedio el 78% \pm 4,76 (p/p%) de la masa total. Por otra parte, se presentan bajas cantidades de metanol, jabón y FO en las tres muestras. La muestra S3 contiene el mayor contenido de GlyC (70,79%) y de agua (11,27%).

Tabla 17.

Composición general de las muestras de GlyC.

Muestras (p/p%)	S1	S2	S3
Glicerol libre	63,33 \pm 0,84 ^B	69,85 \pm 0,40 ^A	70,79 \pm 1,26 ^A
Agua	9,56 \pm 0,04 ^A	9,63 \pm 0,22 ^A	11,27 \pm 0,04 ^B
Cenizas	4,49 \pm 0,06 ^B	5,20 \pm 0,01 ^B	4,37 \pm 0,00 ^B
FAMEs, Gliceridos & FFAs	0,48 \pm 0,00 ^B	2,01 \pm 0,01 ^B	0,38 \pm 0,01 ^B
Metanol	0,40 \pm 0,08 ^B	0,15 \pm 0,06 ^A	0,12 \pm 0,02 ^A
Jabón	0,30 \pm 0,05 ^A	0,58 \pm 0,07 ^B	0,20 \pm 0,08 ^A

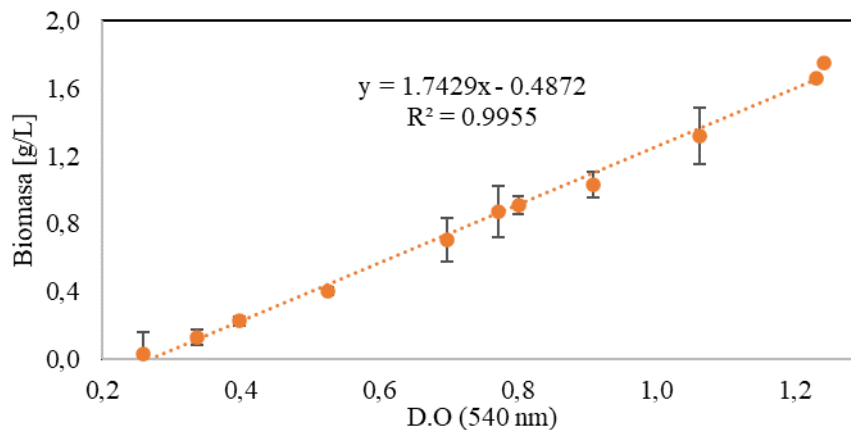
*Datos expresados como las medias de dos replicas \pm desviación estándar. El supra índice ^A indica que la concentración de los elementos caracterizados no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de CG y el índice ^B indica la presencia de diferencias significativas entre sí.

2.6.2 Fermentación

2.6.2.1 Fermentación con GlyP y GlyC como fuente de carbono. En la Figura 5 se muestra la curva de calibración utilizada para la determinación de la concentración de biomasa, obtenida con experimentación previa.

Figura 5.

Curva de calibración de densidad óptica vs concentración de biomasa.

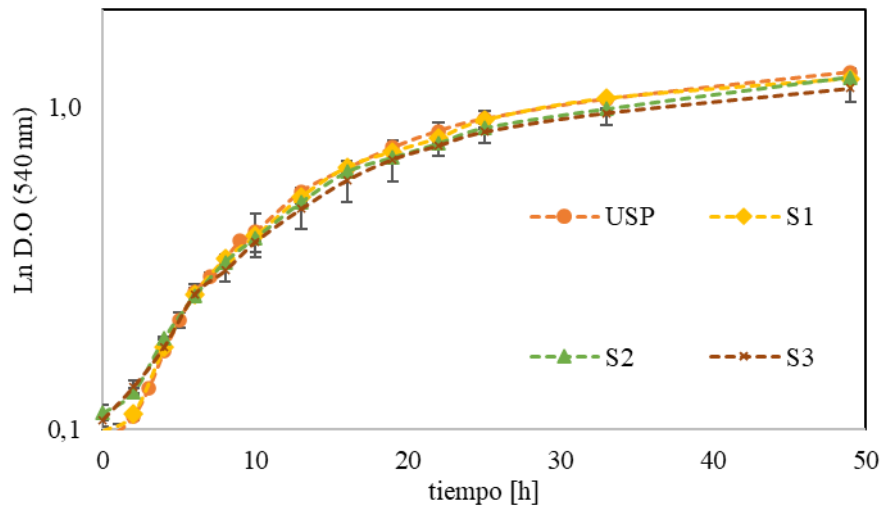


En las cuatro fermentaciones realizadas, se pudo apreciar una adaptación positiva por parte de la bacteria respecto a la asimilación del GlyC como fuente de carbono principal, dado que se aprecia crecimiento bacteriano, consumo de las fuentes de carbono (GlyC y del GlyP) y producción de AL. En efecto, en la Figura 6 se puede observar una tendencia típica de una curva de crecimiento bacteriano. En la primera parte, se tiene una fase de latencia de aproximadamente 2 horas y después, una fase crecimiento exponencial aproximadamente hasta la hora 20, luego continúa creciendo de forma lenta hasta las 50 horas, este patrón de evidencio para todas las fermentaciones. Con respecto a trabajos anteriores (Diaz Ruiz & Prada Palomo, 2012b; Gamboa & Lizcano, 2013), se obtuvo una fase exponencial larga, la causa probablemente es, que a diferencia de los trabajos previos, en

la presente investigación no se realizó ningún tipo de adaptación del microorganismo para evitar su modificación metabólica y asegurar la misma cepa en todos los experimentos.

Figura 6.

Logaritmo natural de la densidad óptica en función del tiempo



En la Tabla 18 se presentan los valores máximos para cada una de las fermentaciones en relación con la concentración de AL, biomasa y productividad volumétrica durante el tiempo del experimento.

Tabla 18.

Valores máximos de parámetros de fermentaciones.

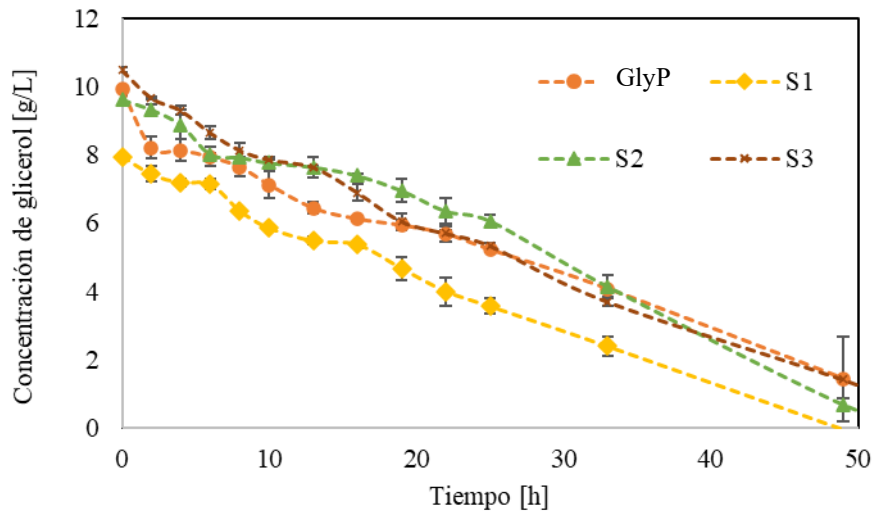
	AL (g/L)	Biomasa (g/L)	P AL (t=6) (g·L·h ⁻¹)	%Conversión Glicerol
S1	1,78 ± 0,15 (t=49h)	1,84 ± 0,02	0,06 ± 0,01	100 ± 1,21 (t=49h)
S2	2,20 ± 0,09 (t=55h)	1,83 ± 0,02	0,05 ± 0,00	93,01 ± 0,98 (t=49h)
S3	2,21 ± 0,00 (t=55h)	1,79 ± 0,04	0,09 ± 0,02	96,24 ± 1,75 (t=55h)
GlyP	2,56 ± 0,16 (t=51h)	2,04 ± 0,05	0,1 ± 0,02	89,41 ± 1,14 (t=51h)

*Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar, t corresponde a las horas de fermentación para las cuales se obtuvieron los resultados.

Desde el inicio de la fermentación hasta la hora 50, se presentó un aumento en la concentración de AL (Figura 8) llegando a los valores máximos al final del tiempo de seguimiento del experimento. Después de este tiempo, la producción de AL se detuvo debido al agotamiento de GlyC (Figura 7) que era la fuente de carbono principal. En el caso del GlyP, la concentración de AL siguió en un aumento gradual, dado que no se presentó agotamiento total de éste quedando aproximadamente el 10% por consumir.

Figura 7.

Concentración de glicerol en función del tiempo

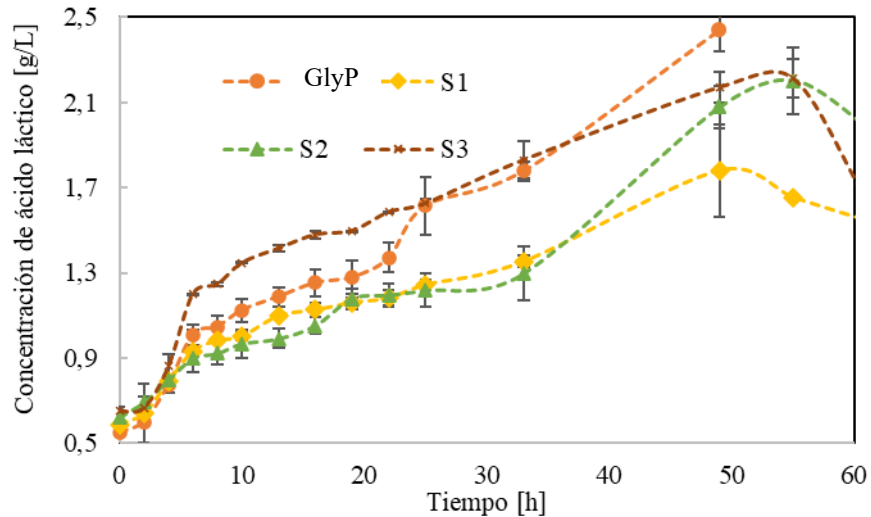


De igual manera, en la Figura 8 se puede apreciar que las concentraciones de AL de la muestra S3, durante la 45 hora, son las mayores comparadas con las de S1 y S2, con valores cercanos a las de la muestra de GlyP. Sin embargo, después de la hora 50, la disponibilidad de GlyC en las muestras S1, S2 y S3 disminuye por agotamiento y las concentraciones de AL experimentan el mismo comportamiento. Entonces, se plantea la posibilidad de que el metabolismo de la bacteria puede adaptarse y consumir el AL producido frente a la ausencia del sustrato

principal. Este fenómeno no se puede comparar en el GlyP, dado que esta fermentación la medición se realizó hasta la hora 50.

Figura 8.

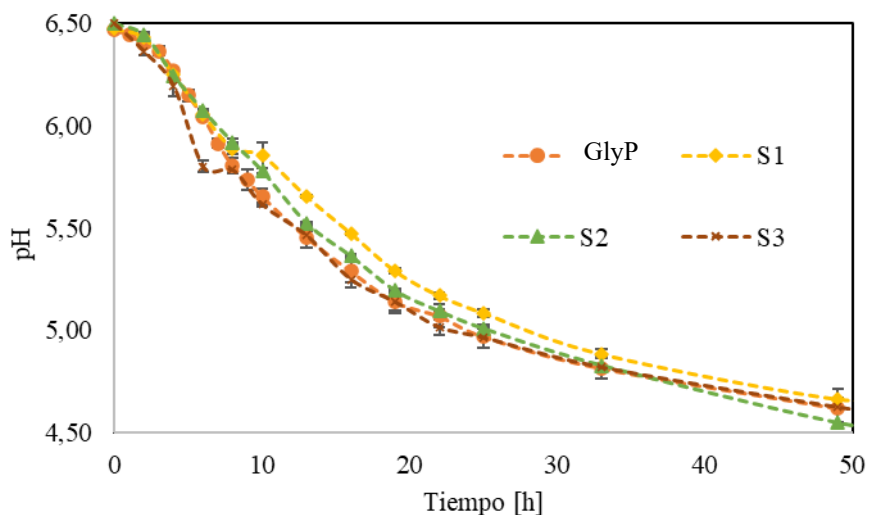
Concentración de ácido láctico en función del tiempo hasta la t=60 h



En la Figura 9 se observa que en todas las fermentaciones hubo una disminución continua de pH durante todo el proceso, desde el $pH_0 = 6,5 \pm 0,00$ hasta valores promedio finales de $4,70 \pm 0,00$ a $4,53 \pm 0,00$, confirmando la producción continua del AL. Similar comportamiento fue reportado por de Lima (2010) donde se concluyó que cuando el medio de fermentación alcanza un pH de 4, la producción de AL se detiene, debido a que la naturaleza ácida del caldo inhibe el crecimiento microbiano (de Lima et al., 2010). Sin embargo, en el presente estudio, no se presentó inhibición por pH en ninguno de los experimentos donde la fermentación y la producción de AL continuaron hasta el agotamiento total del GlyC.

Figura 9.

Perfiles de pH en función del tiempo

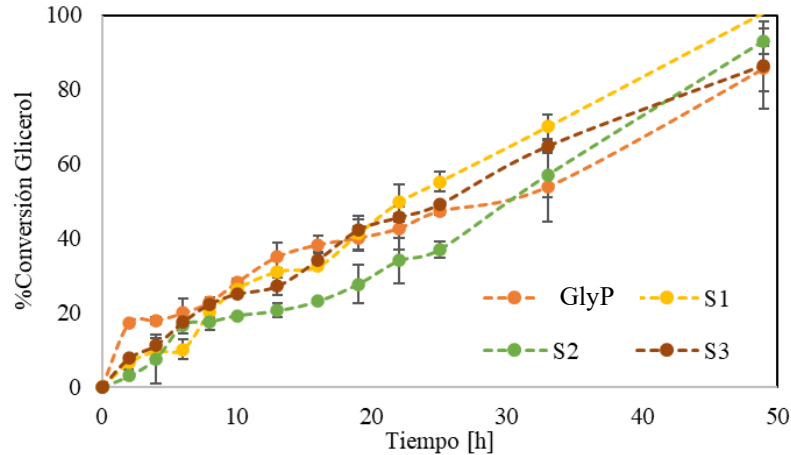


Teniendo en cuenta que el pH_0 fue seleccionado de acuerdo con los resultados de otros autores (Gamboa-Rueda et al., 2015; Prada-Palomo et al., 2012; Sumitha et al., 2018) se confirma que dicho valor es un valor adecuado para el microorganismo y la producción del AL.

En la Figura 10 se observa una conversión alta para todos los casos. Por ejemplo, en las muestras de GlyP, S2 y S3 fue de $89,41\% \pm 2,65$, $93,01\% \pm 3,42$ y $86,5\% \pm 1,48$ respectivamente. De hecho, en el caso de la muestra S1 el GlyC se consumió en su totalidad equivalente a una conversión del $100\% \pm 0,01$.

Figura 10.

Porcentaje de conversión de glicerol



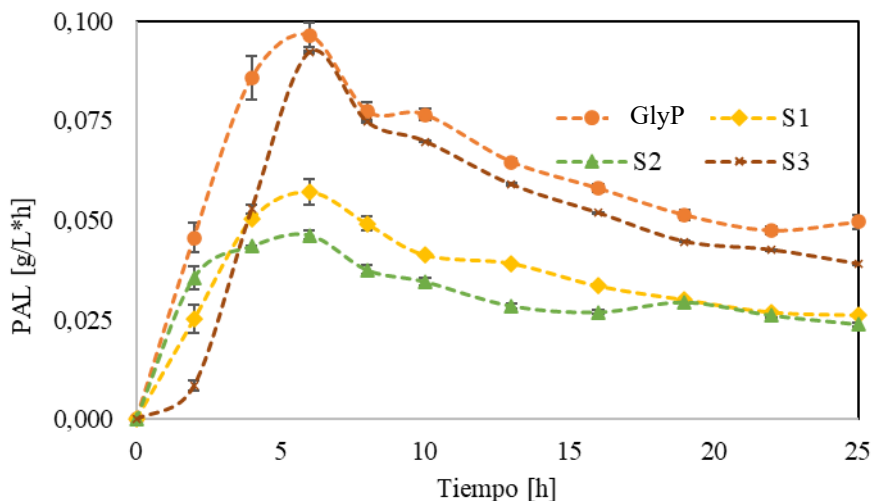
Este fenómeno pudo presentarse por dos razones principalmente, la primera es que la muestra S1 contiene el menor porcentaje de GlyP de todas, por tanto, es más fácil de metabolizar por la bacteria en menor tiempo. La segunda, es que dicha muestra también es la segunda en contenido de otros compuestos minoritarios diferentes al agua.

Por esa razón, se puede suponer una influencia positiva por estas impurezas en cuanto al consumo de la fuente de carbono y la combinación de los factores descritos. No obstante, esta muestra es la que sintetiza menor concentración de AL.

Con respecto a la productividad volumétrica, en la Figura 11 se muestra una curva típica de velocidad de producción de AL, y de ésta se concluye que, para todas las muestras a las 6 horas de fermentación, es donde se produce la productividad máxima. Por una parte, la muestra S3 describe una tendencia muy similar GlyP y mayores a las muestras S1 y S2 en un 61% y 100%, respectivamente, lo que hace mejor a esta muestra S3 es su alto contenido de glicerol y bajo contenido de impureza.

Figura 11.

Productividad de ácido láctico en función del tiempo



2.7 Resultados objetivo 2

2.7.1 Efectos individuales de los componentes minoritarios

La selección de los componentes minoritarios cuyo efecto se evaluó en el presente trabajo, se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, fueron excluidos los componentes mayoritarios, el glicerol y agua, debido a que no son objeto del presente estudio. En segundo lugar, se seleccionaron los compuestos minoritarios caracterizados restantes: fase orgánica (FAMES, Glicéridos y FFA), metanol y jabones. Por último, las cenizas no fueron seleccionadas directamente, dado que, diversos estudios han concluido que éstas son producto del exceso de catalizadores principalmente K y Na los cuales son empleados durante el proceso de transesterificación del biodiesel (Ormaz, 2010). Generalmente, los catalizadores son adicionados como NaOH y KOH, en base alcohólica; y en efecto, en el análisis elemental el Na fue 35,72%, 52,83% y 54,04% y el K 12,79%, 1,66%, 2,40% en S1, S2 y S3 respectivamente, de la caracterización realizada en el capítulo 1. Por esto, se eligieron los compuestos NaCl y KCl para

evaluar su influencia en la PAL, debido a que son las principales sales inorgánicas generadas en el proceso (Adnan et al., 2014; Datta et al., 2014).

En la Tabla 19 se observa la influencia de cada uno los componentes minoritarios evaluados, sobre la productividad global del AL. En cada uno de los casos se determinó si la influencia era significativa o no, y su efecto sobre la PAL, empleando una prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Así, los signos positivos representan la influencia significativa de los componentes reflejada en aumento de PAL; mientras que, los signos negativos representan que no existe una influencia significativa en la fermentación con respecto al experimento, que se tomó como blanco.

Tabla 19.

Efecto de las concentraciones en la PAL con respecto al blanco.

Componente/Concentración	Efecto en productividad del AL - PAL			
	Blanco	Baja	Media	Alta
Jabón	-	-	-	+
Metanol	-	+	+	+
FO	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-
NaCl	-	-	-	-

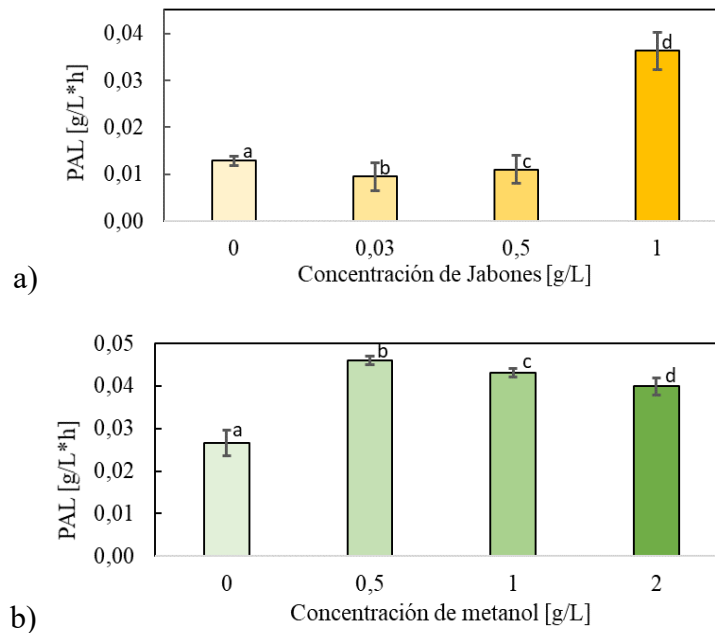
2.7.2 Efecto de los jabones

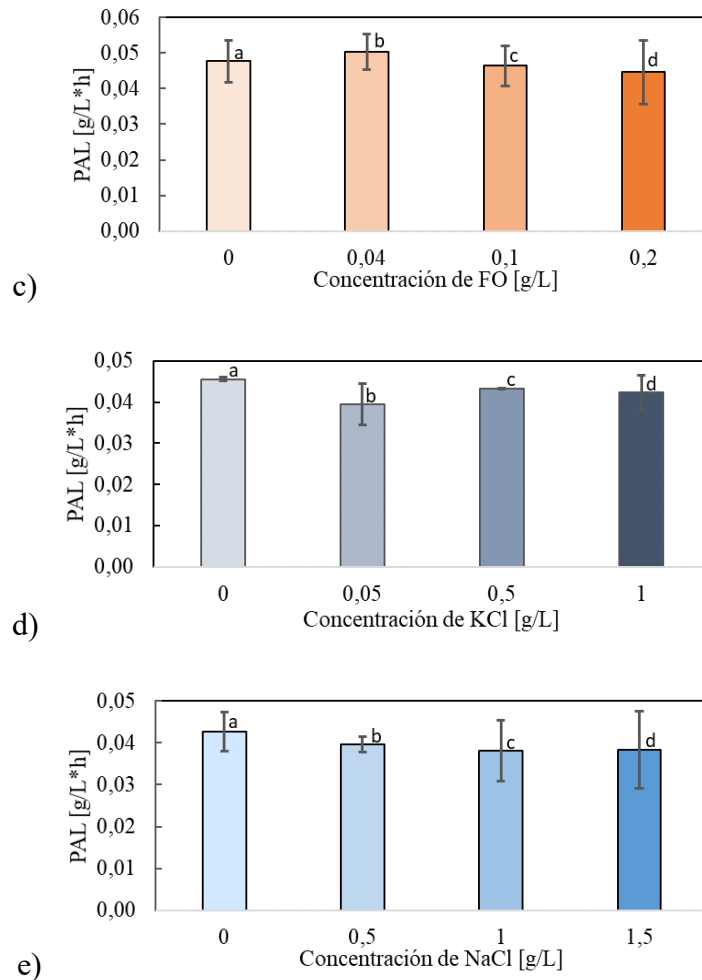
Como se observa en la Figura 12 a), la máxima productividad global de AL ($0,04 \pm 0,00$ g/L*h) se obtuvo cuando la concentración de jabones en el medio de fermentación fue de 1 g/L. La productividad global a esta concentración es mayor y estadísticamente diferente ($p < 0,05$) en comparación con los medios con menor concentración. En la investigación realizada por Sarma (2014), se estudió el efecto inhibitorio de los jabones presentes en el GlyC sobre las bacterias, y se encontró que contrario a lo esperado, la remoción de más del 7% de este compuesto tenía efectos

negativos sobre la productividad. Lo anterior, se debe a que, el jabón es utilizado por la bacteria como un cosustrato, y al remover este compuesto, proporcionalmente disminuye la relación C-N del medio. Lo anterior causa la disminución de producción del metabolito de interés (Sarma et al., 2014). Entonces, en las fermentaciones donde se presentó este fenómeno, se evidenció una mejora en la metabolización del GlyC por parte de la bacteria en el medio, por lo tanto, la PAL fue 2,81 veces mayor con respecto al GlyP.

Figura 12.

Efecto de los componentes minoritarios a diferentes concentraciones sobre la productividad del ácido láctico, ANOVA unidireccional. a) Jabones; b) Metanol; c) Fase orgánica; d) Cloruro de potasio; e) Cloruro de sodio. Las letras encima de las barras representan las desviaciones estándar en cada concentración.





2.7.3 Efecto del metanol

Como se observa en la Figura 12 b), la máxima PAL fue $0,05 \pm 0,00$ g/L*h, y se obtuvo a una concentración de 0,5 g/L. Esto representa una PAL 1,73 veces mayor en comparación a los resultados obtenidos en el medio de GlyP (sin metanol). Su efecto fue estadísticamente diferente con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

Según lo estudiado por Venkataramanan (2012) empleando una cepa *Clostridium*, se descubrió que el metanol a bajas concentraciones no tiene efectos negativos en la producción de metabolitos (Venkataramanan et al., 2012). De hecho, a concentraciones altas, de 5 g/L que

equivaldría al 20% de GlyC, el efecto sobre el crecimiento y metabolismo de la bacteria fue mínimo. Entonces, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con dichas conclusiones, debido a que no se observó ningún efecto negativo en cuanto a la PAL en el rango evaluado (Samul et al., 2014).

2.7.4 Efecto de la FO

Como se observa en la Figura 12 c), los valores de PAL en todas las concentraciones menores a 0,2 g/L de FO evaluadas, no evidencian efectos o diferencias significativas. En la investigación de Venkataramanan (2012) se demuestra que los esteres metálicos de ácidos grasos (FAME) afectan directamente la utilización del GlyC como fuente de carbono, dependiendo principalmente de su grado de insaturación: a mayor insaturación, más efectos negativos para la fermentación. Por ejemplo, el ácido graso más perjudicial es el linoleico y el caso contrario lo presentan los ácidos oleico y esteárico (Venkataramanan et al., 2012). La FO que se extrajo de la muestra S2 de GlyC, y que fue empleada para realizar los experimentos, está compuesta en un 90,74% de ácidos saturados (ácido palmítico, oleico, esteárico y mirístico) y 9,02% de ácidos insaturados (linoleico) como se encontró en la caracterización realizada en el capítulo 1.

En este caso, los valores de PAL no se afectaron significativamente, obteniendo un máximo de 1,06 veces más que la muestra de GlyP, posiblemente debido a que los FAMEs son principalmente saturados o con bajos niveles de insaturación. Además, otra causa de este comportamiento es que se evaluaron concentraciones pequeñas, seleccionadas de acuerdo con la caracterización obtenida de las muestras de GlyC colombianas.

2.7.5 Efecto de KCl y NaCl

Como se observa en la Figura 12 d) y e), en general, se obtuvieron valores muy cercanos de PAL para todas las fermentaciones, tanto para el KCl como para el NaCl respectivamente, en un rango entre 0,039 y 0,046 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. En efecto, Venkataramanan (2011) concluyó que no hay efectos negativos sobre el crecimiento y metabolismo de la bacteria en GlyC con porcentajes de hasta 10% (p/p%) de sales en el medio de fermentación, empleando *Clostridium* (Venkataramanan et al., 2012).

Algunos estudios sugieren que contenidos de sal mayores a 10 g/L pueden llegar a ser tóxicos para algunos microorganismos; aun así, bacterias como las *E. coli* SS1 son capaces de tolerar altos contenidos de sal (15 g/L) sin reducir la síntesis de producto (Adnan et al., 2014). Sin embargo, en la presente investigación las mayores concentraciones de sales evaluadas fueron de 1,5 g/L y 1 g/L de Na y K respectivamente. Los resultados ANOVA indicaron que los efectos de la concentración de sal sobre la PAL no fueron significativos.

2.7.6 Efectos de la interacción de los componentes minoritarios

Se evaluó la influencia de la interacción de los componentes minoritarios del glicerol crudo tales como jabones, metanol y FO en diferentes concentraciones, sobre la PAL a través de un diseño experimental de superficie de respuesta. Como se muestra en la Tabla 20, el máximo valor de PAL fue $0,1988 \pm 0,0093 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ con concentraciones de jabones y FO de 3 g/L y 3,8 g/L respectivamente, que corresponden a los niveles más altos y una concentración de metanol de 0,5 g/L que corresponde al nivel más bajo evaluado. De acuerdo con esto, se observa un aumento de la PAL con el aumento de la concentración de jabón y FO, mostrando que su valor se duplica entre los límites de concentración.

Tabla 20.

Resultados del diseño central compuesto para productividades de ácido láctico (PAL)

Tratamiento	Jabón [g/L]	Metanol [g/L]	FO [g/L]	^a PAL [g/L*h]
1	1	-1	-1	0,1041 ± 0,0140
2	0	1	0	0,0681 ± 0,0074
3	0	0	1	0,0790 ± 0,0048
4	0	0	0	0,0758 ± 0,01963
5	1	1	-1	0,0766 ± 0,0082
6	-1	-1	-1	0,0981 ± 0,0076
7	-1	-1	1	0,1214 ± 0,0078
8	0	-1	0	0,0832 ± 0,0030
9	-1	1	1	0,0625 ± 0,0043
10	1	0	0	0,1390 ± 0,0059
11	0	0	-1	0,0864 ± 0,0014
12	1	1	1	0,1647 ± 0,0008
13	-1	0	0	0,0721 ± 0,0077
14	1	-1	1	0,1988 ± 0,0093
15	-1	1	-1	0,0549 ± 0,0016

^aDatos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar.

En la Tabla 21, se presentan los resultados del ANOVA para estimar la existencia efectos lineales, cuadráticos y/o interacciones significativas ($p < 0,05$) de los factores evaluados, sobre la variable de respuesta con un intervalo de confianza de 95%. El ANOVA mostró la dependencia de los tres factores lineales, concentración de jabones, de metanol y FO; en contraste ninguno de los factores cuadráticos fue significativo y entre las interacciones estudiadas solo la relación entre la concentración de jabón y FO tuvo un efecto significativo. De forme visual estos resultados se expresan mejor en el diagrama de Pareto para efectos estandarizados mostrado en la Figura 13.

Tabla 21.

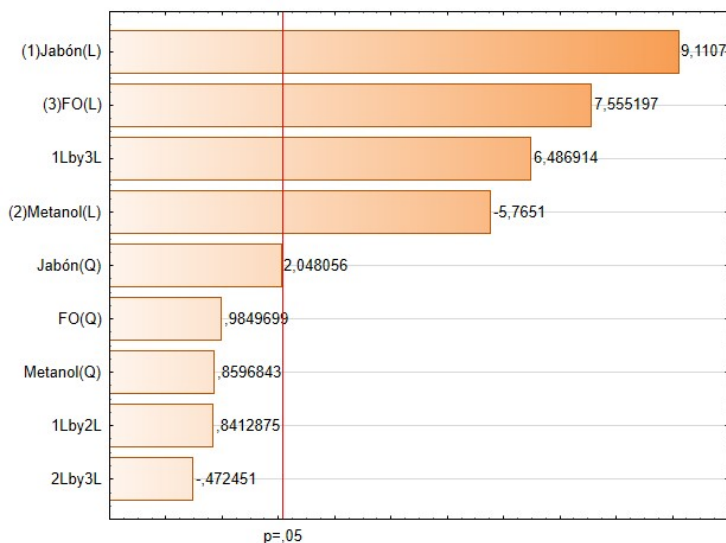
ANOVA del diseño de superficie de respuesta

Factor	SS	MS	F	p
(1) Jabón (L)	0,0151	0,0151	83,0055	0,0000
Jabón (Q)	0,0008	0,0008	4,1945	0,0527
(2) Metanol (L)	0,0061	0,0061	33,2364	0,0000
Metanol (Q)	0,0001	0,0001	0,7391	0,3992
(3) FO (L)	0,0104	0,0104	57,0810	0,0000
FO (Q)	0,0002	0,0002	0,9702	0,3353
1L * 2L	0,0001	0,0001	0,7078	0,4092
1L * 3L	0,0077	0,0077	42,0801	0,0000
2L * 3L	0,0000	0,0000	0,2232	0,6413
Error	0,0040	0,0002		
Total, SS	0,0493			

Nota: La (L) indica efectos lineales y la (Q) efectos cuadráticos; (SS) es la suma de cuadrados, (MS) media cuadrática, (f) coeficiente entre varianzas y (p) probabilidad en contra de la hipótesis nula; los datos en (rojo) tienen efectos significativos sobre la variable de respuesta.

Figura 13.

Diagrama de Pareto para efectos estandarizados; los valores indican la magnitud de los efectos estandarizados y el signo (+/-) indican si el efecto es positivo o negativo respectivamente.



Los parámetros de ajuste para el modelo cuadrático de regresión múltiple tuvieron en cuenta todos los efectos de los factores evaluados (Tabla 22), los valores del error cuadrático (R^2) y error

cuadrático ajustado (R^2_{aj}) fueron de 0,91 y 0,88 respectivamente. Éstos valores son aceptables en sistemas biológicos, por lo que muestran adecuadamente el comportamiento de PAL frente a los factores evaluados; también se muestran los coeficientes regresores para todos los efectos.

Tabla 22.

Parámetros de ajuste y coeficientes para los modelos de regresión de superficie de respuesta

Parámetro	Valor
R^2	0,9184
R^2_{aj}	0,8851
Coeficientes regresores	
(1) Jabón (L)	-0,0445
Jabón (Q)	0,0126
(2) Metanol (L)	-0,0518
Metanol (Q)	0,0103
(3) FO (L)	-0,0094
FO (Q)	0,0018
1L by 2L	0,0029
1L by 3L	0,0094
2L by 3L	-0,0012

Para darle sencillez al modelo, se propuso un modelo simplificado en el cual se tuvo en cuenta únicamente los valores de los factores significativos. A partir de este modelo, se generaron superficies de respuesta de PAL en relación con dos variables independientes, la variable no graficada se mantuvo en el valor central del diseño experimental.

Modelo de regresión simplificado con los efectos lineales e interacciones significativas.

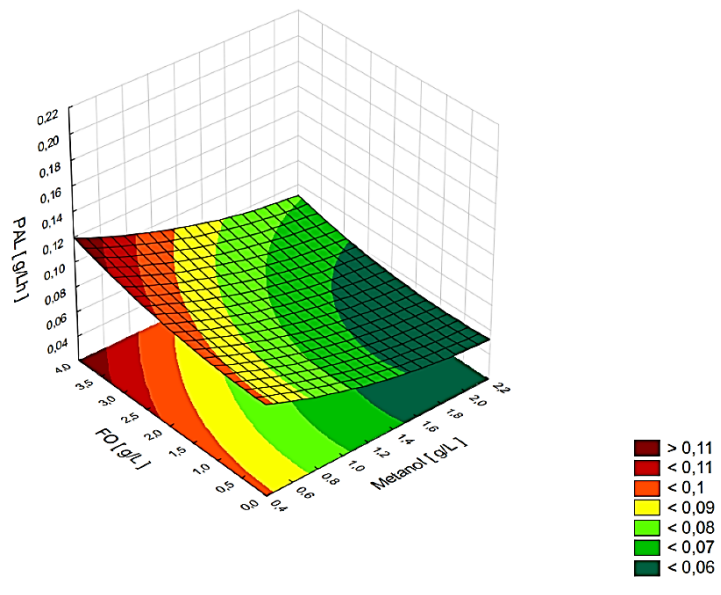
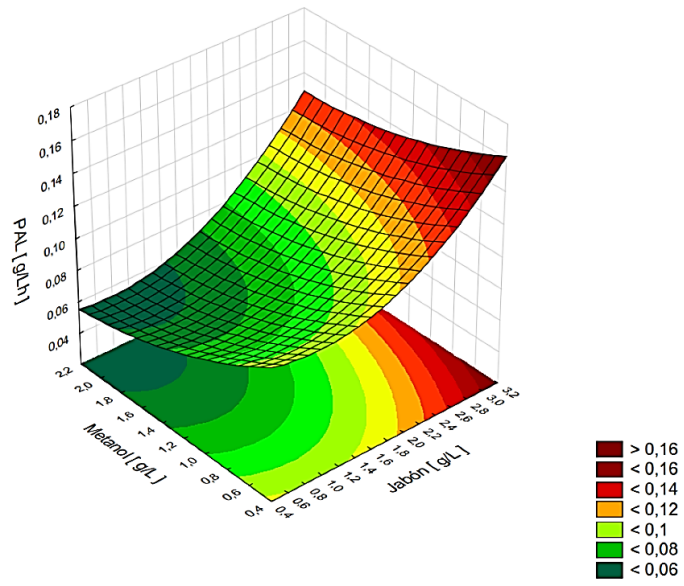
$$PAL = 0,1421 - 0,0445 * "Jabón" - 0,0518 * "Metanol" - 0,0094 * "FO" + 0,0094 * "Jabón" * "FO"$$

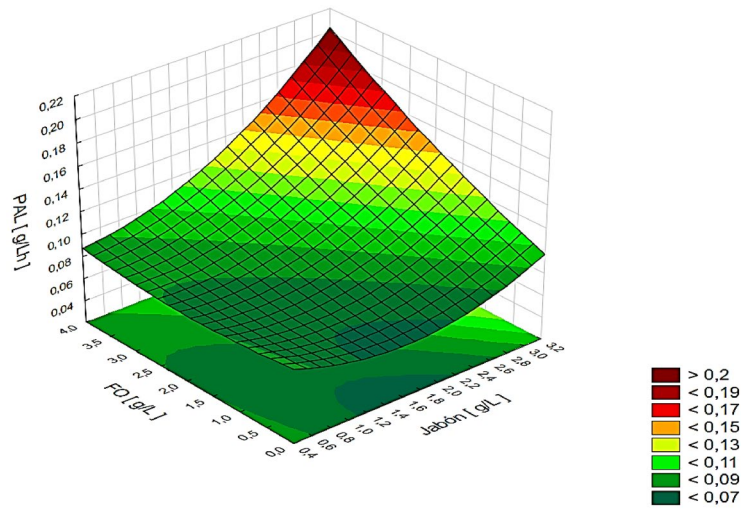
También cabe resaltar que este modelo podría ser empleado para predecir la productividad del AL para GlyC, con concentraciones de componentes minoritarios dentro de los rangos evaluados en este estudio.

Como puede verse en la Figura 14 a), donde se presenta la relación entre la concentración de jabones y metanol, la región con mayor producción de ácido láctico ($< 0,16 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), con concentraciones altas de jabones y bajas concentraciones de metanol lo que nos indica un efecto positivo y negativo respectivamente. El efecto negativo se ratifica en la Figura 14 b), donde se muestra la relación entre el metanol y la FO, en el cual solo alcanzo una productividad máxima de $0,12 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ con concentraciones bajas de metanol y altas para la FO, lo anterior también indica que los jabones tienen una mayor influencia que la FO sobre la productividad.

Figura 14.

Superficies de respuesta para la productividad de ácido láctico Nota: a) Concentración de metanol y jabones; b) Concentración de FO y metanol; y c) Concentración FO y jabones.





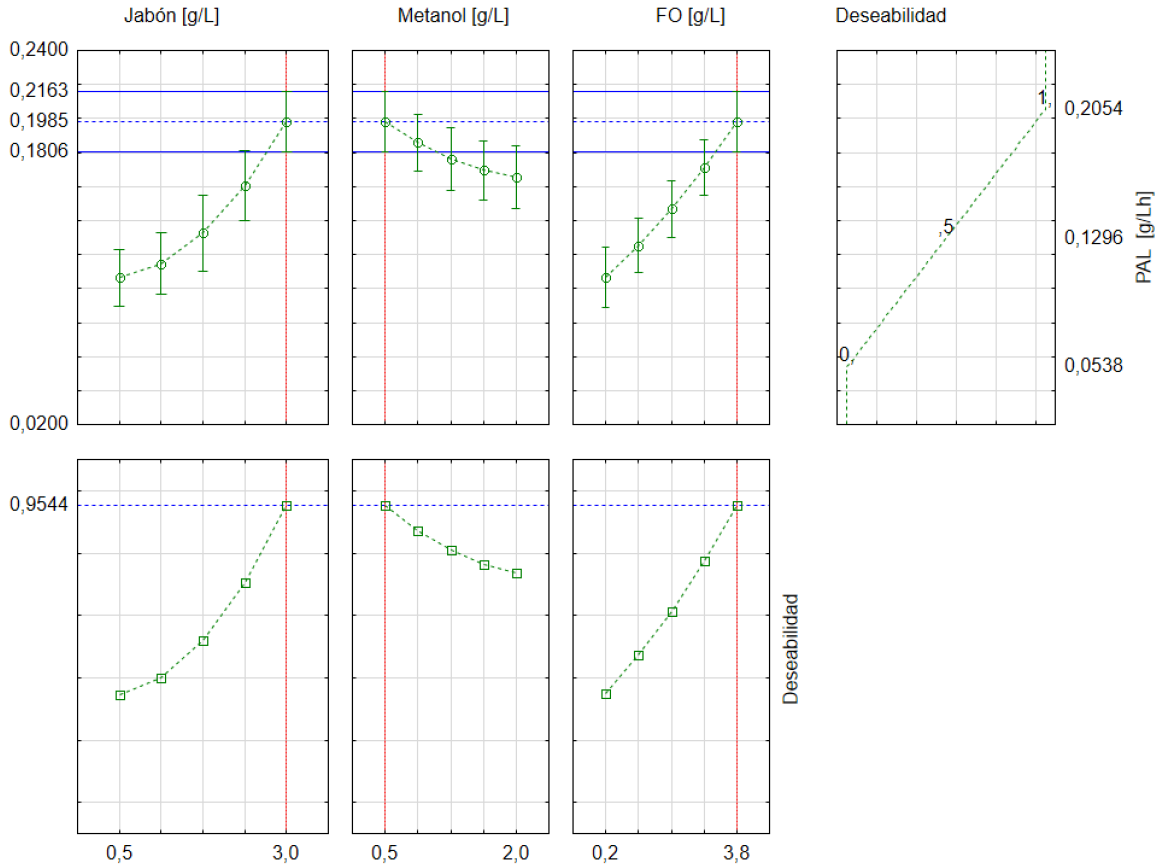
c)

La Figura 14 c) muestra la relación entre la concentración de FO y jabones, en ésta la región con mayor productividad alcanza valores de 0,20 g/L*h con concentraciones altas de ambos factores, siendo esta la mayor. Lo anterior muestra coherencia con el análisis ANOVA, que mostró efectos significativos para de los dos factores y su interacción.

Los perfiles de deseabilidad mostrados en la Figura 15, fueron empleados para identificar las concentraciones óptimas de los componentes minoritarios evaluados que favorecen la PAL. La productividad óptima 0,20 g/h*L, se encontró en las concentraciones de jabón, metanol y FO de 3 g/L, 0,5g/L y 3,8 g/L respectivamente.

Figura 15.

Perfiles de deseabilidad para la productividad de ácido láctico



El factor con mayor efecto significativo fue el jabón, lo cual, coincide con lo encontrado en las pruebas anteriores para determinar los componentes minoritarios significativos de forma individual a pesar de que se aumentaron los rangos de las concentraciones empleadas y de acuerdo con estudios anteriores llevados a cabo por Sarma (2014) se encontró que la remoción de jabón en el GlyC tenía efectos negativos en la PAL; lo anterior debido a que el jabón es empleado como un cosustrato y su remoción disminuye la relación C-N del medio (Sarma et al., 2014). Este efecto positivo también puede deberse a la naturaleza emulsificante de los jabones, el cual aumenta la

permeabilidad de la membrana celular mejorando la capacidad de absorción de nutrientes por parte del microorganismo, como se expresa en el estudio de Gao (2017), en el cual se aumentaron las concentraciones de jabones de 0 a 2 g/L en GlyP, aumentando en 25 y 68 %p/p la biomasa respectivamente y en productos metabólicos en un 25 % (Gao et al., 2016). Cabe resaltar que a altas concentraciones de jabón, por el contrario, se presentan efectos inhibitorios causando la disminución de la movilidad de la célula, afectando su orientación y transformando su morfología (Hejna et al., 2017).

En cuanto a la FO y el metanol, se presentan contrastes debido a que para ninguna de las dos se presentaba un efecto significativo en el estudio de los componentes en forma individual. Sin embargo, los rangos de concentración de la FO se aumentaron de (0,004-0,02) [g/L] a (0,05-3,8) [g/L], lo que nos podría indicar que la presencia de concentraciones relativamente altas de este componente en GlyC favorecerían la producción de AL. Es posible que la bacteria esté asimilando la FO como una fuente secundaria de sustrato, como es el caso de Beopoulos (2009), donde se incrementó la concentración de biomasa y productos metabólicos en un 10 y 16 % respectivamente, al parecer el rendimiento celular es causado por los ácidos grasos libres (FFAs) que están siendo usados como una fuente de carbono (Beopoulos et al., 2009). Aunque una alta concentración de FAMES puede inhibir el proceso dado que tienen grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que actúan como surfactantes débiles afectando las interacciones con la membrana celular (Ngoc Ta et al., 2010).

El efecto negativo del metanol se debe a su toxicidad en sistemas biológicos, debido a que la presencia de metanol en el medio puede inducir a fenómenos osmóticos en las células microbianas, afectando la fluidez de la membrana, mecanismo de transporte y la actividad enzimática involucrada en la función de la membrana. (Liu et al., 2011). No obstante, para algunos

microorganismos en concentraciones de metanol menores a 10 g/L no resultó inhibitoria del crecimiento celular (Liang et al., 2010). Sin embargo, para el microorganismo empleado en el presente estudio se obtuvieron productividades mayores en las concentraciones más bajas de metanol, lo que coincide, con lo encontrado por Chen (2018) donde se evaluaron diferentes concentraciones de metanol entre 1,4 a 4,4 %p/p, en el cual se obtuvo la concentración máxima de biomasa y productos metabólicos de 12,64 g/L y 3,29 g/L con la menor concentración de metanol evaluada. Considerando que en la caracterización fisicoquímica de las muestras de GlyC colombiano, evaluadas en el capítulo 1, se encontraron concentraciones de metanol inferiores al 1%p/p, se deduce que la presencia de metanol de estos GlyC, no afectarían significativamente la PAL.

2.8 Resultados objetivo 3

2.8.1 Fermentaciones

Los datos obtenidos en términos de PAL y productividad volumétrica de biomasa fueron clasificados por volumen de fermentaciones (Vf) y medio aerobio (O) y anaerobio (SO) como se muestra en la Tabla 23, adicionalmente se muestran en la Figura 16 representando las desviaciones estándar en cada prueba.

Tabla 23.

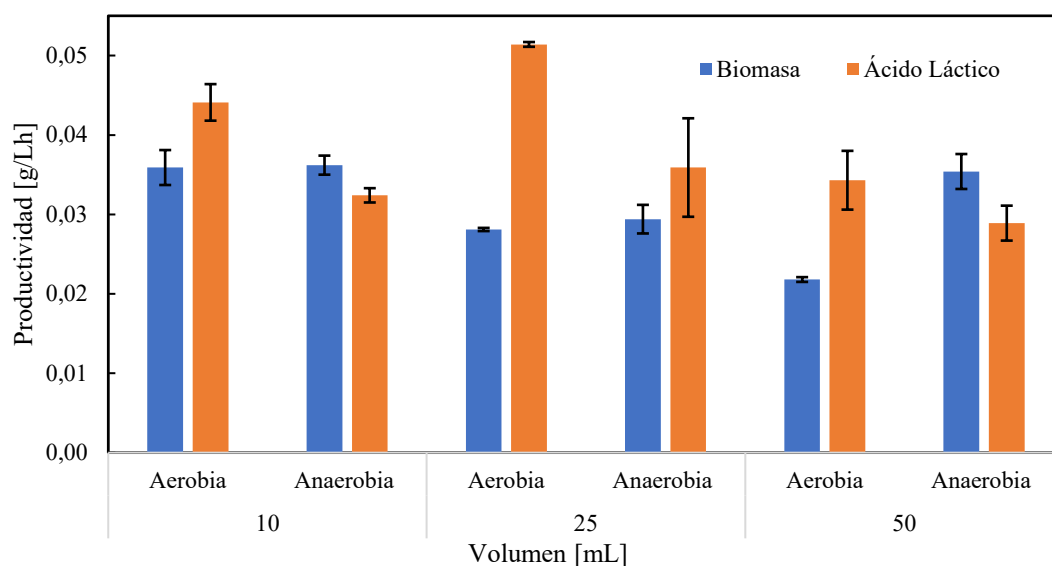
Productividades obtenidas de las pruebas para el análisis de las condiciones de aireación.

Volumen de fermentación [mL]	Aerobio (O)/ Anaerobio (SO)	Productividad [g/L*h]	
		Biomasa	Ácido Láctico
10	O	0,0359 ± 0,0022	0,0441 ± 0,0023
	SO	0,0362 ± 0,0012	0,0324 ± 0,0009
25	O	0,0281 ± 0,0002	0,0514 ± 0,0003
	SO	0,0294 ± 0,0018	0,0359 ± 0,0062

50	O	0,0218 ± 0,0003	0,0343 ± 0,0037
	SO	0,0354 ± 0,0035	0,0289 ± 0,0022

Figura 16.

Diagrama de barras de la productividad de ácido láctico y biomasa en diferentes volúmenes de fermentación.



Se empleó una prueba multivariable de significancia, Tabla 24, para evaluar si había diferencias significativas $p < 0,05$ (datos en rojo), de los factores en las variables dependientes, en este se encontró que los factores por separado tienen un efecto significativo, caso contrario para la interacción entre estos factores.

Tabla 24.

Test multivariable de significancia.

Efecto	Test	Valor	F	p
Intercept	Wilks	0,001227	1085,068	0,000003
SO/O	Wilks	0,046893	27,1	0,004058
Vf	Wilks	0,017216	8,829	0,003564

SO/O*Vf	Wilks	0,087947	3,163	0,067772
---------	-------	----------	-------	----------

Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 25, en la cual se observa que existen diferencias significativas entre las productividades de ácido láctico y biomasa con respecto al medio de aerobio/anaerobio y los volúmenes de fermentación. Se destaca que el factor del medio de oxígeno tuvo mayor influencia que el volumen de fermentación, en especial en la PAL (F = 33,4).

Tabla 25.

Resultado ANOVA univariante multifactorial productividad de biomasa y ácido láctico

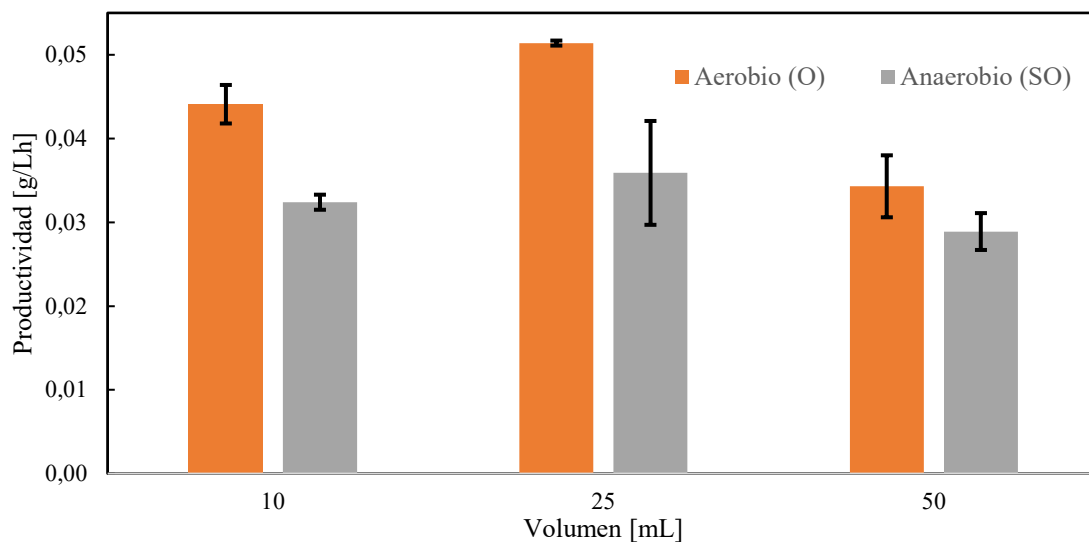
Efecto	Productividad de Biomasa				Productividad de ácido láctico			
	SS	MS	F	p	SS	MS	F	P
Intercepto	0,011619	0,011619	3108,06	2E-08	0,017146	0,01746	1621,123	2E-08
SO/O	0,000078	0,000078	20,873	0,003816	0,000354	0,000354	33,494	0,001165
Vf	0,000145	0,000072	19,338	0,002422	0,000291	0,000146	13,774	0,005721
SO/O*Vf	0,000109	0,000054	14,562	0,004985	0,000051	0,000026	2,413	0,170241
Error	0,000022	0,000004			0,000063	0,000011		
Total	0,000354				0,00076			

(SS) es la suma de cuadrados, (MS) media cuadrática, (f) coeficiente entre varianzas y (p) probabilidad en contra de la hipótesis nula; los datos en (rojo) tienen efectos significativos sobre la variable de respuesta.

Para visualizar mejor el comportamiento de la PAL que es el metabolito de interés, se utiliza un diagrama de barras en la Figura 17, en la cual se puede ver que la PAL tuvo mejores resultados en las fermentaciones aeróbicas en volúmenes de 25 mL

Figura 17.

Resultados de la productividad de ácido láctico en diferentes volúmenes de fermentaciones aerobias y anaerobias.



También se realizó un análisis Tukey para la PAL (Tabla 26), en la cual se evidencio que existen diferencias significativas entre los volúmenes de fermentación de 25 a 50 mL en pruebas aeróbicas, también se destaca que el volumen de 25 mL tuvo diferencias sobre todos los volúmenes de fermentaciones anaeróbicas.

Tabla 26.

Test Tukey para la productividad de ácido láctico

Cell No.	SO/O	Vf	{1} 0,03235	{2} 0,03590	{3} 0,02885	{4} 0,04405	{5} 0,05135	{6} 0,03430
1	SO	10		0,868919	0,874895	0,075521	0,008455	0,98714
2	SO	25	0,868919		0,366072	0,254501	0,022886	0,994686
3	SO	50	0,874895	0,366072		0,02467	0,003597	0,587679
4	O	10	0,075521	0,254501	0,02467		0,337653	0,146949
5	O	25	0,008455	0,022886	0,003597	0,337653		0,01438
6	O	50	0,98714	0,994686	0,587679	0,146949	0,01438	

En la Tabla 27, se muestra el porcentaje en el que aumento la PAL promedio entre fermentaciones anaeróbicas y aerobias que fueron de 36%, 43% y 19% entre los volúmenes de 10, 25 y 50 mL respectivamente, también se muestra el porcentaje de aumento de la productividad de

17% y 50% para fermentaciones aeróbicas comparando los volúmenes de 10 y 50 mL con la productividad en 25 mL respectivamente.

Tabla 27.

Porcentajes de aumento en la productividad de ácido láctico entre los factores.

Volumen Fermentación [mL]	SO/O	PAL Promedio	% SO/O	% Vol (O)
10	O	0,0441	0,36	(25-10) mL
	SO	0,0324		0,17
25	O	0,0514	0,43	(25-50) mL
	SO	0,0359		
50	O	0,0343	0,19	0,5
	SO	0,0289		

Las fermentaciones aerobias se encuentran a una concentración de oxígeno de aproximadamente 1,319 g/L, de acuerdo con las condiciones ambientales. El volumen de 10 mL tiene una relación de Vf sobre volumen de recipiente es de 1/12, por lo que representa el sistema más saturado de oxígeno con un mayor espacio de cabeza. De la misma forma el volumen de 50 mL representa una relación de 5/12 siendo el sistema más pobre de este nutriente, en este orden de ideas el volumen de 25 mL representa un sistema intermedio de 1/5, en donde no hay condiciones extremas en cuanto a la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio.

2.8.2 Escalamiento

Las dimensiones utilizadas, metodología de escalamiento y velocidades de agitación obtenidas se presentan en la Tabla 25. Como se observa, para el volumen de 2500 y 5000 mL el diámetro del impulsor (Di) permanece constante, esto se debe a que se utilizó el mismo biorreactor (New Brunswick BioFlo 110 de 7L).

Tabla 28.

Resumen del escalamiento adimensional

Volumen escalado [mL]	Metodología usada	Diámetro del impeler [cm]	Velocidad de agitación [rpm]
500	Re_i	5,259	190
2500	v_{tip}	5,973	167
5000	v_{tip}	5,973	167

2.8.3 Análisis de parámetros reológicos e hidrodinámicos:

En la Tabla 29 y 30 se presentan los parámetros reológicos y números adimensionales para la fermentación en el shaker y en los biorreactores que permiten comprender su comportamiento reológico e hidrodinámico. Por lo que se calcularon diferentes parámetros y números adimensionales que ayudan a entender el comportamiento reológico e hidrodinámico en los volúmenes de fermentación.

La viscosidad cinemática y la densidad para los caldos de fermentación fue de $1,04E^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ y 1000 kgm^{-3} , estos valores son cercanos al agua en condiciones normales. Teniendo en cuenta que el microorganismo no produce metabolitos poliméricos que podrían aumentar la viscosidad con el tiempo, el caldo se comportaría como un fluido newtoniano durante la fermentación. El número de Reynolds se mantuvo constante en un régimen turbulento de forma no intencional, debido a que los diámetros del impeler son iguales en los biorreactores.

El número de Froude en el vial fue mayor a 0,4 condición necesaria para poder evaluar la estabilidad de la agitación, de forma general el número de Froude disminuyó cuando se pasó del vial al biorreactor y se mantuvo en los biorreactores, esto puede indicar una disminución de las fuerzas inerciales en los caldos de fermentación.

El número de fase fue de 4,526, el cual se calculó únicamente para el vial porque este presenta agitación radial, este número ayuda a determinar si el medio se encuentra "en fase" ($Ph > 1,26$), estado en el cual el fluido se agita correctamente o "Fuera de fase" ($Ph < 1,26$), donde se crea un remolino en el centro radial de la agitación que reduce la eficacia del mezclado y la transferencia de oxígeno.

Tabla 29.

Parámetros medidos para el escalamiento

Escalamiento con Reynolds y con velocidad de punta del impulsor				
Volumen (mL)	25	500	2500	5000
Di (cm)	5,128	5,259	5,973	5,973
Dint (cm)	5,128	10,5423	18	18
Ni (rpm)	200	190,16	167	167
Núm. Imp.	NA	2	2	2
v (m²s⁻¹)	1,04E-06	do (cm)		2
ρ (kgm-3)	1000	k (impeler)		10

Tabla 30.

Parámetros reológicos e hidrodinámicos calculados

Resumen del comportamiento reológico e hidrodinámico del caldo de fermentación				
Volumen (mL)	25	500	2500	5000
Re	8425,31	8425,31	9569,19	9569,19
Vtip (ms⁻¹)	Na	0,524	0,524	0,524
Fr	0,4471	0,0538	0,0474	0,0474
Ph	4,5261	Na	Na	Na
Np	0,36	7,58	7,77	7,86
Po (W)	0,0027	0,0971	0,1284	0,1298
Po/V (Wm⁻³)	109,2258	194,1424	51,3430	25,9688
Ac (m²)	0,0021	0,0087	0,0254	0,0254
ε (Wkg⁻¹)	0,0355	0,6674	0,6023	0,6093
λ (um)	75,04	36,04	36,98	36,87
γ (s⁻¹)	80	33,3333	31,6934	27,9048

τ (Nm^{-2})	0,1922	0,0347	0,0330	0,0290
t_m (s)	0,0857	1,6704	6,4745	12,9489

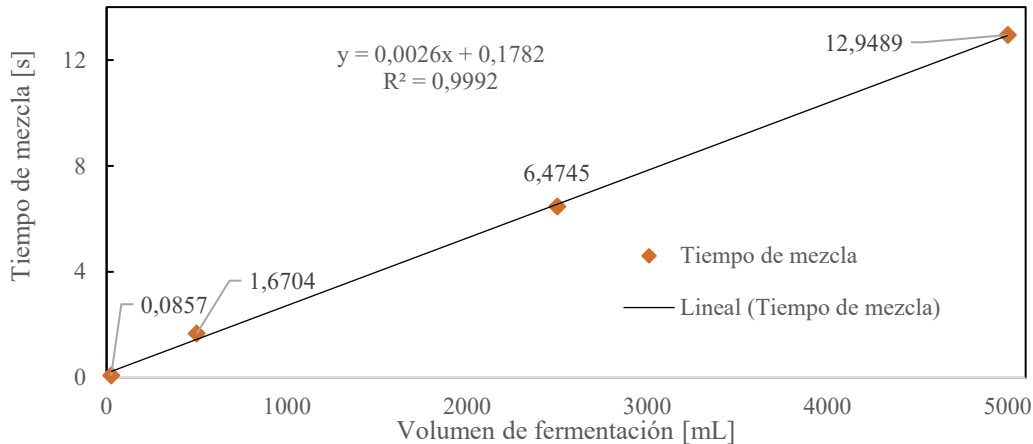
El consumo de energía por volumen de fermentación, se considera una medida de la intensidad de la mezcla y la tasa de transferencia de masa en el sistema, se destaca que para el volumen de 500 mL; este valor aproximadamente se duplico en relación con el volumen de control (vial), por lo cual en este V_f se esperan mejores resultados en cuanto a la producción de ácido láctico. En cambio, en fermentaciones de 2500 y 5000 mL se redujo 3 y 5 veces respectivamente por lo que se espera que disminuya la tasa de producción a medida que aumente la escala.

La escala de mezclado Kolmogorov representa el tamaño de los remolinos generados por la turbulencia del sistema, los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango para viscosidades bajas como el agua, entre (30-100 μm); este parámetro se redujo aproximadamente a la mitad en el cambio escala del vial al biorreactor esto puede aumentar el riesgo de estrés celular debido a una mayor cercanía con el tamaño de las bacterias. De forma similar se redujo la velocidad de cizallamiento que representa la fuerza motriz para la transferencia de momento, esto quiere decir que existen menores gradientes de velocidad en los biorreactores. La tensión de cizallamiento se redujo cinco veces su valor desde el vial al biorreactor representando una reducción de la fuerza aplicada al sistema.

El tiempo de mezcla (t_m) en el presente estudio tiene una tendencia lineal con respecto al volumen de fermentación con un error cuadrático de (R^2) de 0,99, como se muestra en la Figura 18, el gran aumento que presenta el t_m podría tener efecto desfavorable en la producción de ácido láctico debido a que un mayor tiempo de mezcla influye negativamente en la transferencia de masa produciendo zonas muertas en interior del biorreactor, aunque el efecto es mucho mayor en fermentaciones heterogéneas el cual no es el caso.

Figura 18.

Relación volumen de fermentación versus tiempo de mezcla.



El
análisis
reológico
e

hidrodinámico mostró que la agitación es insuficiente, teniendo en cuenta que es menor que la del volumen de control de 25 mL. Esta misma conclusión la obtuvo Deniz (2015), en un escalamiento de bioetanol desde un volumen de 2 a 8 L, empleando la V_{tip} , donde la tasa de agitación fue menor que la del volumen de control, obteniendo resultados desfavorables en cuanto los parámetros reológicos e hidrodinámicos. Además, comprobó experimentalmente que con este método se obtenía una menor productividad que con aquellos con los cuales se obtenían tasas de agitación mayores a las del volumen de control.

De acuerdo con lo anterior, se esperan mejores resultados en los volúmenes de fermentación de 500 y 25 mL respectivamente, y una reducción en la tasa de producción de AL a medida que aumenta la escala, por lo que se recomienda usar metodologías como tiempo de mezcla y consumo de energía por volumen de fermentación en las cuales la tasa de agitación aumenta con el cambio de escala para asegurar una mezcla adecuada y que no se produzca lisis celular (Deniz et al., 2015).

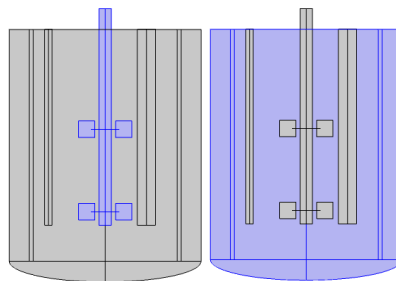
2.8.4 Análisis CFD

2.8.4.1 Diseño geométrico. La representación de los modelos geométricos para los volúmenes de 500, 2500 y 5000 mL con sus respectivas mediciones (altura ajustada al volumen de reacción) se presentan en la Figura 19.

2.8.4.2 Diseño del dominio rotatorio. En la Figura 19 se presenta la unión aplicada entre los impeler y el eje de impulsor con la separación aplicada entre el tanque y los sensores. Una vez obtenido el dominio giratorio se definió la velocidad de agitación para los volúmenes (500, 2500 y 5000 mL) en 190, 167 y 167 rpm respectivamente.

Figura 19.

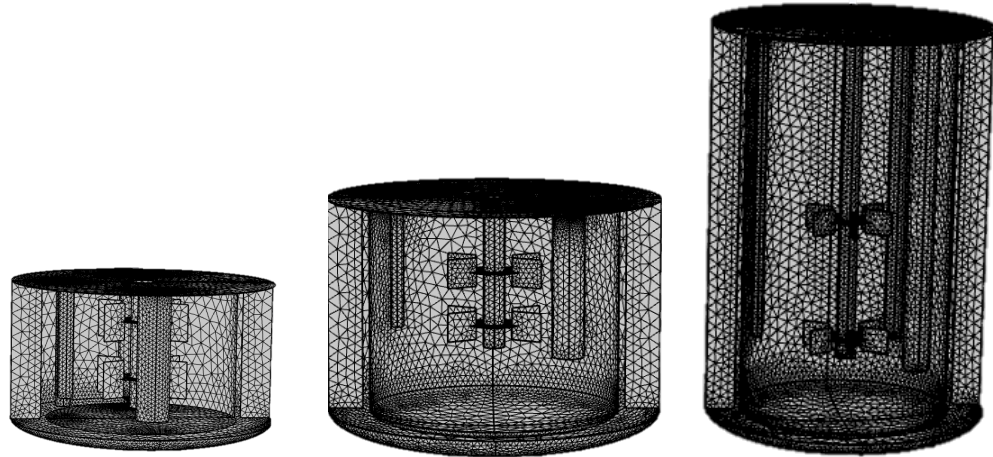
Aplicación de booleanos en el diseño geométrico de los biorreactores



2.8.4.3 Selección de la malla y el paquete de fluidos. La Figura 20 se muestran los modelos en 3D de los biorreactores con la malla de tamaño normal. En los cuales se observa, que el tamaño de malla utilizado se ajusta correctamente al tamaño de los objetos incluidos en el mismo sin presentar inconsistencias en la creación del modelo, por lo tanto, se determina que el tamaño de malla seleccionado es el adecuado. En cuanto a las propiedades del paquete de fluidos para flujo turbulento k- ϵ , se definieron en función de las propiedades físicas del agua ($\mu = 1,1 * 10^{-3} Pa * s$ y $\rho = 1000 Kg m^{-3}$) y la temperatura fue establecida en 37 °C y 1 atm.

Figura 20.

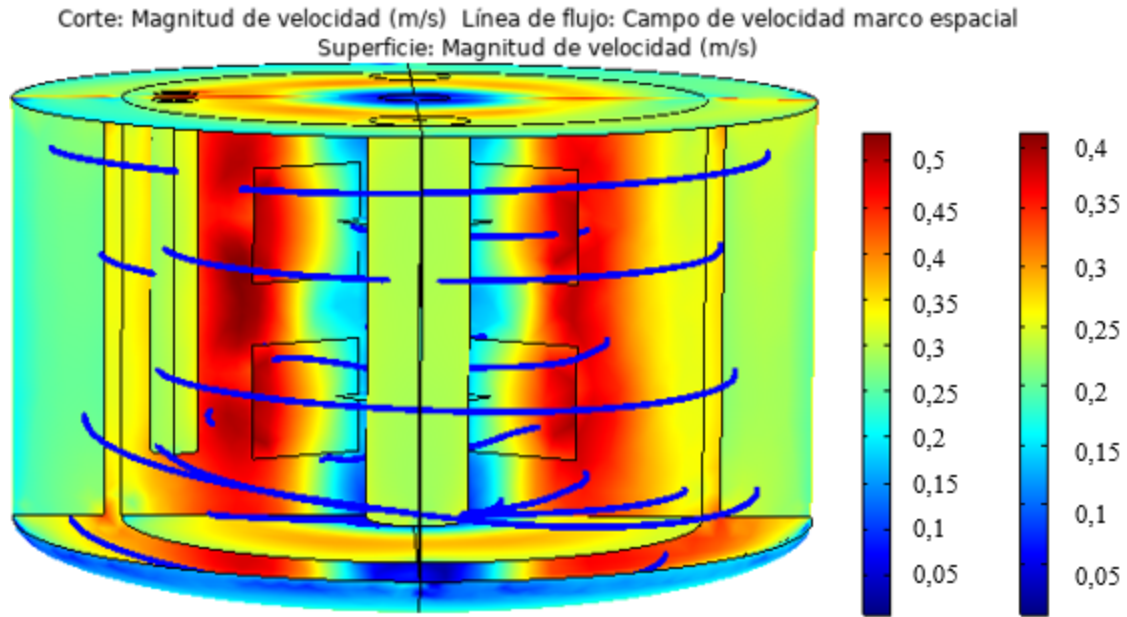
Modelos geométricos de los fermentadores de izquierda a derecha de los volúmenes de fermentación de 500, 2500 y 5000 mL con malla de tamaño normal.



2.8.4.4 Simulación. Los resultados de la simulación se presentan en forma de perfiles de velocidad para los volúmenes de 500, 2500 y 5000 mL los cuales se muestran en las Figuras 21, 22 y 23 respectivamente. En el caso del perfil de 500 mL se observa que las líneas de flujo (representadas en color azul), presentan un comportamiento homogéneo y equiespaciado; respecto a la velocidad del fluido, el cual está representado por la escala de color de la izquierda con un valor máximo de $0,524 \text{ ms}^{-1}$ (este corresponde al valor de V_{tip} obtenido del escalamiento), los rangos se encuentran entre $0,35$ a $0,45 \text{ ms}^{-1}$ y la velocidad cerca de las paredes entre $0,25$ a $0,35 \text{ ms}^{-1}$. Por último, se destaca que no se presentan zonas muertas (zonas con velocidades cercanas a 0), lo cual pudo ser atribuido a al uso de los baffles que minimizan la formación de vórtices.

Figura 21.

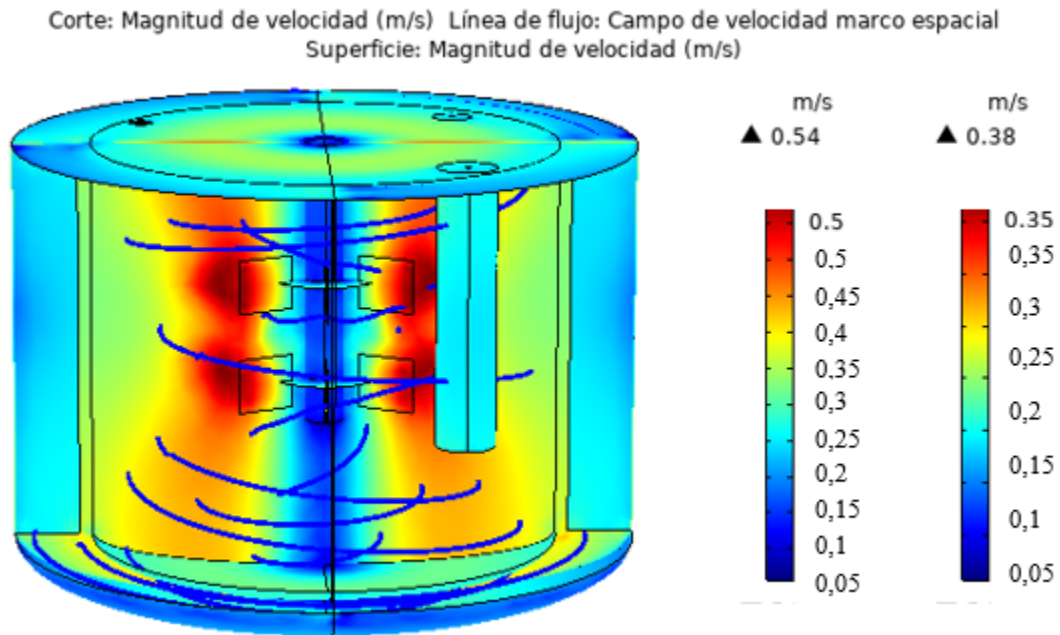
Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 500 mL.



En la Figura 22 se presenta el perfil para el volumen de 2500 mL, en este se observa una mayor variación en los rangos de velocidad, para el caso de la velocidad del fluido los rangos se encuentran entre $0,30$ a $0,45 \text{ ms}^{-1}$ y en las paredes del biorreactor entre $0,15$ a $0,25 \text{ ms}^{-1}$. A pesar de no presentarse zonas muertas, se observa que en el fondo del tanque se genera un pequeño vórtice que puede estar relacionado con la distancia entre el agitador y el fondo del tanque. Por último, las líneas de flujo del fluido indican que sigue existiendo una distribución del fluido por todo el biorreactor, pero en este caso las líneas de flujo se tornan menos homogéneas en la parte superior e inferior de los biorreactores.

Figura 22.

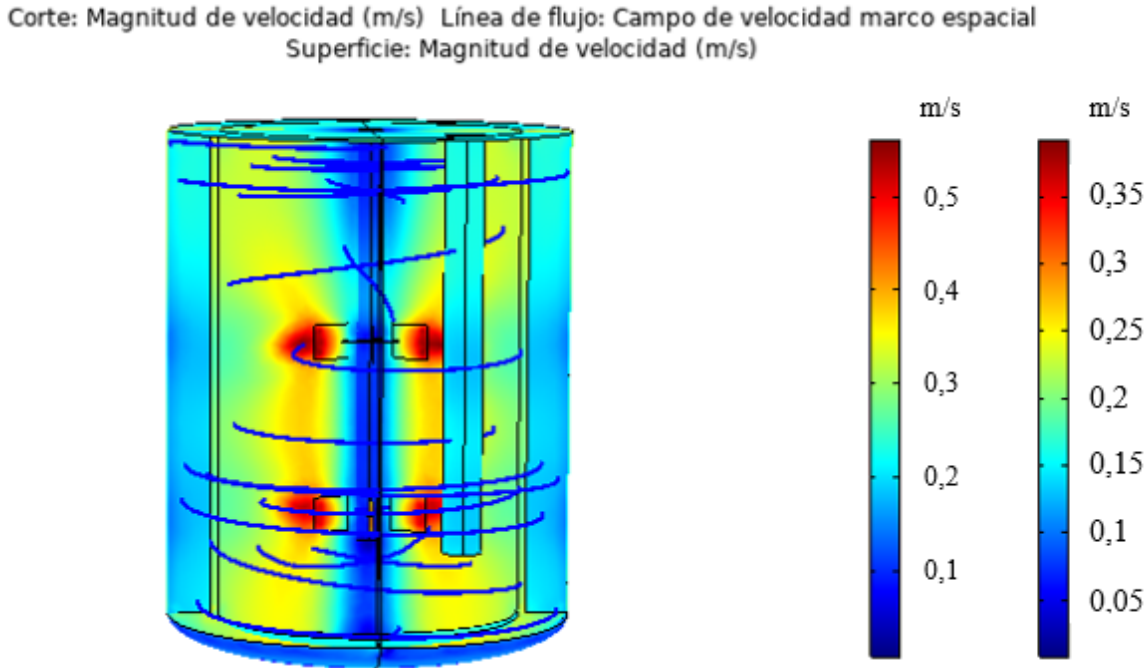
Perfil de velocidad para volumen de fermentación de 2500 mL.



El modelo de 5000 mL presentado en la Figura 23 se simuló con las mismas dimensiones del biorreactor empleado en la escala anterior (cambiando la altura del fluido y la distancia entre los impeler). En este se observa una reducción considerable de los rangos de velocidad, en el caso de la velocidad del fluido se encuentran entre $0,2$ a $0,4 \text{ ms}^{-1}$, y en las paredes entre $0,1$ a $0,2 \text{ ms}^{-1}$, lo cual implica la agitación dentro del biorreactor no se acerca a las condiciones esperadas (V_{tip}). En el caso de las líneas de flujo no presentan un comportamiento homogéneo y las distribuciones de estas líneas permiten observar la generación de vórtices los cuales pueden afectar considerablemente la transferencia de nutrientes y oxígeno.

Figura 23.

Perfil de velocidad para volumen de fermentación de 5000 mL.



Comparando el volumen de fermentación de 5000 mL con los anteriores se puede concluir que existen cambios significativos por lo cual es necesario implementar modificaciones en el volumen de 5000 mL, que permitan mejorar el perfil. Se plantearon diferentes alternativas las cuales fueron analizadas en función de las disponibilidades de equipos en el laboratorio y que pudieran ser implementadas de manera inmediata.

Para la selección de la estrategia se consideraron dos criterios: el primero está relacionado con relaciones dimensionales y configuraciones del biorreactor, de acuerdo con parámetros de diseño teóricos presentados por Doran (P. Doran, 2013) y que fueran viables para implementación en los equipos existentes del laboratorio. La segunda parte, está relacionada con parámetros o relaciones adimensionales de escalamiento que se podrían aplicar de acuerdo con la información

disponible, variando únicamente la velocidad de agitación. En la Tabla 31, se resumen las propuestas encontradas con sus respectivos análisis; en la Tabla 32 se resumen las estrategias y mejoras implementadas comparadas con el modelo original

Tabla 31.

Criterio de selección de propuesta de mejora para 5000 mL.

Propuesta	Ventaja	Limitación
Comprobar los diámetros del impeler con criterios de diseño	Se obtienen los agitadores con el mejor diseño posible para mejorar el proceso de agitación	Se debe construir los impeler
Proponer un tercer impeler con posiciones equiespaciadas en el volumen del líquido	Se mejora la agitación agregando un tercer impeler y la implementación de este al sistema es sencilla	Se debe comprar un impeler adicional para el equipo
Cambiar la agitación proponiendo otra estrategia de escalamiento usando el parámetro Po/V	El cálculo de este parámetro ya fue realizado en el análisis reológico e hidrodinámico, por lo cual la velocidad de agitación puede ser determinada.	No se presenta limitación el realizar la propuesta de mejora.

Tabla 32.

Comparación de los parámetros principales de los agitadores con volumen de 5000 mL.

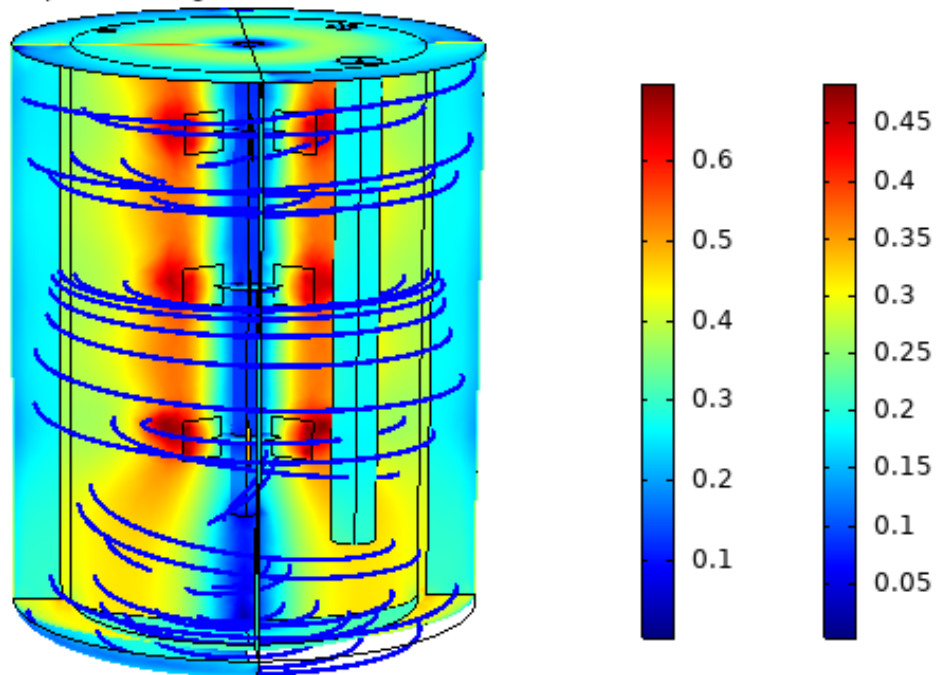
Parámetro	5000 mL sin modificar	5000 mL modificado
Altura de volumen de fermentación [mm]	245	245
Diámetro del impeler [mm]	59,730	59,730
Cantidad de impeler	2	3
Altura del fondo al primer impeler [mm]	40,00	59,730
Longitud del agitador [mm]	185,270	185,270
Distancia entre impeler [mm]	80	61,76
Velocidad de agitación [rpm]	167	210

En la Figura 24, se presenta el perfil de velocidad de 5000 mL con las mejoras implementadas. En este caso las líneas de flujo presentan un comportamiento más homogéneo y equiespaciado, también se destaca que se redujo la formación de vórtices en el fondo del equipo y se eliminó el vórtice presentado en la superficie el fluido. Por otro lado, los rangos de velocidad del fluido se encuentran entre 0,4 a 0,5 ms^{-1} y en las paredes entre 0,2 a 0,3 ms^{-1} es decir que tiene reducción mínima en comparación con demás.

Figura 24.

Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL con la implementación de las mejoras.

Corte: Magnitud de velocidad (m/s) Línea de flujo: Campo de velocidad marco espacial
Superficie: Magnitud de velocidad (m/s)



En la Tabla 33 y 34, se muestran los porcentajes de eficiencia de la distribución de la velocidad en el fluido y en las paredes de los biorreactores respectivamente, evidenciando que hay una reducción desde el 81% en el volumen de 500 mL hasta un 57% para el volumen de 5000 mL.

Con la implementación de la propuesta de mejora en este volumen, se logró aumentar e incluso superar la eficiencia del 86% encontrada en el volumen de 500mL. Igualmente, también se evidencio un aumento del 10% en la eficiencia del perfil de velocidad en las paredes del volumen de 5000 mL con respecto al modelo con y sin la implementación de las mejoras.

Tabla 33. *Porcentajes de eficiencia de la distribución de la velocidad en el fluido.*

Velocidad máx. [m/s]	Volumen de fermentación [mL]	Velocidad en el fluido [m/s]		
		Rango vel.	Vel. Prom.	% Eficiencia
0,524	500	(0,35-5)	0,425	81%
	2500	(0,3-0,45)	0,375	72%
	5000	(0,2-0,4)	0,3	57%
	5000*	(0,4-0,5)	0,45	86%

*Volumen con las modificaciones implementadas

Tabla 34.

Porcentajes de eficiencia de la distribución de la velocidad en las paredes

Velocidad máx. [m/s]	Volumen de fermentación [mL]	Velocidad en las paredes [m/s]		
		Rango vel.	Vel. prom.	% Eficiencia
0,524	500	(0,25-0,35)	0,3	57%
	2500	(0,15-0,25)	0,2	38%
	5000	(0,15-0,25)	0,2	38%
	5000*	(0,2-0,3)	0,25	48%

*Volumen con las modificaciones implementadas

2.9 Resultados objetivo 4

2.9.1 Resultados de las fermentaciones

Una vez realizadas las fermentaciones en 25, 500 y 5000 mL se obtuvieron concentraciones máximas de ácido láctico (AL) 1,570, 1,498 y 0,281 g/L respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los resultados de la simulación del proceso de escalamiento (objetivo 3), donde se encontró que el volumen de fermentación de 5000 mL tenía unas condiciones de agitación insuficientes que afectarían la transferencia de masa y calor en el

sistema; reduciendo la productividad en volúmenes mayores. Se hace énfasis en que la implementación de la propuesta de mejora no fue posible, debido que no se contaba con el agitador que encajara adecuadamente con el eje del biorreactor de 5000 mL, por lo que se recomienda para futuros estudios.

Como se muestra en la Figura 25, la concentración de AL en 5000 mL tuvo variaciones muy leves en comparación con lo encontrado en volúmenes de 25 y 500 mL, este patrón se repite en la Figura 26 para la concentración de biomasa, lo anterior podría indicar que la bacteria se encuentra en una fase exponencial muy lenta, presentando un comportamiento similar al de la fase estacionaria donde reduce la producción metabolitos y el crecimiento celular. En cuanto al consumo de glicerol crudo mostrado en la Figura 27, se observa que el volumen de 25 mL tiene un consumo mucho más rápido de GlyC que en los otros dos volúmenes de fermentación evaluados, esto puede deberse a las diferencias en la agitación, dado que se pasa de una agitación orbital en el volumen de 25 mL, a una agitación de radial con paletas en los biorreactores; también se le atribuyen los problemas de distribución de nutrientes ralentizan el consumo de sustrato.

Figura 25.

Curva de concentración de AL en función del tiempo.

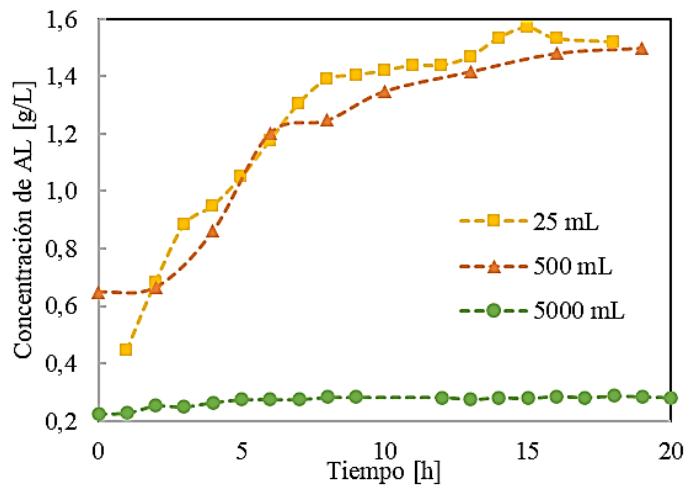


Figura 26.

Curva de concentración de biomasa en función del tiempo.

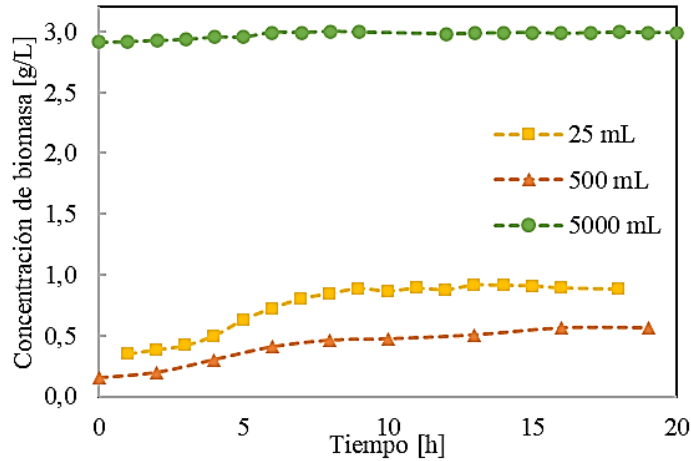
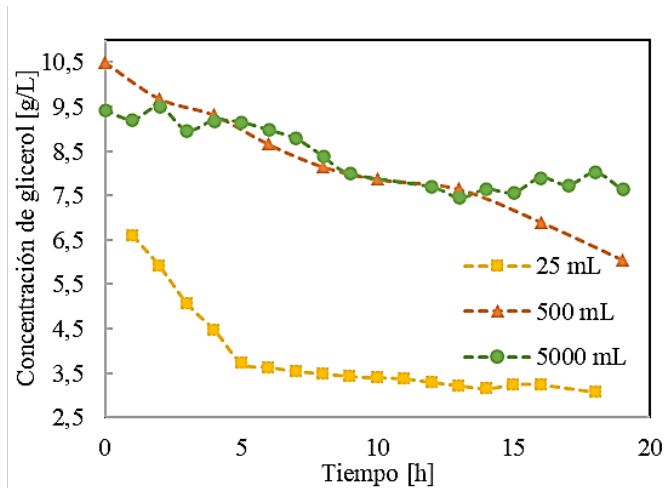


Figura 27.

Curva de concentración de GlyC en función del tiempo.



Sin embargo, a pesar de las diferencias entre el consumo de sustrato y la producción de metabolitos de los volúmenes de fermentación estudiados, de forma individual se analizó cada fermentación para determinar su fase exponencial; con el fin de emplear los datos experimentales

en un modelo cinético que se ajustara a los tres volúmenes de fermentación, y analizar la variación de los parámetros cinéticos a lo largo del escalamiento.

2.9.2 Resultados de la estimación de los parámetros cinéticos

Utilizando el algoritmo matemático programado en Matlab para el ajuste de los modelos cinéticos, se logró ajustar los 6 modelos seleccionados de acuerdo con el criterio de RMS establecido.

Dentro de los resultados obtenidos en la Tabla (35), se observa que el modelo de tipo Tessier 1 (T1) presentó el valor más bajo de RMS para los volúmenes de 500 y 5000 mL respectivamente (0,1670 y 0,1148) y el modelo de Aiba, en el caso de 25 mL (0,05766). También, se observa en la Tabla 2, que la diferencia de los valores de RMS entre tipo T1 y tipo Tessier 2 (T2) son muy cercanos en todos los volúmenes.

En el caso de los modelos con menor ajuste, se observa que Haldane presenta el valor de RMS más alto en el volumen de 25 mL, esto implica que comparado con los demás modelos es el que menos ajusta utilizando los datos experimentales (RMS=0,6810) y en el volumen de 500 y 5000 mL el modelo de Aiba (RMS=1.4565 y RMS=0,87498 respectivamente).

Tabla 35.

Estimación de parámetros cinéticos en la fermentación de ácido Láctico.

Modelo	Volumen [mL]	RMS	Parámetros		
			μ_m [1/h]	k_s [g/L]	N_a
Monod	25	0,22559	0,10664	4,9890	--
	500	0,72417	0,11175	9,9817	--
	5000	0,16764	0,00169	14,9418	
Mosser	25	0,22418	0,080081	4,9784	1,4456
	500	0,22425	0,076189	9,9887	1,2398
	5000	0,16753	0,001327	14,9901	1,1328
Tipo Tessier 1	25	0,0612	0,3945	0,2532	2,2694
	500	0,1670	0,0053	0,3255	1,1009
	5000	0,1148	0,9539	0,0057	1,0471
Tipo Tessier 2	25	0,05814	0,1283	0,2889	2,3815
	500	0,17140	0,0175	0,1582	1,0107
	5000	0,12860	2E-4	0,2491	4,0355
Halklane	25	0,6810	0,4168	29,6018	35,3216
	500	0,2612	0,1390	19,7955	18,5519
	5000	0,1724	0,0019	9,9713	9,9690
Aiba	25	0,05766	7,00167	1,73295	0,58495
	500	1,45650	0,03012	0,25363	17,54216
	5000	0,87498	2,54270	0,33782	0,73196

2.9.3 Resultados selección del modelo

Al realizar el análisis de los resultados con el criterio AIC (Tabla 36), el cual determina el modelo que se ajusta mejor a los datos experimentales, seleccionando aquel que obtenga menor valor numérico en los tres volúmenes fermentativos, se encontró que el modelo de Aiba (AIC=-44,226) es el mejor para 25 mL. Enseguida, el modelo T2 con (AIC=-44,1083), lo cual guarda

relación con los datos obtenidos por Gamboa (2015) (Gamboa-Rueda et al., 2015). En el caso de los volúmenes de 500 y 5000 mL el modelo T1, fue el mejor con valores de AIC de -37,9998 y -43,2489 respectivamente.

Tabla 36.

Resultados del criterio de selección AIC.

Modelo	Criterio de información Akaike		
	25 mL	500 mL	5000 mL
Monod	-33,7931	-17,4650	-37,9502
Mosser	-33,8811	-33,8765	-37,9595
Tipo Tessier 1	-43,3907	-37,9998	-43,2489
Tipo Tessier 2	-44,1086	-37,6390	-41,6617
Handale	-9,6581	-31,7421	-37,5619
Aiba	-44,2258	-7,6823	-14,8166

Con el anterior criterio, se procedió a realizar una selección entre el modelo cinético obtenido con T1 y tipo T2 debido a que estos presentan buen ajuste, y se requiere unificar un solo modelo que permita hacer comparación entre los tres volúmenes fermentativos. Finalmente, se eligió el modelo T1 como el mejor modelo cinético ajustado para todos los datos experimentales.

Tabla 37.

Rendimientos y constantes de mantenimiento para el modelo tipo T1.

Volumen	$Y_{x/s}$	m_s [1/h]	$Y_{p/s}$	m_p [1/h]
25 mL	0,3180	0,0032	1,0025	0,0203
500 mL	0,2234	0,0991	1,2439	0,0048
5000 mL	0,0939	0,0322	0,1804	0,0004

Además, para el modelo seleccionado también se calcularon los valores óptimos para los rendimientos teóricos y las constantes de mantenimiento como se muestra en la Tabla 37. Con base en la información obtenida se generó una representación gráfica de los modelos comparando los datos experimentales y el modelo ajustado T1 para la producción de biomasa, generación de

producto, consumo de sustrato y velocidad específica de crecimiento en función del tiempo para los tres volúmenes de fermentación, las cuales se presentan en las Figuras 28, 29 y 30.

Figura 28.

Representación gráfica de los datos experimentales y modelos cinético tipo T1 ajustado para el volumen de 25 mL.

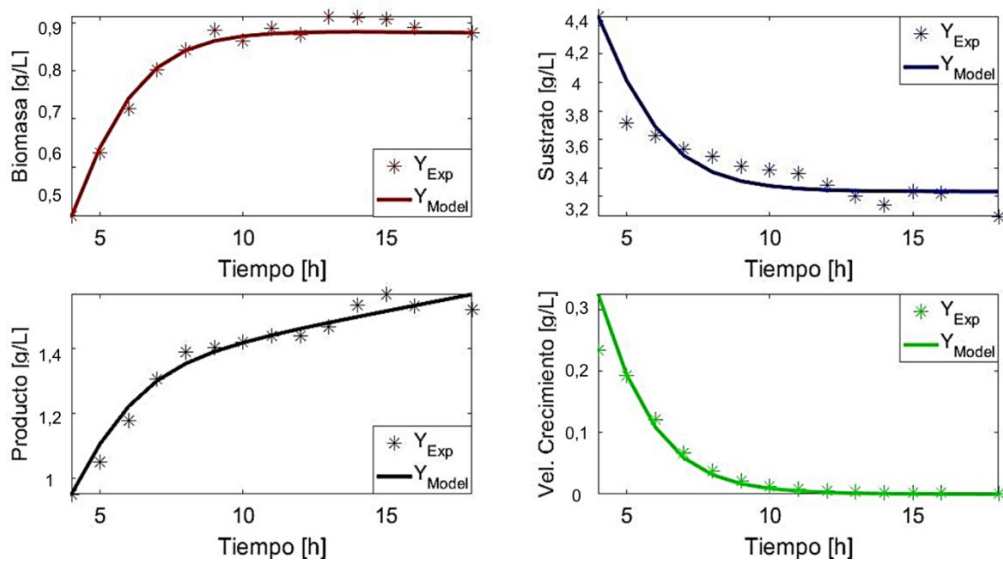


Figura 29.

Representación gráfica de los datos experimentales y modelo cinético tipo T1 ajustados para el volumen de 500 mL.

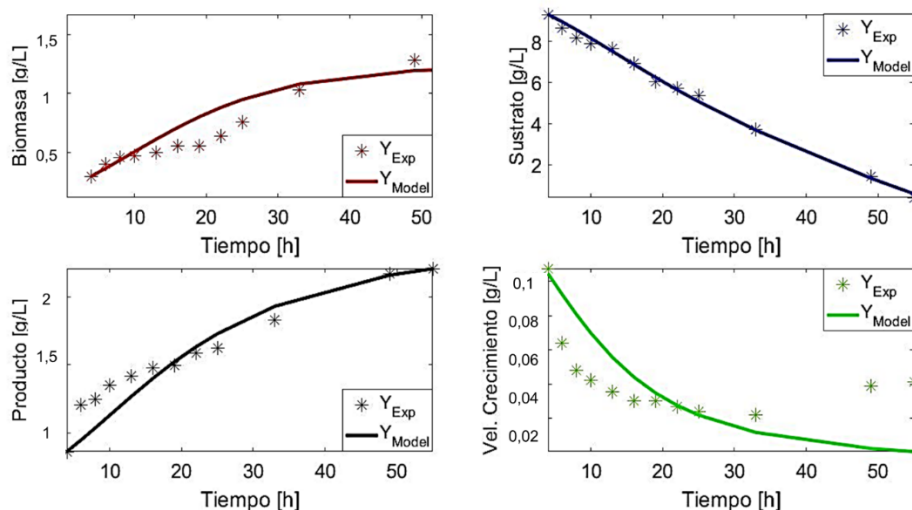
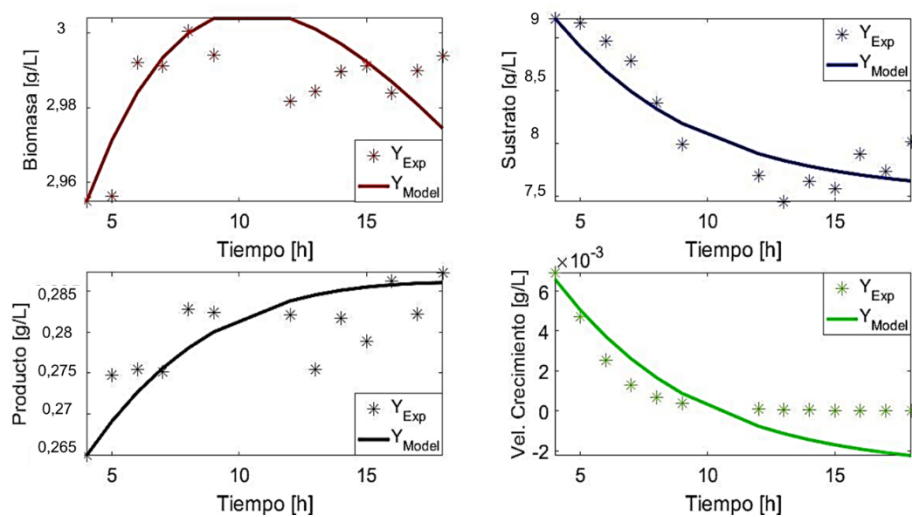


Figura 30.

Representación gráfica de los datos experimentales y modelo cinético tipo T1 ajustados para el volumen de 5000 mL.



2.9.4 Resultados análisis de identificabilidad de los parámetros

Se realizó el análisis de identificabilidad para los parámetros de tipo T1 en los tres volúmenes de fermentación, utilizando un rango de análisis de 30% del valor optimizado. La identificabilidad de los parámetros en el volumen de 25 mL se presenta en la Figura 31.

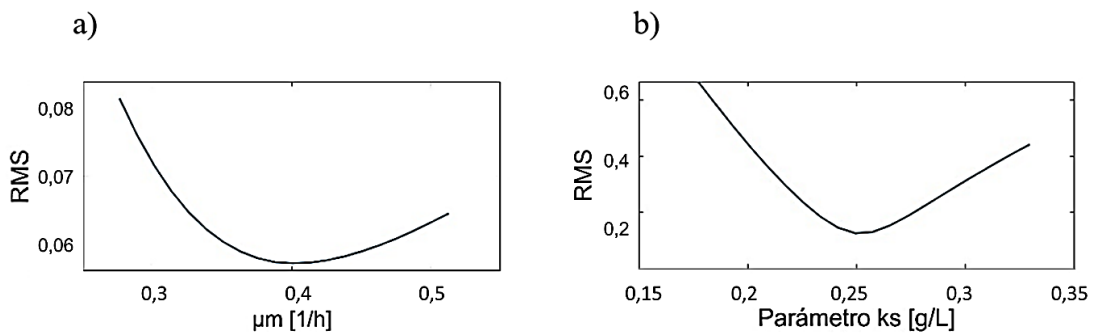
En la Figura 31a se observa que al realizar un cambio en la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) el valor de la función RMS cambia drásticamente. Esta apreciación indica que el parámetro ajustado puede considerarse identificable.

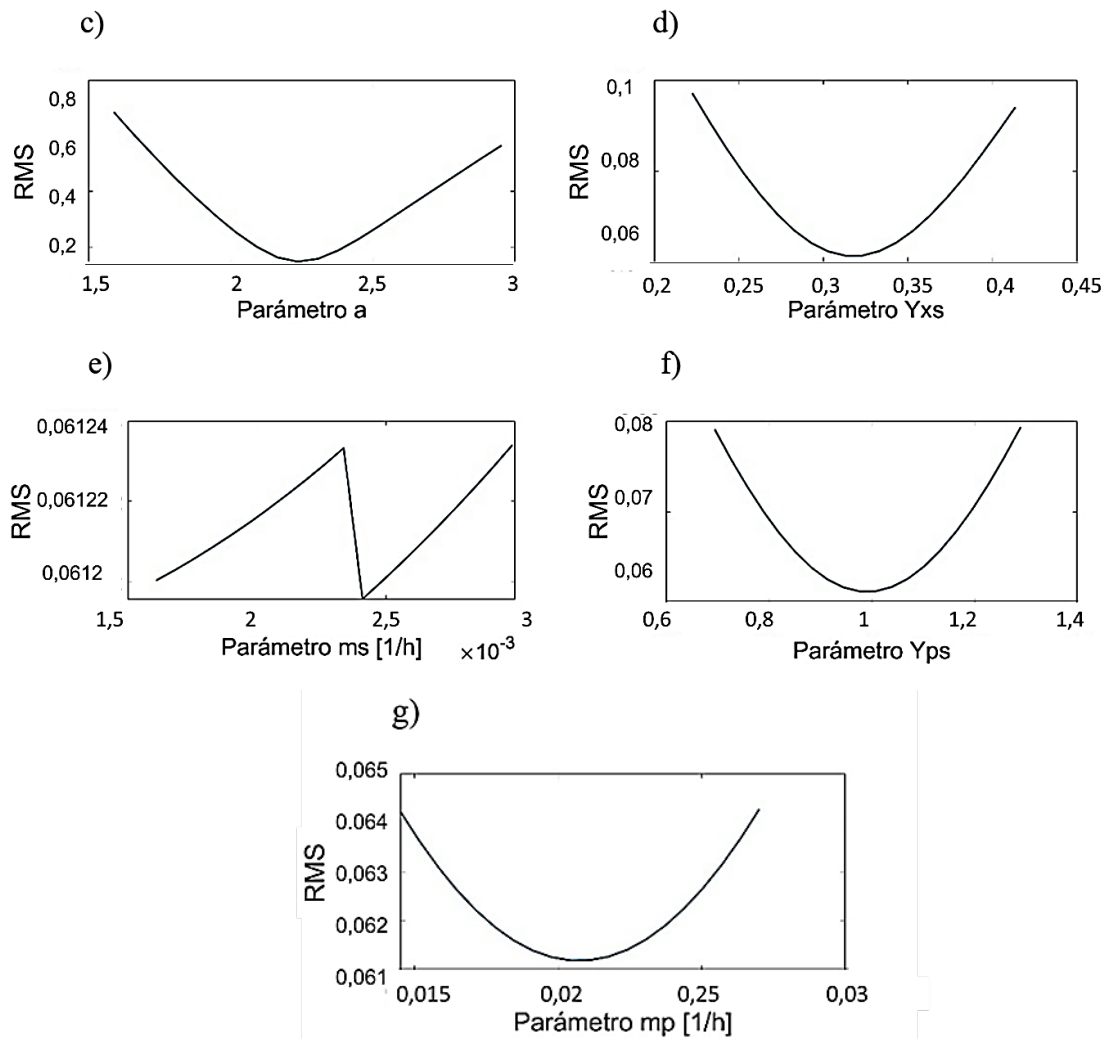
El comportamiento mencionado anteriormente también se presenta para los parámetros (k_s , a , Y_{xs} , Y_{ps}). Por lo tanto, se concluye que estos parámetros son identificables.

Caso contrario a los parámetros m_s y m_p que se observan en las Figuras 31e y 31g, respectivamente. En estas figuras se observa que el efecto en la función RMS es mínimo al realizar una modificación en estos parámetros, lo cual nos permite determinar que estos parámetros son no identificables.

Figura 31.

Análisis de sensibilidad de los parámetros cinéticos utilizando el modelo tipo T1 en el volumen de 25 mL.





Igualmente se realizó el análisis para los volúmenes de 500 y 5000 mL. En la Tabla 38 se presentan los resultados.

Tabla 38.

Análisis de sensibilidad de los parámetros cinéticos utilizando el modelo tipo T1 en volúmenes de 500 y 5000 mL.

Parámetro	25 mL	500 mL	5000 mL
μ_m	Identificable	Identificable	No Identificable
Ks	Identificable	Identificable	Identificable
A	Identificable	Identificable	Identificable
Y _{xs}	Identificable	Identificable	Identificable
ms	Identificable	Identificable	No Identificable
Y _{ps}	Identificable	Identificable	No Identificable
mp	No identificable	No identificable	No Identificable

3. Conclusiones

- De acuerdo con la caracterización realizada, se concluye que la muestra S3 tiene mayor potencial como fuente de carbono en procesos fermentativos debido a su alto contenido de glicerol y bajo contenido de compuestos minoritarios. Además, se obtuvieron los valores de concentración de ácido láctico más altos estadísticamente.
- Los componentes minoritarios con influencia positiva, de acuerdo a la magnitud de sus efectos, fueron los jabones y la fase orgánica (FO) respectivamente. En contraste, el metanol influyó negativamente en concentraciones mayores a 1,5 g/L. La productividad de ácido láctico óptima local (rango evaluado), se obtuvo para 3 g/L, 0,5 g/L y 3,8 g/L para jabón, metanol y FO respectivamente.
- Es necesario realizar mejoras en la configuración de los biorreactores existentes en el laboratorio, como la inclusión de un nuevo impulsor, aumento de la velocidad de agitación y selección de parámetros en el escalamiento.

- Se esperan mejores productividades experimentales en los volúmenes de fermentación de 500 y 25 mL respectivamente, y una reducción en la tasa de producción de ácido láctico a medida que aumenta la escala (sin las mejoras propuestas).
- El modelo tipo Tessier T1 tuvo estadísticamente un mejor ajuste en los tres volúmenes de fermentación estudiados (25, 500 y 5000 mL).
- El análisis de identificabilidad para el modelo T1 permite concluir que los parámetros cinéticos son confiables para describir el proceso de fermentación en volúmenes de 25 y 500 mL. Caso contrario para el volumen de 5000 mL, donde se encontró que 4 de los 6 parámetros son 'no identificables'.

Referencias Bibliográficas

- Aballay, P. M., Padoin, N., Ortiz, O., & Soares, C. (2012). *Fluid Flow Modeling in a Bioreactor Applied to Wine Production*. November. https://www.comsol.eu/paper/download/293551/soares_presentation.pdf
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
- Adnan, N. A. A., Suhaimi, S. N., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., & Phang, L. Y. (2014). Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>
- Akaike, H. (1974). A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., & Jirstrand, M. (2014a). Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. In *Metabolic Engineering* (Vol. 24, pp. 38–60). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.007>
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., & Jirstrand, M. (2014b). Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. In *Metabolic Engineering* (Vol. 24, pp. 38–60). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.007>
- AOCS. (2017). *AOCS Official Method Ca 5a-40*.
- Aragón C., O., & Montoya C., D. (2010). Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de Biodiesel. *Revista Palmas*, 31(especial, SE-Artículos), 126–135. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1559>

- Ardestani, F., Rezvani, F., & Najafpour, G. (2017). Fermentative lactic acid production by lactobacilli: Moser and Gompertz kinetic models. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(2), 67–74.
- Aslanbay Guler, B., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S. S., & Imamoglu, E. (2019). Comparison of different photobioreactor configurations and empirical computational fluid dynamics simulation for fucoxanthin production. *Algal Research*, 37(May 2018), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.019>
- ASTM. (2017). *ASTM D6584 - Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography*. Annual Book of ASTM Standards. <https://doi.org/10.1520/D6584-13E01>
- Beckers, V., Poblete-Castro, I., Tomasch, J., & Wittmann, C. (2016). Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA-producing *Pseudomonas putida* grown on glycerol. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0470-2>
- Beopoulos, A., Chardot, T., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. In *Biochimie* (Vol. 91, Issue 6, pp. 692–696). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.004>
- Buss, A., Suleiko, A., Rugele, K., & Vanags, J. (2017). CFD Analysis of a Stirred Vessel Bioreactor with Double Pitch Blade and Rushton Type Impellers. *2017 COMSOL Conference, 1*, 2017.
- Bylund, F., Collet, E., Enfors, S. O., & Larsson, G. (1998). Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s004490050427>
- Cardeño, F., Gallego, L. J., & Rios, L. A. (2011). Refinación de la fase glicerina del biodiesel de

- aceite de palma empleando ácidos minerales. *Informacion Tecnologica*.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600003>
- Cheng, K. K., Zeng, J., Jian, J. H., Zhu, J. F., Zhang, G. X., & Liu, D. H. (2019). Model-based temperature control for improving lactic acid production from glycerol. *RSC Advances*, 9(21), 11614–11620. <https://doi.org/10.1039/c9ra01323g>
- Chol, C. G., Dhabhai, R., Dalai, A. K., & Reaney, M. (2018). Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses. *Fuel Processing Technology*, 178(May), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.05.023>
- Ciriminna, R., Pina, C. Della, Rossi, M., & Pagliaro, M. (2014). Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(10), 1432–1439. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400229>
- Datta, S., Lin, Y. J., & Snyder, S. W. (2014). 5 - Current and emerging separations technologies in biorefining**The Publishers wish to acknowledge that this chapter is reproduced with the permission of Argonne National Laboratory, operated by UChicago Argonne, LLC, for the US Department of Energy und (K. B. T.-A. in B. Waldron (ed.); pp. 112–151). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857097385.1.112>
- de Lima, C. J. B., Coelho, L. F., Da Silva, G. P., Alvarez, G. L. M., & Contiero, J. (2010). L(+) Lactic acid production by new *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2(3), 64–69. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000025>
- Deniz, I., Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2015). *Escherichia coli* KO11 suşundan biyoetanol üretimi için ölçek büyütme parametrelerinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(1), 74–80. <https://doi.org/10.5505/tjb.2015.33603>
- Diaz Ruiz, P. M., & Prada Palomo, Y. (2012a). Estudio Comparativo De Las Transformaciones

Del Glicerol Crudo Proveniente De La Industria Del Biodiesel En Ácido Láctico Por Una Cepa Nativa De *Lactobacillus* sp Y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Diaz Ruiz, P. M., & Prada Palomo, Y. (2012b). Estudio Comparativo De Las Transformaciones Del Glicerol Crudo Proveniente De La Industria Del Biodiesel En Ácido Láctico Por Una Cepa Nativa De *Lactobacillus* sp Y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Dobson, R., Gray, V., & Rumbold, K. (2012). Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 39, Issue 2, pp. 217–226). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1038-0>

Doran, P. (2013). Cap 8.1 Functions of Mixing. *Bioprocess Engineering Principles*, 255–332. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00008-3>

Doran, P. M. (2007). Fluid Flow and Mixing. In *Bioprocess Engineering Principles*. <https://doi.org/10.1016/b978-012220855-3/50007-9>

Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., & Wen, Z. (2011). Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.021>

Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2020). *Demanda nacional de Biodiesel 2019*.

Fernández, M., & Rendueles De La Vega, F. ; (n.d.). *Planta De Producción De Ácido Láctico Alimentario. Desarrollo De La Ingeniería Del Proceso Y Del Proyecto Industrial*. Retrieved

April 9, 2019, from
https://www.aepro.com/files/congresos/2003pamplona/ciip03_0772_0780.2183.pdf

Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00014-5)

Gábor, A., Villaverde, A. F., & Banga, J. R. (2017). Parameter identifiability analysis and visualization in large-scale kinetic models of biosystems. *BMC Systems Biology*, *11*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12918-017-0428-y>

Gamboa-Rueda, J. A., Lizcano-Gonzalez, V. A., Ordoñez-Supelano, M. A., Perez-Mendoza, J. A., Guzman-Luna, C., & López-Giraldo, L. J. (2015). Unstructured kinetic model of batch fermentation of usp glycerol for lactic acid production. *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*.

Gamboa, J., & 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*. Universidad Industrial de Santander.

Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., & Liu, Y. (2016). Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. *Bioresource Technology*, *218*, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.088>

Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 2, pp. 153–176).
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

Gelves, R., Benavides, A., & Quintero, J. C. (2013). Predicción del comportamiento hidrodinámico en el escalado de un reactor de tanque agitado para procesos aerobios, mediante CFD. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*. <https://doi.org/10.4067/s0718->

33052013000300005

- González-Figueroa, C., Alejandro Flores-Estrella, R., & A. Rojas-Rejón, O. (2019). Fermentation: Metabolism, Kinetic Models, and Bioprocessing. In *Current Topics in Biochemical Engineering*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82195>
- Hejna, A., Kirpluks, M., Kosmela, P., Cabulis, U., Haponiuk, J., & Piszczyk, Ł. (2017). The influence of crude glycerol and castor oil-based polyol on the structure and performance of rigid polyurethane-polyisocyanurate foams. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.023>
- Hernandez-Vargas, E. A., Wilk, E., Canini, L., Toapanta, F. R., Binder, S. C., Uvarovskii, A., Ross, T. M., Guzman, C. A., Perelson, A. S., & Meyer-Hermann, M. (2014). Effects of Aging on Influenza Virus Infection Dynamics. *Journal of Virology*, 88(8), 4123–4131. <https://doi.org/10.1128/jvi.03644-13>
- Hewitt, C. J., Caron, G. N. Von, Axelsson, B., McFarlane, C. M., & Nienow, A. W. (2000). Studies related to the scale-up of high-cell-density E. coli fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001120\)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001120)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0)
- Hiruta, O., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Kamisaka, Y., Yokochi, T., Nakahara, T., & Suzuki, O. (1996). Optimization and scale-up of γ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1, a high γ -linolenic acid producing mutant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 366–370. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89152-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89152-5)
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., & Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921.

<https://doi.org/10.1021/jf3008629>

Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2013). Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production.

Bioresource Technology, 144, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.118>

Indupalma. (2003). *Programa Estratégico Para La Producción De Biodiesel-Combustible*

Automotriz-A Partir De Aceites Vegetales Convenio Interinstitucional De Cooperación

Upme-Indupalma-Corpodib Unidad De Planeacion Minero Energetica-Upme-Corporacion

Para El Desarrollo Industr. www.corpodib.com

John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from

biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 74(3), 524–534. [https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6)

6

Kennedy, J. F., Jones, P., Barker, S. A., & Banks, G. T. (1982). Factors affecting microbial growth

and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures.

Enzyme and Microbial Technology, 4(1), 39–43. [https://doi.org/10.1016/0141-](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90009-6)

0229(82)90009-6

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., & Blackburn, J. W. (2010). Batch stage study of lipid production

from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal

fermentation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.087>

Liew, S. L. (2004). *Pilot-Scale Production of Lactobacillus Rhamnosus Atcc 7469*.

Liu, Y., Koh, C. M. J., & Ji, L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago*

maydis. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.115>

Lizcano-Gonzalez, Victor Alexis, Escalante Hernández, Humberto, Quintero Silva, M. J. (2017).

Efecto de las concentraciones de Nitrógeno y Oxígeno en la producción de

polihidroxitirato por Bacillus megaterium B2 a partir de glicerol (Universida).
Publicaciones UIS.

Margaritis, A., & Zajic, J. E. (1978). Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(7), 939–1001. <https://doi.org/10.1002/bit.260200702>

Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2010a). Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(9), 1184–1198. <https://doi.org/10.1002/jctb.2387>

Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2010b). Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(9), 1184–1198. <https://doi.org/10.1002/jctb.2387>

Mellow & Banana. (2016). *Importex - Glicerinas*.

Michael L Shuler; Fikret Kargı; Matthew DeLisa. (2017). *Bioprocess engineering : basic concepts* (Third edit). Boston : Prentice Hall. <https://www.worldcat.org/title/bioprocess-engineering-basic-concepts/oclc/981256254>

Montgomery, D. C. (2001). *Diseño y análisis de experimentos*.

Moreno, P. A. (2015). *Estudio de la producción de Polihidroxitirato (PHB) por bacillus sp. utilizando glicerol de la industria de la industria del biodiesel como fuente de carbono*. 3(2), 54–67.

Nanda, M., Yuan, Z., & Qin, W. (2014). Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and product characterization. *Austin Journal of ...*

Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Marzocchella Antonio, A., & Salatino, P. (2011). Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* - Assessment of acidogenesis kinetics.

Bioresource Technology. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.004>

Ngoc Ta, T. M., Cao-Hoang, L., Phan-Thi, H., Tran, H. D., Souffou, N., Gresti, J., Marechal, P. A., Cavin, J. F., & Waché, Y. (2010). New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2560-0>

Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 3, pp. 413–423). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>

Ormaz, J. (2010). *Aprovechamiento energético del glicerol como combustible de segunda generación*. 32–45.

Pal, P., & Chaurasia, S. P. (2016). Characterization of Crude and Purified Glycerol from Biodiesel Production and Purification Techniques. *Vth International Symposium on “Fusion of Science & Technology*, 393–397.

Pansuriya, R. C., & Singhal, R. S. (2011). Effects of dissolved oxygen and agitation on production of serratiopeptidase by *Serratia marcescens* NRRL B-23112 in stirred tank bioreactor and its kinetic modeling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1009.09031>

Petrov, K., & Stoyanov, A. (2012). Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0569-0>

Poblete-Castro, I., Binger, D., Oehlert, R., & Rohde, M. (2014). Comparison of mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol:

Citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. *BMC Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1186/s12896-014-0110-z>

Posada Duque, J. A., & Cardona Alzate, C. A. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiesel. *Ingeniería y Universidad*.

Prada-Palomo, Y., Romero-Vanegas, M., Díaz-Ruíz, P., Molina-Velasco, D., & Guzmán-Luna, C. (2012). Lactic Acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*.

Rana, H. (2015). Comparison of industrial agitation for simulated batch reactor vessel mixing in bioethanol fermentation. *Comsol*.

Samul, D., Leja, K., & Grajek, W. (2014). Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. In *Annals of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0767-x>

Santibáñez, C., Varnero, M. T., & Bustamante, M. (2011). Residual glycerol from biodiesel Manufacturing, waste or potential source of Bioenergy: A review. In *Chilean Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000300019>

Sarma, S. J., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Soccol, C. R. (2014). Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol - A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.042>

Sarma, S. J., Singh Dhillon, G., Kaur Brar, S., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Verma, M. (2013). Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. *Renewable Energy*, 60, 566–571.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.007>

- Song, Z., Sun, Y., Wei, B., & Xiu, Z. (2013). Two-step salting-out extraction of 1,3-propanediol and lactic acid from the fermentation broth of *Klebsiella pneumoniae* on biodiesel-derived crude glycerol. *Engineering in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200154>
- Sumitha, V., Christy Mathelin, R., & Sivanandham, M. (2018). Effect of major and minor nutrients on lactic acid production using biodiesel waste-derived crude glycerol as a carbon source by *Lactobacillus casei* NCIM 2125. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 40(11), 1322–1331. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1475519>
- Thompson, J. C., & He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*.
- Venkataramanan, K. P., Boatman, J. J., Kurniawan, Y., Taconi, K. A., Bothun, G. D., & Scholz, C. (2012). Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1325–1335. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3766-5>
- Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., & Theodoropoulos, C. (2011). Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.07.004>
- Xue, H., Miao, H., & Wu, H. (2010). Sieve estimation of constant and time-varying coefficients in nonlinear ordinary differential equation models by considering both numerical error and measurement error. *Annals of Statistics*, 38(4), 2351–2387. <https://doi.org/10.1214/09-AOS784>
- Yañez Díaz, C. J. (2013). *Extracción y caracterización de polihidroxitirato producido a partir de Bacillus megaterium ATCC 14581 utilizando glicerol residuo de la industria de biodiesel*

como fuente de carbono. Universidad Industrial de Santander.

Yang, F., Hanna, M. A., & Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>

Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2014). Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochemical Engineering Journal*, 91, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.07.015>

Young-Jung Wee, Hyang-Ok Kim, J.-S. Y. (2006). *Pilot-Scale Lactic Acid Production via Batch Culturing of Lactobacillus sp....: Universidad Industrial de Santander.* Food Technology & Biotechnology.