

ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN DEL GLICEROL CRUDO PARA LA
OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus*
ATCC 7469: PROPUESTA PRELIMINAR DE UN MODELO CINÉTICO

JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA

VICTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

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

JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA

VICTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de ingeniero
químico

Director

Ph.D. Luis Javier López Giraldo

Codirector(es)

Ph. D. Carolina Guzmán Luna

Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, esperanza y motivación en todo momento,

A mis padres Ana Dolores Rueda y German Gamboa Florez por
su invaluable entrega, paciencia y sacrificio,

A mi hermano y ángel de la guarda German Augusto Gamboa,

A mi hermano Sergio Armando Gamboa por sus continuas
palabras de aliento y confianza,

Al Doctor Luis Javier López, por su dirección y apoyo incondicional,

A la Dra. Carolina Guzmán Luna, quien con sus innumerables enseñanzas
reflejó su inmensa calidad humana y profesional,

Al señor Ing. Qco. Víctor Alexis Lizcano, por ser un verdadero amigo y un
excelente compañero

JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA

DEDICATORIA

A mis padres que son con sus palabras me impulsaron a este logro.

A mis hermanas que me recuerdan que las acciones en la vida son ejemplo para las futuras generaciones.

A mis amigos y compañeros con los que compartí tantos momentos, gracias por tantas enseñanzas.

A mi amigo y colega Jimy Alexander Gamboa por su apoyo en toda la carrera y en especial en esta tesis.

VÍCTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Luis Javier López Giraldo, por su apoyo y guía durante la realización del trabajo.

A la doctora Carolina Guzmán Luna, por sus consejos y por tantas veces que nos mostró la luz para seguir.

Al ingeniero químico y químico José Andrés Pérez Mendoza, por el trabajo y enseñanzas, sin ellas no hubiera sido posible el presente trabajo.

Al bacteriólogo Mario Ordóñez Supelano, que sin su colaboración este trabajo hubiera sido imposible.

A la química Nathalia Bedoya, por tantas veces que nos colaboró y sus innumerables enseñanzas.

A las técnicas Fanny Bohórquez y Claudia Colmenares por el tiempo dedicado y su apoyo en el laboratorio.

A la vicerrectoría de investigación y extensión por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	22
1.1 REACTIVOS	22
1.2 METODOS	23
1.2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO	23
1.2.2 ADAPTACIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO	24
1.2.3 CORRIDAS DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL USP	25
1.2.4 DESARROLLO DE UN MODELO CINÉTICO	25
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO	26
2.2 ADAPTACIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO	27
2.3 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES INICIALES EN LA FERMENTACIÓN DE GLICEROL USP (pH_0 y S_0)	30
2.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES INICIALES	32
2.3.2 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA FERMENTACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN MODELO NO ESTRUCTURADO, NO SEGREGADO	33
3. CONCLUSIONES	39
4. RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metabolismo del glicerol por parte de bacterias ácido-lácticas	19
Figura 2. Posibles vías de metabolización del piruvato por <i>Lactobacillus</i>	19
Figura 3. Producción de metabolitos por parte de las tres cepas a evaluar	26
Figura 4. Crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> antes y después de la adaptación en glicerol crudo (a.) y glicerol USP (b.)	28
Figura 5. Perfiles de biomasa vs tiempo para las corridas experimentales.	30
Figura 6. Perfiles de concentración de sustrato vs tiempo para las corridas experimentales	30
Figura 7. Perfiles de concentración de ácido láctico vs tiempo para las corridas experimentales.	30
Figura 8. Perfiles de pH vs tiempo para las corridas experimentales	30
Figura 9. Perfiles de porcentaje de conversión vs tiempo para las corridas experimentales	31
Figura 10. Perfiles de productividad volumétrica vs tiempo para las corridas experimentales	31
Figura 11. Diagrama de Pareto para la productividad volumétrica	32
Figura 12. Diagrama de efectos principales para la Productividad volumétrica	33
Figura 13. Velocidad específica de crecimiento vs concentración de glicerol para el ensayo R2B	34
Figura 14. Modelos ajustados para la velocidad de crecimiento	35
Figura 15. Perfiles de concentración de ácido láctico, glicerol y biomasa para el modelo cinético sin optimizar (A) y optimizado (B)	38

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Formulación medio de cultivo MRS	22
Tabla 2. Esquema propuesto para la adaptación de la cepa de trabajo	24
Tabla 3. Diseño experimental para la fermentación de glicerol USP	25
Tabla 4. Densidad óptica y concentraciones de sustrato inicial y final de las tres cepas en glicerol crudo	27
Tabla 5. Porcentajes de conversión en la fase de adaptación de la cepa <i>L. rhamnosus</i> en el medio MRS modificado	28
Tabla 6. Precios por kilogramo y rendimientos relativos (producto sustrato)	29
Tabla 7. Condiciones de operación que maximizan el valor de Q_v en el rango probado	33
Tabla 8. Parámetros estimados para las expresiones de velocidad específica de crecimiento	35
Tabla 9. Valores de los rendimientos teóricos y de las constantes de mantenimiento celular y de formación de producto para las seis condiciones iniciales	36
Tabla 10. Parámetros cinéticos optimizados del modelo 1 y porcentajes de error antes y después de optimizar	37

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Curva de calibración de peso seco	45
Anexo B. Identificación de las cepas nativas	47
Anexo C. Análisis de la presencia de la sustancia desconocida	50
Anexo D. Ecuaciones y parámetros finales del modelo cinético	53

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN DEL GLICEROL CRUDO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: PROPUESTA PRELIMINAR DE UN MODELO CINÉTICO¹

AUTORES: JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA²
VICTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ²

PALABRAS CLAVE: Glicerol crudo, procesos biotecnológicos, ácido láctico, *Lactobacillus*, ANOVA, modelo de crecimiento microbiano.

CONTENIDO:

La sobreproducción de glicerol crudo, debido al aumento en la cantidad de biodiesel fabricado en los últimos años, ha generado un interés en el uso de éste como materia prima de procesos biotecnológicos. Actualmente, existen trabajos e investigaciones cuya finalidad es obtener metabolitos como el 1,3 propanodiol, polihidroxicanoatos, ácidos orgánicos y solventes, siendo muy poco común entre ellos, la obtención de ácido láctico. El presente trabajo comparó el potencial de la cepa CYP4, (identificada posteriormente como un consorcio conformado por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus paracasei*) con el de una cepa de referencia (*L. rhamnosus*) para el consumo de glicerol crudo y producción de ácido láctico. Durante el desarrollo experimental no se evidenció asimilación de glicerol por parte de ninguna de las dos cepas nativas, trabajadas en cultivos axénicos, mientras que con *L. rhamnosus* se obtuvieron conversiones de glicerol crudo de hasta 94,5%. Para la cepa capaz de asimilar glicerol (*L. rhamnosus*) se evaluó la influencia del pH inicial (5,5 y 6,5) y la concentración inicial de glicerol USP (6, 8 y 10 g/L) sobre la productividad volumétrica. Los mejores resultados se obtuvieron a un pH de 6,5 y 6 g/L de glicerol con productividades de 0,0868885 (g)*(L*h)⁻¹. Finalmente, la cinética del proceso fue ajustada a un modelo no estructurado no segregado con un error absoluto relativo promedio de 12,24%.

¹Proyecto de grado

²Facultad de ingenierías físico-químicas. Escuela de ingeniería química

Director: Luis Javier López Giraldo

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF CRUDE GLYCEROL FERMENTATION FOR OBTAINING LACTIC ACID USING *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: PRELIMINARY PROPOSAL FOR A KINETIC MODEL

AUTHORS: JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA
VICTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ

KEYWORDS: Crude glycerol, biotechnological processes, lactic acid, *Lactobacillus*, ANOVA, microbial growth model.

In recent years, the rising biodiesel manufacture has result in overproduction of crude glycerol as by-product, which has been conventionally treated as industrial waste and generates a severe environmental impact. Currently, one of the ways to face this problem up is using glycerol as a raw material in biotechnological processes. In this regard, there are some studies that aims to achieve metabolites such as 1,3-propanediol, polyhydroxyalkanoates, organic acids and solvents, and also lactic acid. In the present work the potential of CYP4 strain (later identified as a consortium between *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus paracasei*), for crude glycerol consumption and lactic acid production, is compared to that of a reference strain (*L. rhamnosus*). During experimental development in axenic cultures assimilation of glycerol by either native strains was not observed, while, using *L. rhamnosus*, the crude glycerol conversion reached up to 94.5%. The influence of initial pH (5.5 and 6.5) and the initial concentration of glycerol USP (6, 8 and 10 g/L) on the volumetric productivity were evaluated for the *L. rhamnosus* strain. The best results were obtained for pH 6.5 and 6 g/L of glycerol, with productivities of $0.086885 \text{ (g)} \cdot \text{(L}\cdot\text{h)}^{-1}$. Finally, the kinetics of the process was fitted to a non-segregated unstructured model with relative absolute averaging error of 12.24%.

¹ Project degree

² Physical-chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School

Director: Luis Javier López Giraldo

1. INTRODUCCION

Las proyecciones desfavorables para una economía basada en fuentes de combustibles fósiles han impulsado la producción de biocombustibles, principalmente bioetanol y biodiesel, como una alternativa de energías renovables y sostenibles. Con un estimado de reservas de petróleo suficientes para suplir 54,2 años de consumo de crudo actual [6], se prevé un aumento considerable en el porcentaje de participación de los biocombustibles en el mercado global de la energía. Sin embargo, para que los combustibles provenientes de fuentes renovables alcancen un nivel de participación importante dentro de la economía global, se requiere de un desarrollo tecnológico orientado a la disminución de costos y optimización de los ciclos de producción, con el fin de suplir la demanda a precios competitivos.

A nivel mundial la producción de biocombustibles (bioetanol y biodiesel) creció un 0,7% de 2010 a 2011, con un aumento de 7,32% en la cantidad de biodiesel producido, mientras que se observó una disminución del 1,4% en el total de bioetanol obtenido [6]. La producción de biodiesel en 2011 alcanzó un total de 15'129.076 toneladas equivalentes de petróleo [6]. A nivel nacional, la producción de biodiesel en Colombia alcanzó las 443.037 toneladas métricas, lo cual representa un aumento del 31,19% con respecto al año 2010 [15].

En las diferentes variantes del proceso de producción de biodiesel se obtiene en promedio un 10% en peso de glicerina [11, 28], lo cual representa un aproximado de 49.226 toneladas de glicerol crudo producidas sólo en Colombia en el 2011. Ésta sobreproducción ha convertido al glicerol crudo en un residuo, lo cual le da un gran potencial para ser usado como materia prima en otros procesos debido a su bajo precio comercial. En este orden de ideas, se han propuesto diferentes tipos de procesos que usan este subproducto, por ejemplo: combustión, producción de biogás a partir de su digestión anaerobia [34], procesos de purificación de glicerina cruda [8, 11], además de procesos biotecnológicos en los cuales se da la bioconversión del glicerol crudo, con la obtención de metabolitos

como 1,3 propanodiol, ácido cítrico, etanol, butanol [11] y polihidroxicanoatos [3]. Sin embargo, de acuerdo con las investigaciones revisadas son poco comunes los casos en los que se obtiene ácido láctico como metabolito principal.

Dentro de los procesos biotecnológicos que usan glicerol como materia prima, la producción de ácido láctico se presenta como una opción innovadora y competitiva, dada la gran cantidad de aplicaciones que tiene este ácido orgánico dentro de la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y química [37, 20]. Además el bajo precio del glicerol comparado con el de la glucosa pura (sustrato normalmente empleado en la gran mayoría de procesos fermentativos productores de este ácido láctico) hace prever que el diseño de procesos biotecnológicos que involucren este tipo de sustrato sea de interés desde el punto de vista económico.

En relación con el proceso de bioconversión, los microorganismos productores por excelencia de ácido láctico son las bacterias acidolácticas (BAL), que se caracterizan por no formar esporas, ser bacterias gram-positivas, en ausencia de porfirinas son catalasa negativa, son tolerantes al oxígeno y a los ácidos, son organotróficas y principalmente con morfología cilíndrica o con forma de coco [23]. En general, las células son inmóviles y requieren compuestos complejos para el crecimiento como vitaminas y amino ácidos. Su producto principal es el ácido láctico el cual puede ser reasimilado [22].

Las BAL pueden ser tanto homofermentativas como heterofermentativas, produciendo en este último caso ácido láctico, CO₂ y en la mayoría de los casos etanol o acetato [22]. Actualmente se conocen diferentes géneros pertenecientes al grupo de bacterias acidolácticas, entre ellos los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. [23].

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* pueden presentar forma de coco o forma cilíndrica y permanecer tanto en solitario, como formar cadenas cuando son cultivadas en glucosa. Aunque en anaerobiosis pueden ser tanto

homofermentativas como heterofermentativas, en aerobiosis son únicamente heterofermentativas y en ambos casos pueden producir ya sea el isómero D, el L o la mezcla rasémica DL de ácido láctico [22, 23].

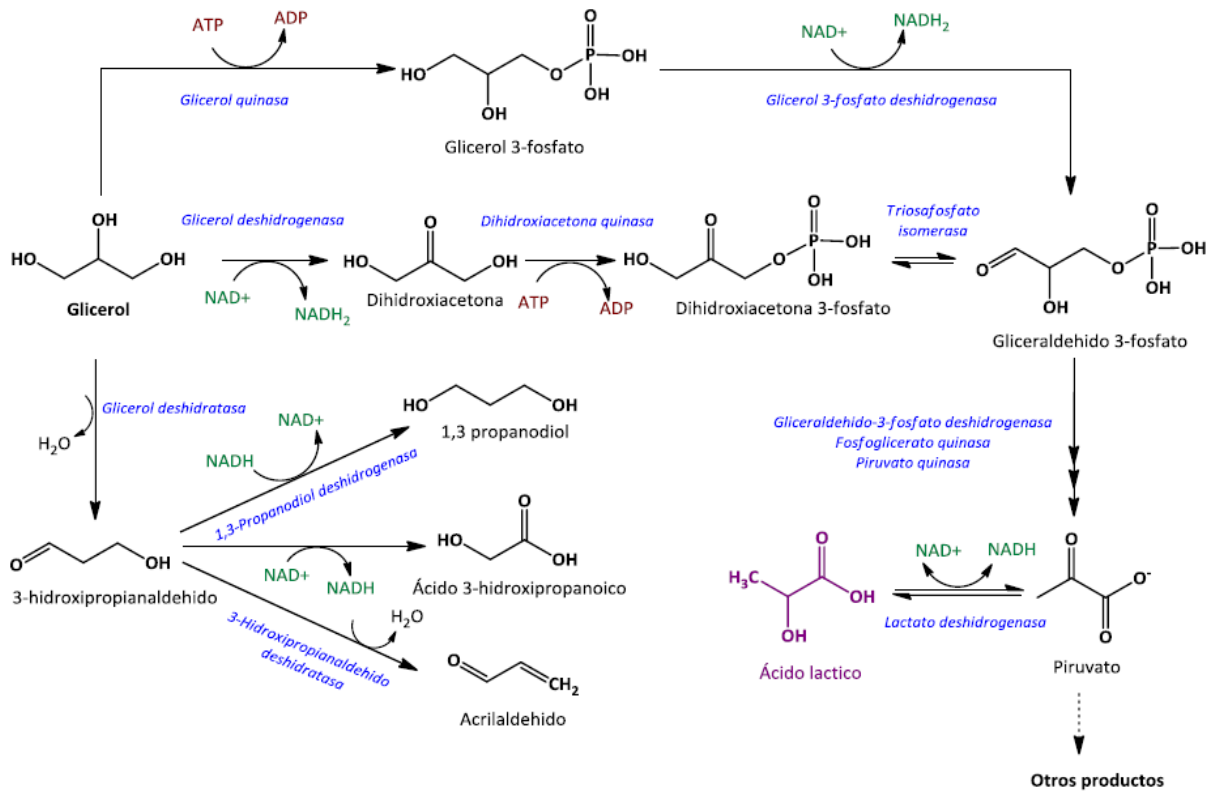
Una gran ventaja de las bacterias del genero *Lactobacillus* es su carácter estrictamente fermentativo, lo cual indica que su crecimiento está ligado directamente con la producción de metabolitos [19]. Es así que la fermentación del glicerol por parte de *Lactobacillus* puede darse por tres vías metabólicas diferentes: (1) vía de la glicerol quinasa, 2) vía de la glicerol deshidrogenasa y 3) vía de la glicerol deshidratasa [17] (Figura 1). Las dos primeras vías se caracterizan por converger en el gliceraldehído-3-fosfato, sustancia intermedia en la glucólisis. Por otra parte, la tercera vía tiene como productos finales: el 1,3-propanodiol, el ácido-3-hidroxi-propanoico y/o la acroleína. Aunque las tres vías pueden darse simultáneamente durante una fermentación, existen diferentes condiciones que pueden inhibir la presencia de una u otra.

La primera ruta requiere el uso de un aceptor externo de electrones que normalmente es el oxígeno, por esta razón en condiciones anaeróbicas se inhibe esta vía, mientras que la segunda ruta es la que ocurre principalmente. Por otra parte la tercera vía se ve favorecida en detrimento de las otras dos cuando dentro del medio de fermentación hay una mezcla de glucosa y glicerol como fuentes de carbono y preferiblemente una condición aeróbica [17, 30].

Entre las diferentes especies de *Lactobacillus* puede presentarse una variación en la forma en que el piruvato es metabolizado para producir distintos productos, pues de manera general este metabolito clave es el que permite una regulación del potencial de óxido-reducción, a partir de la oxidación del NADH para regenerar el NAD⁺, que es un componente indispensable en el crecimiento y el metabolismo del microorganismo [19].

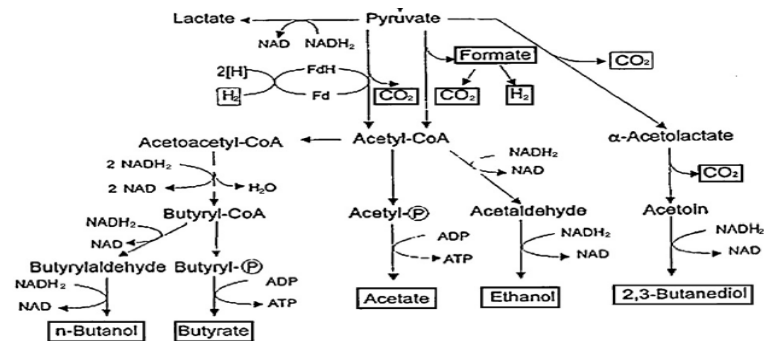
Así pues los *Lactobacillus* tienen un amplio abanico de posibilidades en lo que a metabolitos finales producidos a partir de piruvato se refiere, esto se puede observar en la Figura 2.

Figura 1. Metabolismo del glicerol por parte de bacterias ácido-lácticas



Fuente: (Palomo, Díaz, 2012) [10]

Figura 2. Posibles vías de metabolización del piruvato por *Lactobacillus*



Fuente: Fonseca *et al.*[16]. Modificado por los autores

La comprensión de cómo funciona un sistema fermentativo desde el punto de vista global de un bioproceso, requiere del planteamiento de modelos cinéticos microbianos que tengan la capacidad de describir y predecir las concentraciones de productos, biomasa y sustrato a lo largo del proceso.

Estos modelos pueden clasificarse en diferentes categorías, dependiendo de si se consideran el segregamiento de las células y el funcionamiento estructural de las mismas. El segregamiento de las células se refiere a un comportamiento individual y diferenciado, mientras que el funcionamiento estructural contempla dentro del modelo los mecanismos metabólicos, enzimáticos y genómicos internos de la célula. Según esto, se pueden encontrar tres tipos de modelos: 1. modelos segregados y estructurados, 2. modelos no segregados y estructurados y 3. modelos no estructurados y no segregados [32].

Aunque los modelos estructurados y segregados pueden generar un buen ajuste, en realidad tienen un costo computacional y experimental considerablemente alto. Por otro lado, los modelos del tipo no estructurado y no segregado son una opción de amplio uso para describir diferentes tipos de sistemas fermentativos con un alto grado de ajuste a partir de poca información [1, 2, 26, 32, 36].

Sin embargo, la aplicación de un modelo no estructurado y no segregado puede darse sólo si dentro de las células se da un crecimiento balanceado [31], esto quiere decir que todos los componentes internos de la célula (proteínas, ADN, lípidos, etc.) crecen a una velocidad constante (*i.e.* fase de crecimiento exponencial).

En un cultivo discontinuo las velocidades de producción de los metabolitos y la biomasa, así como el consumo del sustrato para un modelo no estructurado y no segregado, pueden ser representados mediante las siguientes ecuaciones diferenciales.

**Ecuación 1 a 3. Velocidades de producción de producto (P) y biomasa (x) y
Velocidad de consumo de sustrato (S)**

$$(1) \frac{dx}{dt} = \mu * x$$

$$(2) \frac{dS}{dt} = -q_s * x$$

$$(3) \frac{dP}{dt} = q_p * x$$

$$q_s = \left(\frac{\mu}{y_{x/S}} + \frac{q_p}{y_{P/x}} + m_s \right) \quad q_p = \mu * y_{P/x} + m_p$$

Donde $y_{P/x}$ y $y_{x/S}$ son los rendimientos teóricos producto-biomasa y biomasa-sustrato respectivamente, ambos en unidades de (masa/masa). Los parámetros m_p y m_s son las constantes de mantenimiento celular y la constante específica de formación de producto debido a la actividad celular, respectivamente. Finalmente, μ es la velocidad específica de crecimiento (tiempo^{-1}), que puede ajustarse a diferentes funciones, dependiendo del comportamiento del microorganismo. Dentro de las formas más comunes de μ se encuentran las descritas por Monod, Tessier y Haldane [12, 31].

De los párrafos anteriores se infiere que una propuesta de diseño de un bioproceso para la producción de ácido láctico a partir de glicerol requiere al menos la selección del microorganismo, determinación de condiciones favorables para que la fermentación tenga lugar y ajuste de la cinética del proceso.

Partiendo de datos obtenidos previamente [10], en este proyecto se plantea evaluar la capacidad de una cepa nativa (*Lactobacillus* CYP4) y una cepa de referencia (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469) para metabolizar glicerol y producir ácido láctico. Seguidamente, se evalúa la influencia del pH y la concentración inicial de sustrato sobre la capacidad del microorganismo a metabolizar el glicerol y producir ácido láctico. Finalmente, se propondrá y ajustará un modelo cinético que explique el comportamiento dinámico de la fermentación.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

1.1 REACTIVOS

Para el desarrollo de la presente investigación, se requiere del uso de ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, acetona, butanol, etanol y glucosa, todos ellos en grado reactivo, además de ácido ortofosfórico, hidróxido de sodio, glicerol USP y glicerol crudo. Este último se tomó de una empresa colombiana, productora de biocombustibles.

MEDIO DE CULTIVO

Con el fin de garantizar el suministro de macronutrientes, micronutrientes y factores de crecimiento a los distintos tipos de BAL cultivadas en laboratorio, se han propuesto diferentes medios de cultivos [4, 5, 9, 13, 14, 29, 33]. La escogencia entre uno y otro, depende del microorganismo a cultivar y de si se va a realizar un aislamiento o un mantenimiento.

Se escoge el medio MRS [9] debido a su amplio uso y ya que fue desarrollado con el propósito de cultivar *Lactobacillus* en productos derivados de la leche [25]. Su fórmula se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación medio de cultivo MRS

Sustancia	Sólido [g/L]	Líquido [g/L]
di-amonio hidrógeno citrato	2	2
Extracto de carne	8	8
Extracto de levadura	4	4
Glucosa	20	20
Magnesio Sulfato (7)	0,2	0,2
Manganeso II Sulfato (1)	0,05	0,05
Peptona bacteriológica	10	10
di-Potasio Hidrógeno fosfato (3)	2	2
Acetato de sodio (3)	5	5
Tween 80	1	1
Agar	10	0

Fuente: Cultimed 2012 [25]

En condiciones de anaerobiosis estricta, se utiliza L-cisteína (0,5 g/L) y NaHCO₃ (2 g/L) como reductores de O₂, además de resazurina (0,001 g/L) la cual actúa como indicador de anaerobiosis, tornándose de color rojo en presencia de oxígeno.

Cuantificación de biomasa, sustrato y metabolitos

La determinación de la concentración de metabolitos y sustrato se realiza mediante análisis de HPLC empleando una columna Coregel 107H acoplada a un equipo UFLC LC 20AD (Shimadzu), seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. El equipo opera en modo isocrático, a una temperatura de 80 °C, con flujo de 0,6 mL/min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8 mM. El tiempo de cada análisis es de 25 minutos.

La cuantificación de la biomasa se realiza empleando la relación lineal existente entre el peso seco y la densidad óptica (D.O.) medida a 540 nm en un espectrofotómetro GENESYS 20 (ThermoSpectronic) (Ver anexo A). Para la determinación del peso seco se procede como sigue: la muestra se centrifuga a 6000 rpm por 15 minutos en una centrifuga MLW T23 (Janetski); finalmente el precipitado se seca a 60 °C hasta peso constante.

1.2 MÉTODOS

1.2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO

El criterio de selección escogido es la capacidad de los microorganismos sujetos de estudio a asimilar glicerol. No obstante, para la cepa nativa se inicia con una identificación taxonómica de la misma.

El perfil fermentativo o bioquímico de la cepa nativa [10] se determina empleando el kit de identificación API 50 CHL V5.1 (Biomerieux). Para garantizar el carácter axénico de los cultivos, una vez identificada la bacteria, se realizan tinciones de Gram periódicas y control catalasa empleando peróxido de hidrógeno.

Para evaluar la asimilación de glicerol por parte de las cepas a trabajar (*Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469), se realizan cultivos microbianos en medio MRS líquido modificado, en donde se sustituye la glucosa por glicerol crudo y USP a una concentración de 20 g/L. Posteriormente, se realiza la fermentación en un volumen de 25 ml. Se garantiza anaerobiosis estricta para la cepa nativa empleando una atmósfera de nitrógeno. Todas las fermentaciones se realizan con una agitación orbital de 200rpm, a una temperatura de 37°C en un equipo Excella E24. Incubator Shaker Series (New Brunswick Scientific).

Cada una de las fermentaciones inicia con la preparación del inóculo a partir de cultivo en caja de Petri con glucosa como fuente de carbono. Se inoculan en 22,5 ml de MRS líquido modificado, 2,5 ml de resuspensión de colonias en solución peptonada (0,1% p/v) con una densidad óptica de 0,2 (medida a 540 nm). Bajo estas condiciones la concentración inicial fue del orden de 10⁶ UFC/ml. El tiempo de fermentación es de 24 horas. Para la cuantificación de metabolitos, las muestras son filtradas usando membranas PVDF de 0,45 µm. Cada ensayo se realiza por duplicado. En esta etapa es escogida la cepa que presente mayor capacidad de asimilación al glicerol (*i.e.* mejor crecimiento y mayor conversión).

1.2.2 ADAPTACIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO

En procura de mejorar la asimilación del glicerol por parte de la cepa escogida, se propone una serie de repiques consecutivos, con un aumento gradual de la concentración de sustrato, ver Tabla 2.

Tabla 2. Esquema propuesto para la adaptación de la cepa de trabajo.

	Concentración 4 g/L					Concentración 8 g/L					Concentración 16 g/L				
Repique	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Glicerol USP	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
Glicerol crudo	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S

S: sólido; L: Líquido

Fuente: Autores

De los cultivos en líquido se toman muestras y se cuantifica el consumo de sustrato a las 24 horas de fermentación.

1.2.3 CORRIDAS DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL USP

Partiendo de colonias de la cepa de trabajo adaptadas, se llevan a cabo fermentaciones a 25 ml con un porcentaje de inóculo de 10% v/v, siguiendo el diseño experimental que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental para la fermentación de glicerol USP.

		Concentración de Glicerol USP g/L		
		6 (1)	8 (2)	10 (3)
pH	5,5 (A)	R1A	R2A	R3A
	6,5 (B)	R1B	R2B	R3B

Fuente: Autores

Los códigos mostrados en la tabla corresponden a. R (cepa de trabajo); A ($pH_0=5,5$); B ($pH_0=6,5$); 1 ($S_0=6$ g/L); 2 ($S_0=8$ g/L); 3 ($S_0=10$ g/L).

En todos los casos los ensayos se realizan por triplicado y son destructivos. Los muestreos se realizan a 0, 5, 9, 11, 13 y 15 horas de fermentación. Para cada una de las corridas de fermentación se cuantifican metabolitos, biomasa y se realiza un seguimiento del pH.

Finalmente, la influencia de los factores pH_0 y S_0 sobre la productividad volumétrica, se estudian mediante la aplicación de un análisis ANOVA empleando el software STATGRAPHICS Centurion XV (versión de prueba).

1.2.4 DESARROLLO DEL MODELO CINÉTICO

En esta etapa se analizan los perfiles de biomasa, sustrato y producto con miras a proponer un modelo que describa el proceso fermentativo. Inicialmente, se analizan 12 modelos de crecimiento celular. Seguidamente se ajustan los parámetros $Y_{x/s}$, m_s , $Y_{x/p}$ y m_p mediante linealización de las ecuaciones 2 y 3.

Luego, el modelo ajustado se integra empleando la herramienta ODE45 del software MATLAB (MathWorks) versión 7.12.0. Además, los parámetros $Y_{x/s}$, k_s y μ_m , se optimizan empleando la función `fmincon`, operando un algoritmo de punto

interior, acoplado a un integrador. Finalmente, se evalúa la validez de cada modelo empleando la desviación absoluta relativa promedio.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

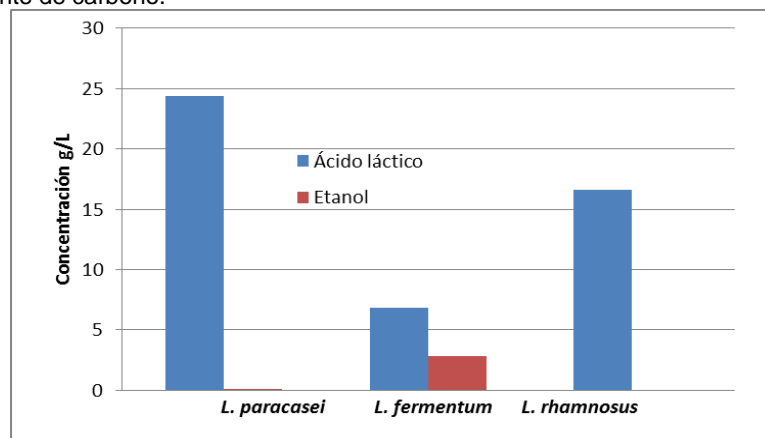
2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO

En el momento de usar la cepa nativa se evidenció la presencia de dos tipos de morfología (grande y pequeña).

Con la aplicación del kit enzimático API 50 CHL V5.1, se identificó que las cepas correspondientes a los diferentes tipos de colonia (grande y pequeña) pertenecen a la especies: *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus paracasei*, respectivamente. Estos resultados, con un intervalo de confianza superior o igual al 99%, fueron obtenidos usando la plataforma virtual APIweb (ver anexo B).

Posteriormente, se realizó un cultivo durante 24 horas en glucosa para las tres cepas. En el caso de *L. fermentum* y *L. paracasei* se garantizó una atmósfera anaeróbica; mientras que para *L. rhamnosus* ATCC 7469 se empleó una atmósfera aeróbica (mejores condiciones para estas cepas, según el trabajo de Diaz y Prada, 2012 [10]). En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos.

Figura 3. Producción de metabolitos por parte de las tres cepas a evaluar
Concentración g/L de los metabolitos después de 24 horas de fermentación, empleando glucosa como fuente de carbono.



Fuente: Autores

Se corroboró de esta manera el carácter homofermentativo reportado por la literatura para *L. paracasei* [24] y para *L. rhamnosus* [2, 18] así como la característica heterofermentativa para *L. fermentum* [21, 35].

La siguiente etapa fue evaluar el crecimiento microbiano en glicerol crudo como fuente de carbono. Los resultados de estas corridas se resumen en la Tabla 4. El crecimiento del microorganismo fue seguido de forma indirecta (D.O.), mientras que las mediciones de sustrato inicial (S_0) y final (S_f) se realizaron por HPLC.

Tabla 4. Densidad óptica y concentraciones de sustrato inicial (S_0) y final (S_f) de las tres cepas en glicerol crudo

Cepa	Medio MRS sin fuente de carbono	Medio MRS con glicerol crudo como fuente de carbono		
	D.O	D.O	S_0 (g/L)	S_f (g/L)
<i>L. paracasei</i>	0,546	0,473	20	20
<i>L. fermentum</i>	0,505	0,074	4	3,74
<i>L. rhamnosus</i>	0,631	1,398	4	1,82

Fuente: Autores

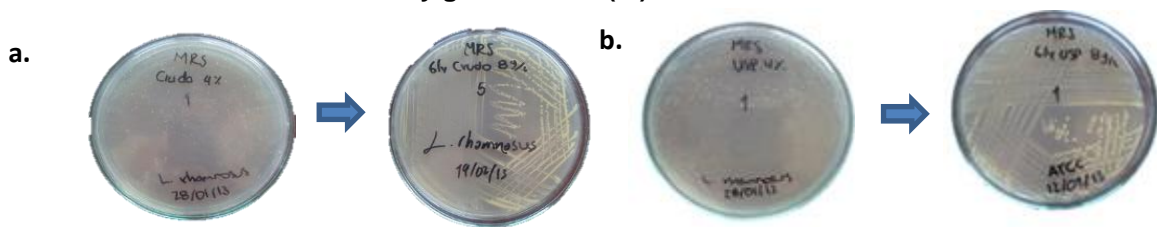
En la Tabla 4 se evidencia que en ausencia de la fuente de carbono mayoritaria (glicerol), las cepas de *Lactobacillus* analizadas utilizan los demás compuestos del medio de cultivo para su mantenimiento. Por otra parte, los datos consignados en esta tabla muestran que el crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus paracasei* son inhibidos cuando se emplea glicerol como fuente de carbono en un medio MRS. La cepa de referencia (*L rhamnosus*) asimiló satisfactoriamente la nueva fuente de carbono (glicerol).

2.2 ADAPTACIÓN DE LA CEPA DE TRABAJO

De los resultados anteriores se infiere que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 es la cepa con mayor potencial para continuar con el trabajo en glicerol crudo. Por tanto, se sigue el modelo de adaptación propuesta en la Tabla 2, que permita una mayor asimilación del glicerol, así como un mayor crecimiento.

En la Figura 4, se puede observar un aumento en el tamaño y número de las colonias, lo cual indica una adaptación favorable a la nueva fuente de carbono por parte de la cepa.

Figura 4. Crecimiento de *L. rhamnosus* antes y después de la adaptación en glicerol crudo (a.) y glicerol USP (b.)



Fuente: Autores

Además, en la Tabla 5 se muestran los valores de conversión de glicerol (Ecuación 4) alcanzados en la fase de adaptación por la cepa.

$$\% X_{sustrato} = \frac{S_0 - S_f}{S_0} * 100\% \quad \text{Ecuación 4}$$

Tabla 5. Porcentajes de conversión en la fase de adaptación de la cepa *L. rhamnosus* en el medio MRS modificado

	Concentración 4 g/L	Concentración 8 g/L	Concentración 16 g/L
No. de Repiques	2	3	2
G USP % conversión	69,85 ± (6,58)	63,94 ± (6,97)	21,99 ± (0,37)
G. Crudo % conversión	55,13 ± (0,78)	90,51 ± (6,57)	17 ± (0,47)

Los valores entre paréntesis representan los valores de las desviaciones estándar promedio

Fuente: autores

A partir de los resultados consignados en la Tabla 5 se aprecia que sólo existe un aumento significativo de la conversión cuando se modifica la concentración de glicerol crudo de 4 a 8 g/L. Igualmente, es importante subrayar que para el caso de glicerol crudo, el microorganismo *L. rhamnosus* alcanzó porcentajes de conversión cercanos al ciento por ciento (90,51 ± 6,57). Finalmente, para ambos tipos de glicerol se evidencia una inhibición por sustrato cuando se aumenta su concentración de 8 a 16 g/L. En principio, de los resultados obtenidos se podría inferir que sin importar el tipo de glicerol, la cepa *L. rhamnosus* posee un gran potencial de emplear este último para la producción de ácido láctico. Con el fin de evaluar este resultado, se presenta a continuación una comparación económica preliminar entre un proceso que utiliza glucosa y uno que pudiera ser

implementado usando glicerol crudo como único sustrato. El factor de comparación escogido fue la relación precio de venta de ácido láctico/costo de materia prima (ver ecuación 5). Para realizar este análisis, se planteó un escenario hipotético en el cual ambas plantas de producción de ácido láctico cuentan con la misma capacidad de producción instalada y además los costos totales de producción son iguales (fijos y variables).

$$R_{P/S} = \frac{\text{Precio venta ácido láctico}}{\text{Precio compra sustrato}} * y_{p/s} \quad \text{Ecuación 5}$$

Los valores ($R_{P/S}$) correspondientes a las dos plantas se reportan en la Tabla 6, junto con los precios y rendimientos usados para calcularlos. Para los dos casos se tomó el precio de venta del ácido láctico como 2847 (COP/kg), reportado por Posada, 2011 [27].

Tabla 6. Precios por kilogramo y rendimientos relativos (producto sustrato)

Sustancia	Precio (COP/kg)	Rendimiento $y_{p/s}$ (kg P/kg S)	$R_{P/S}$
Glicerol crudo	80,95 ^(a)	0,27 ^(b)	9,49
Glucosa pura	880,80 ^(c)	0,86 ^(d)	2,77

(a) y (c) Tomado de Posada, 2011[28] (b) Fuente: autores;(d) Tomado de Gonçalves *et al.* 1997 [18]

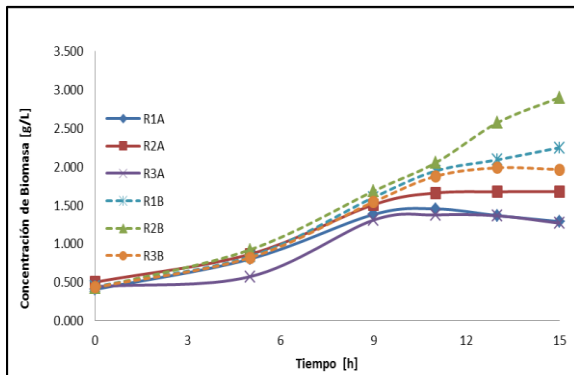
Fuente: Autores

Para ambos sustratos, la relación $R_{P/S}$ fue superior a 1 y en consecuencia tienen potencial de ser implementadas. No obstante la relación $R_{P/S}$ para el caso de glicerol crudo supera, por un factor mayor a 3, a la obtenida utilizando glucosa como fuente de carbono. Además, el valor obtenido de $R_{P/S}$ para el caso del glicerol permite prever un mayor margen de utilidad cuando se utiliza glicerol crudo como fuente de carbono. No obstante, este resultado deberá ser confirmado mediante el diseño y análisis del proceso completo para lo cual se deberá tener presente, entre otros: la cinética de reacción, las necesidades energéticas, los tiempos asociados a labor, las unidades de separación y purificación de producto, etc.

2.3 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES INICIALES EN LA FERMENTACIÓN DE GLICEROL USP (pH₀ Y S₀)

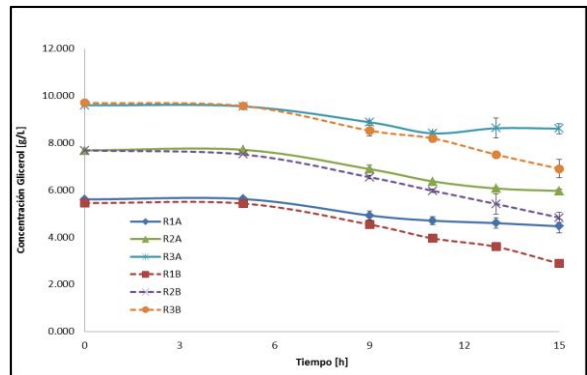
En las figuras 5 a 8, se muestran los perfiles de concentración de sustrato (S), pH, el crecimiento de biomasa (x) y la concentración de producto para las diferentes condiciones iniciales (Tabla 3).

Figura 5. Perfiles de biomasa vs tiempo para las corridas experimentales.



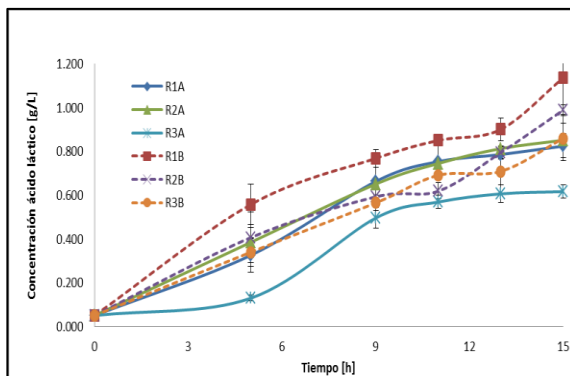
Fuente: Autores

Figura 6. Perfiles de concentración de sustrato vs tiempo para las corridas



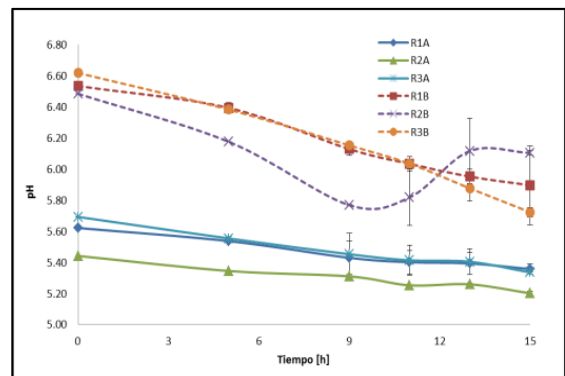
Fuente: Autores

Figura 7. Perfiles de Concentración de ácido láctico vs tiempo para las corridas



Fuente: Autores

Figura 8. Perfiles de pH vs tiempo para las corridas experimentales.



Fuente: Autores

La Figura 5 muestra un comportamiento típico del crecimiento de una cepa microbiana. En dicha figura se pueden diferenciar dos modelos de crecimiento. El primero a un pH₀ de 5,5 (R1A, R2A, R3A), se caracteriza por tener una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 4 horas. El segundo a pH₀ de 6,5(R1B, R2B, R3B), presenta una fase exponencial de hasta 10 horas.

Consecuencia de un mayor tiempo de la fase de crecimiento exponencial se observó un consumo de sustrato pronunciado (ver Figura 6). Además para el segundo modelo de crecimiento se observó una mayor producción de ácido láctico [19] (Figura 7) y en consecuencia un descenso más marcado en el pH (ver Figura 8).

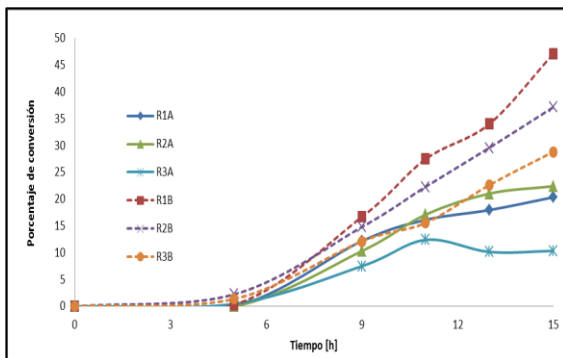
Otra característica importante a resaltar es que a pesar de que no existe consumo de sustrato durante las primeras cinco horas de fermentación, sí hay producción de ácido láctico, lo que indica que el microorganismo es capaz de sintetizar este metabolito a partir del medio nutritivo (ver figuras 6 y 7)

Cabe anotar que no se detectó formación de ácido acético, pero si se notó el aumento considerable de uno de los picos de los cromatogramas, lo que conllevó a plantear la hipótesis de la formación de otro metabolito cuya plena identificación no se logró (para mayor ilustración ver anexo C). Con el fin de evaluar el desempeño del proceso, se analizan tanto las conversiones como las productividades volumétricas alcanzadas. La productividad volumétrica fue calculada empleando la ecuación 4.

$$Q_v = \frac{\text{masa de producto}}{\text{volumen de trabajo} \cdot \text{tiempo de fermentación}} \quad \text{Ecuación 6}$$

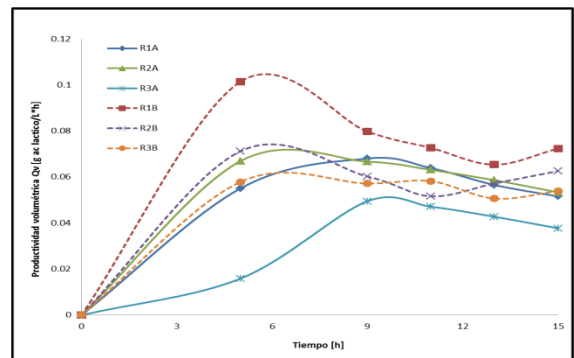
En las figuras 9 y 10 se presentan las tendencias para la conversión de sustrato, así como para la productividad volumétrica.

Figura 9. Perfiles de porcentaje de conversión vs tiempo para las corridas



Fuente: Autores

Figura 10. Perfiles de productividad volumétrica vs tiempo para las corridas

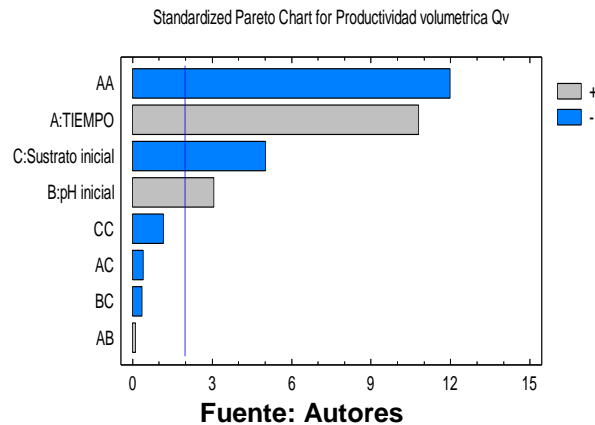


Fuente: Autores

2.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES INICIALES

La Figura 11 muestra el diagrama de Pareto obtenido para la variable de respuesta: productividad volumétrica.

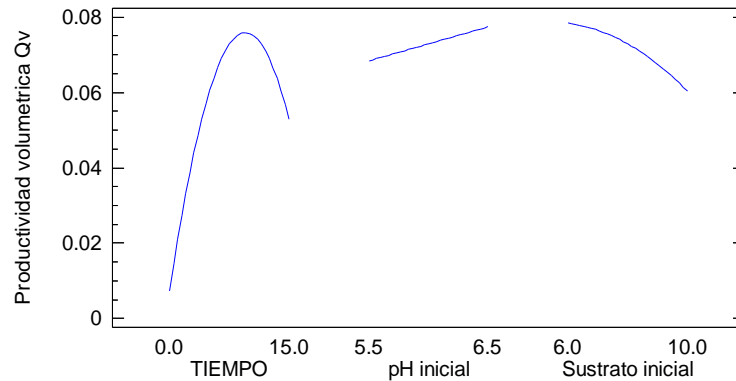
Figura 11. Diagrama de Pareto para la productividad volumétrica



En el diagrama de Pareto se presentan los resultados condensados del análisis ANOVA. En el eje x se encuentran los valores del estadístico t para cada uno de los factores, lo cual permite visualizar si hay o no hay efecto de los factores o sus interacciones, sobre la variable de respuesta. Un valor de t mayor a 2 para un regresor, indica que este tiene efecto sobre la variable de respuesta.

En el diagrama de Pareto para la productividad volumétrica (Figura 11) se observa que la interacción tiempo-tiempo tiene un mayor efecto que el factor tiempo. Esto indica una alta no linealidad, con presencia de un punto de inflexión (ver Figura 12). De igual forma, de la Figura 11 se puede inferir que el pH inicial tiene un efecto proporcional sobre la productividad volumétrica. Por el contrario, la relación de la productividad volumétrica con la concentración inicial de sustrato es inversamente proporcional.

Figura 12. Diagrama de efectos principales para la productividad volumétrica



Fuente: Autores

Todo lo anterior indica que la condición más favorable para maximizar la productividad volumétrica está dada para valores iniciales de pH alto, concentraciones de glicerol bajas y un tiempo intermedio. Esta afirmación fue confirmada usando la herramienta multiple response optimization de Stathgraphics (ver Tabla 7)

Tabla 7. Condiciones de operación que maximizan el valor de Qv en el rango probado

<i>Factor</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Optimum</i>
TIEMPO	0.0	15.0	9.60068
pH inicial	5.5	6.5	6.5
Sustrato inicial	6.0	10.0	6.00016

<i>Response</i>	<i>Optimum</i>
Productividad volumetrica Qv	0.0868885

Fuente: Autores

2.3.2. AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS A UN MODELO NO ESTRUCTURADO, NO SEGREGADO

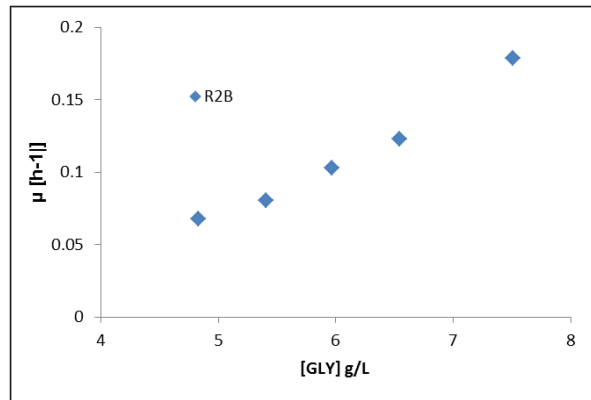
Para analizar la cinética, en primera instancia se debe determinar el tipo de función que relaciona la velocidad específica de crecimiento (μ) con la concentración de sustrato ([GLY]). Este procedimiento se desarrolló para las seis condiciones iniciales. La Figura 12 muestra la relación entre μ y [GLY] para la fase

exponencial de crecimiento en el ensayo R2B. La velocidad específica de crecimiento fue calculada para cada punto según la ecuación 5.

Ecuación 7. Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

Figura 13. Velocidad específica de crecimiento vs concentración de glicerol para el ensayo R2B



Fuente: Autores

Esta tendencia fue común para todos los ensayos y podría ser descrita por modelos de crecimiento del tipo Tessier, de inhibición por sustrato y de inhibición por producto y sustrato.

Las ecuaciones 6 (Modelo 1) y 7 (Modelo 2) representan las dos funciones que mejor ajustaron los datos experimentales (Ver Figura 13).

Ecuación 6
$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{ks^2}{s^2}} * \exp\left(-\frac{p^2}{kp^2}\right)$$

Ecuación 7
$$\mu = -\mu_m * A + \mu_m * \exp(K^2 * s^2)$$

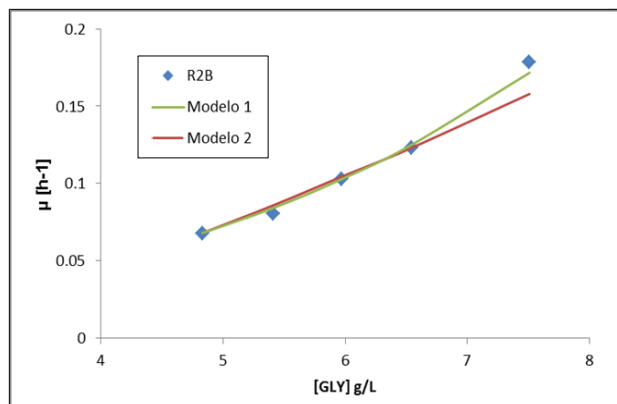
μ_m : Velocidad específica de crecimiento máxima $\left[\frac{1}{h}\right]$

ks : Parámetro cinético $\left[\frac{g}{L}\right]$

kp : Constante de inhibición por producto $\left[\frac{g}{L}\right]$; K : Parámetro cinético $\left[\frac{L}{g}\right]$

A : Parámetro cinético (adimensional)

Figura 14. Modelos ajustados para la velocidad de crecimiento



Fuente: Autores

La Tabla 8 resume el valor de los parámetros calculados y el error de ajuste para todas las condiciones iniciales.

El error de ajuste se calculó mediante la ecuación 8.

Ecuación 8 Expresión para el cálculo del porcentaje de error.

$$Error = \sum_{i=1}^n \left| \frac{Experimental - Teórico}{Experimental} \right| * \frac{100}{n}$$

n: número de puntos que están dentro de la fase de crecimiento exponencial

Tabla 8. Parámetros estimados para las expresiones de velocidad específica de crecimiento

Código	Modelo 1				Modelo 2				
	μ_m	k_s	k_p	% Error	μ_m	K	A	% Error	
R1A	0,6839	5,0679	0,484	2,8E-6	0,3755	0,1723	1,9188	3,4E-4	
R1B	0,9809	2,35	0,5362	0,7905	0,4696	0,1129	1,0918	9,8932	
R2A	0,9133	5,5129	0,4117	3,9887	0,2171	0,1113	1,5621	18,2032	
R2B	0,9838	17,0504	3,6427	4,0062	0,2246	0,0975	0,9462	2,0721	
R3A	0,6531	5,6328	0,2621	5,91E-4	0,2605	0,1422	4,8695	4,41E-4	
R3B	0,9473	10,8159	0,4663	13,55	0,2094	0,102	1,6862	19,1172	
Error Promedio				1,69	Error Promedio				8,2141

Fuente: Autores

De los resultados del ajuste se pueden apreciar las siguientes tendencias. Para el modelo 1, en todos los casos la velocidad específica de crecimiento máximo (μ_m) fue mayor, cuando el $\text{pH}_0=6,5$. Esta tendencia concuerda con los resultados reportados en la Figura 5.

Para el modelo 2 desafortunadamente no se puede hacer un análisis desde el punto de vista físico de los parámetros que componen el modelo. Además el error absoluto promedio fue mayor al del modelo 1 y en consecuencia este modelo se descarta.

Ahora, con el modelo 1, se plantea el sistema de ecuaciones diferenciales que describen la variación de la biomasa, el sustrato y el producto (Ecuaciones 9 – 11)

Ecuaciones 9-11 Sistema de ecuaciones diferenciales para la variación de sustancias presentes en la fermentación

$$9. \frac{dx}{dt} = \mu * x \quad 10. \frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\mu}{y_{x/s}} + m_s \right) * x \quad 11. \frac{dP}{dt} = (\mu * y_{P/x} + m_p) * x$$

Se eliminó el término $q_p/y_{P/x}$ de la ecuación 10, ya que éste hace referencia al sustrato consumido en la producción de metabolitos secundarios, lo cual no es el caso del ácido láctico. Los valores ajustados de los parámetros $y_{x/s}$, m_s , $y_{P/x}$ y m_p se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de los rendimientos teóricos y de las constantes de mantenimiento celular y de formación de producto para las seis condiciones iniciales

Código	Parámetro			
	$y_{x/s}$ [g/g]	m_s [g/g]	$y_{P/x}$ [g/g]	m_p [g/g]
R1A	0,6788	0,0062	0,5224	0,0117
R1B	1,4043	0,0972	0,2323	0,0131
R2A	0,2571	0,0201	0,3538	0,0098
R2B	1,4407	0,029	0,2618	0,0018
R3A	0,1662	0,0316	0,2149	0,0424
R3B	3,073	0,1422	0,2202	0,0163

Fuente: Autores

Se observa una relación directamente proporcional entre los rendimientos biomasa-sustrato y la concentración inicial de glicerol. Dicha relación es inversamente proporcional en casi todos los casos para el rendimiento producto-biomasa. Los valores de los rendimientos teóricos $y_{x/s}$ mayores a uno, pueden atribuirse a que este análisis no separa la biomasa formada a partir del glicerol, de la biomasa que se forma a partir del medio de cultivo.

Una vez ajustados los parámetros, se procedió a integrar las ecuaciones diferenciales (9-11), empleando el modelo 1 de crecimiento microbiano (ver Tabla 8). Se propuso también una optimización de los valores de μ_m , ks y $y_{x/s}$, para disminuir el error del modelo propuesto con respecto a los valores experimentales.

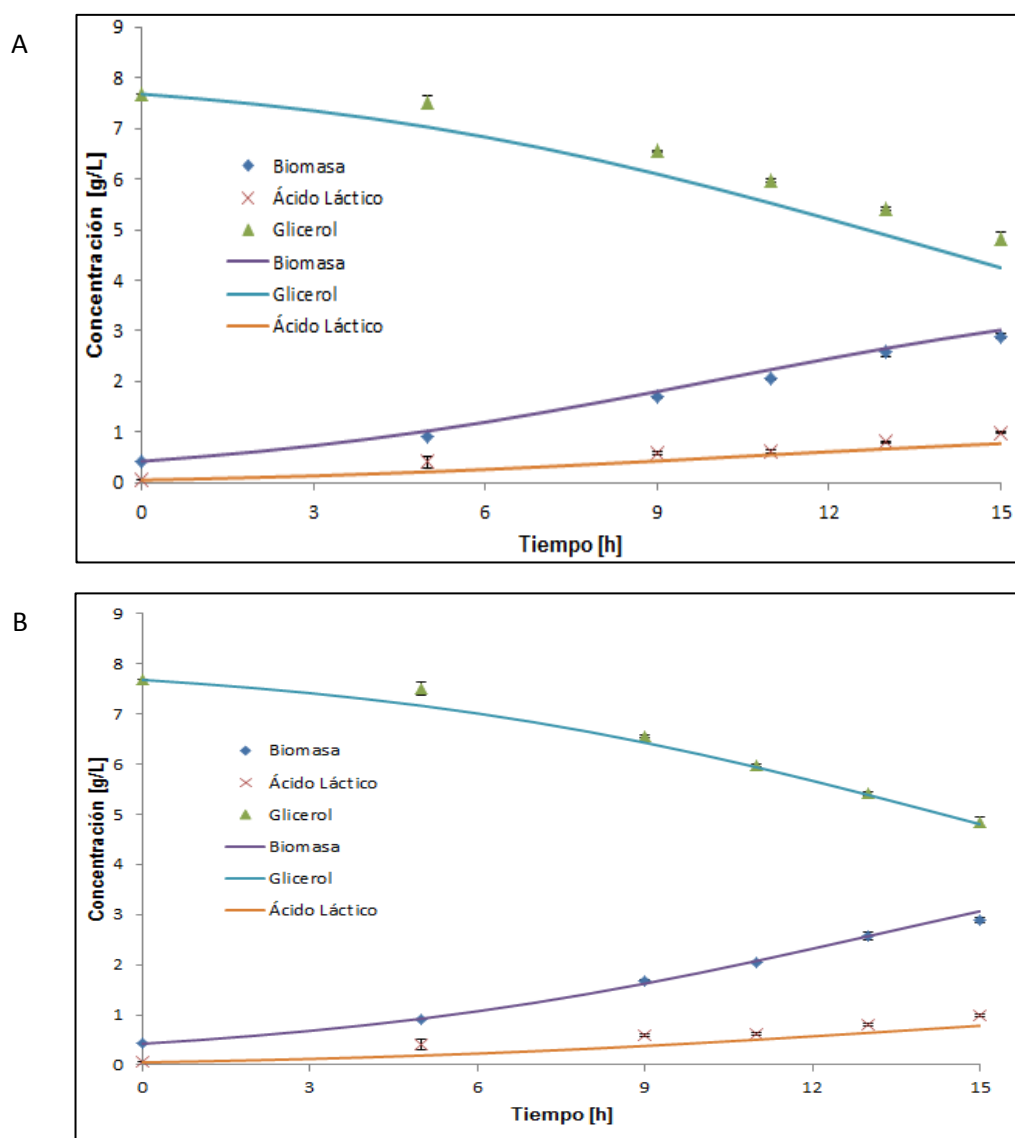
La Figura 14 muestra el modelo 1 antes y después de la optimización para el experimento R2B. La Tabla 10 muestra los nuevos valores de μ_m , ks , $y_{x/s}$ y el error del modelo antes y después de la optimización.

Tabla 10. Parámetros cinéticos optimizados del modelo 1 y porcentajes de error antes y después de optimizar

Código	Modelo 1				
	μ_m	ks	$y_{x/s}$	%Error 1 antes de optimizar	%Error 2 después de optimizar
R1A	0,2142	0,1868	1,1847	16,6628	5,8631
R1B	0,2501	2,5205	1,1999	70,2491	20,3907
R2A	0,2605	3,9701	0,9712	25,6010	9,1016
R2B	0,2751	6,4763	1,1822	9,5161	9,3000
R3A	0,2349	5,1493	0,8409	35,1270	17,1315
R3B	0,2452	3,9218	1,1940	32,0436	11,6248
		Error Promedio		31,5333	12,2353

Fuente: Autores

Figura 15. Perfiles de concentración de ácido láctico, glicerol y biomasa para el modelo cinético sin optimizar (A) y optimizados (B)



Fuente: Autores

En el anexo D se resume el sistema de ecuaciones diferenciales y parámetros optimizados que modelan la cinética de la fermentación del glicerol USP utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

CONCLUSIONES

Se logró identificar la cepa nativa *Lactobacillus* CYP4, con un intervalo de confianza superior al 99 %, como un consorcio conformado por cepas del género *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus paracasei*.

La cepa de referencia *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 fue la única bacteria de las tres probadas, que en un cultivo axénico, logró una asimilación satisfactoria del glicerol crudo. Alcanzando conversiones hasta del 94,5 %, después de una etapa de adaptación.

La conversión de sustrato y la producción de ácido fueron favorecidas para las condiciones de pH alto y concentración baja de glicerol, lo cual se puede relacionar de forma directa con la duración de la fase exponencial.

Para las condiciones evaluadas se logró identificar que el óptimo de productividad volumétrica se encuentra alrededor de las 9,6 horas de fermentación.

Se logró describir la cinética microbiana con un grado de ajuste promedio de 88% para las seis condiciones iniciales, empleando un modelo no estructurado, no segregado.

RECOMENDACIONES

Evaluar las característica y condiciones de fermentación usando un consorcio conformado por las dos cepas nativas (*L. fermentum* y *L. paracasei*).

Realizar un estudio de la influencia de los componentes del glicerol crudo en las variables de respuesta de las fermentaciones, empleando *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Reformular el medio de cultivo MRS para *L. rhamnosus* empleando un medio definido y con menor costo comercial.

En procura de generar un modelo cinético más acertado, se debe identificar el metabolito desconocido, así como determinar la influencia de otras posibles fuentes de carbono en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Banga, J. R., Versyck, K. J., Van Impe, J. F.. 2000. Numerical Strategies for Optimal Experimental Design for Parameter Identification of Non-Linear Dynamic (Bio-)Chemical Processes. European Symposium on Computer Aided Process Engineering. 10. Editor: S. Pierucci: 37 – 42.
- [2] Berry, A., M. Franco, C., Zhang, W., J. Middelberg, A. 1999. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. Biotechnology Letters 21. 1999: 163–167
- [3] BIOPOLIS TYLOR-MADE BIOTECHNOLOGY. Obtención de polímeros microbianos – bioplásticos. Consultado el 29 de abril de 2013.
Disponible en: <http://www.biopolis.es/es/biotecnologia-microbiana/polimeros-bacterianos.php>
- [4] Braquart, P. 1981. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. Journal of Applied Bacteriology. 51: 303–305.
- [5] Briggs, M. 1953. An improved medium for lactobacilli. Journal of Dairy Research. 20: 36–40.
- [6] BRITISH PETROLEUM. BP Statistical Review of World Energy June 2012. Editor: BP Statistical Review of World Energy.
- [7] Cerrate, S., Yan, F., Wang, Z., Coto, C., Sacakli, P., Waldroup, P.W. 2006. Evaluation of Glycerine from Biodiesel Production as a Feed Ingredient for Broilers. International Journal of Poultry Science 5 (11).2006: 1001-1007.
- [8] CROW IRON WORKS COMPANY. Glycerin Recovery 2008. Consultado el 24 de Agosto de 2012.
Disponible en: <http://www.crowniron.com/userimages/Glycerin%20Brochure.pdf>
- [9] De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology. 23: 130–135.
- [10] Díaz-Ruiz, P., Prada-Palomo, M.. 2012. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO POR UNA CEPA NATIVA DE *Lactobacillus sp* A PARTIR DE GLICEROL CRUDO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA DEL BODIESEL. Tesis de Pregrado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.

- [11] Dobson, R., Gray, V., Rumbold, K. 2011. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* (2012) 39.2011:217–226.
- [12] Doran, P. M., *Bioprocess engineering principles*. Elsevier Science and Technologic Books. 1995. Capítulo 4.
- [13] Eloy, C. and Lacrosse, R. 1976. Composition d'un milieu de culture destine a effectuer le denombrement des micro-organismes thermophiles du yoghurt. *Bulletin des recherches agronomiques de Gembloux*. 11: 83–86.
- [14] Evans, J.B. and Niven, C.F. 1951. Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 599–603.
- [15] FEDERACIÓN NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES DE COLOMBIA. *Cifras Informativas de Sector Biocombustibles BIODIÉSEL DE PALMA DE ACEITE* Noviembre de 2012. Editor: Fedebiocombustibles.
- [16] Fonseca, P., Felix, T., Cardoso, G., Zarur, M.. 2009. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioprocess Processing*. 887. 2009: 179-186.
- [17] Garai-Ibabe, G.. 2010. *Bacterias Lácticas de Sidra Natural: Implicaciones en alteraciones y potencial probiótico de cepas productoras de (1,3)(1,2)-β-D-Glucanos*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencias Químicas. Unidad de Microbiología del departamento de Química Aplicada.
- [18] Gonçalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M., Carrondo, M.J., Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48. 1997: 346-350.
- [19] Hoang, D.. *Lactic Acid Bacteria*. En: *Food Science and Technology. A Series of Monographs, Textbooks, and Reference Books*. Editorial: Marcel Dekker, Inc. Tercera Edición. Página: 19.
- [20] Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B..2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*.26.2000:87-107.
- [21] Jimenez, E. Langa., S. Martín, V., Arroyo, R., Martín, R., Fernández, L., Rodríguez. J. 2010. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from Human Milk. *Journal of Bacteriology*. 192. 2010: 4800.

- [22] König, H., Fröhlich, J.. Lactic Acid Bacteria. En: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Alemania, 2009. Páginas 3 – 29.
- [23] Madigan, M., Martinko, J., Parker, J.. Brock: Biología de los microorganismos. PEARSON Prentice Hall, Décima Edición. Página 399.
- [24] Moon, S.K., Wee, Y.W., Choi, G.W. 2012. Novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. Journal of Bioscience and Bioengineering. 114. 2012: 155-159.
- [25] PANREAC. CULTIMED Manual básico de microbiología Editor: PANREAC 2012.
- [26] Pinelli, D., Çzález-Vara y R., A., Matteuzzi, D., Magelli, F.. 1996. Assesment of Kinetic Models for Production of L- and D-Lactic Acid Isomers by *Lactobacillus casei* DMS 20011 and *Lactobacillus coryniformis* DMS 20004 in continuous Fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 83. 1997: 209 – 212.
- [27] Posada-Duque, J-A. (2011). Design and Analysis of Technological Schemes for Glycerol Conversion to Added Value Products Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Colombia Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica y Computación.
- [28] Posada, J.A., Rincón, L.E., Cardona, C.A., 2012. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: addressing the glycerol problem. Bioresour. Technology.111.2012: 282–293.
- [29] Reuter, G. 1970. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillensta"mme. Fleischwirtschaft 50: 954–962.
- [30] Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.M., Auffray, Y.. 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxipropionaldehyde, a precursor of acroleine. International Journal of Food Microbiology 55. 2000: 167 - 170.
- [31] Shuler, M. L., Kargi, F. Brock: Bioprocess Engineering Basic Concepts. Prentice Hall PTR, Segunda Edición. Capítulo 6.
- [32] Sunhoon, K., Ik-Keun, Y., Woo Gi, L., Ho Nam, C., Yong Keun, C..2000. High-Rate Continuous Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a Two-Stage Membrane Cell-Recycle Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 73. 2001: 25 – 34.

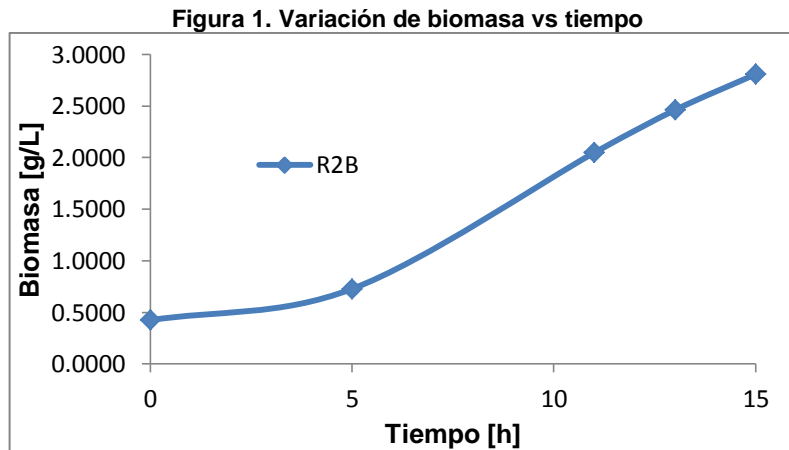
- [33] Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*. 29: 807–813.
- [34] Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., Theodoropoulos, C. 2011. Glycerol utilization for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal* 58-59. 2011: 1-11.
- [35] Vranken, G., Rimaux, T., De Vuyst, L., Leroy, F. 2008. Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. *International Journal of Food Microbiology*. 128. 2008: 58-66.
- [36] Xue-Wu, Z., Tao, S., Zhong-Yi, S., Xin, L., De-Xiang, G.. 1998. Time-dependent kinetics models for glutamic acid fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology*., 22. Febrero 1998: 205 – 209.
- [37] Young-Jung, W., Jin-Nam, K., Jong-Sun, Y., Hwa-Won, Ryu.. 2005. Optimum conditions for the Biological Production of Lactic Acid by a Newly Isolated Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus* sp RKY2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 10.2005: 23 - 28

ANEXOS

Anexo A. Curva de calibración de peso seco

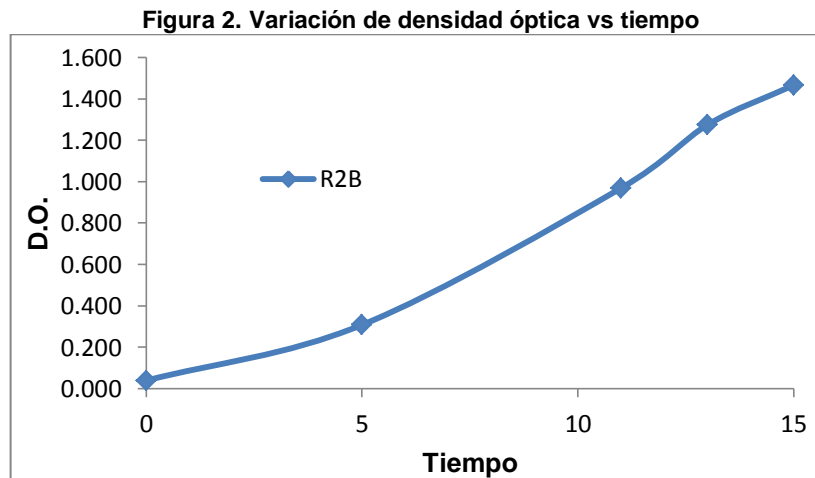
Se aprovechó la relación lineal entre el peso seco y la densidad óptica para obtener una curva de calibración, que permitiera calcular el valor de la biomasa formada en gramos por litro en función del valor de D.O. medido.

Se realizaron mediciones de biomasa para las seis condiciones iniciales, y se escogieron los datos obtenidos para R2B para obtener la calibración. La Figura 1 muestra la variación de biomasa en el tiempo, medida para este experimento.



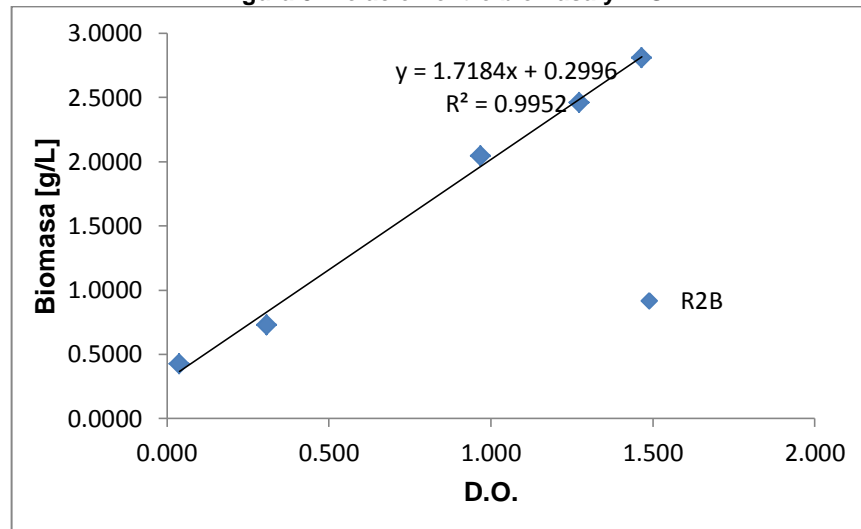
Fuente: Autores

La Figura 2 muestra la variación de D.O. vs tiempo, mientras que en la Figura 3 se puede observar la relación entre la biomasa y la densidad óptica.



Fuente: Autores

Figura 3. Relación entre biomasa y D.O



Fuente: Autores

Finalmente, la ecuación 1 se obtuvo con el fin de calcular la concentración de biomasa en función de la densidad óptica alcanzada.

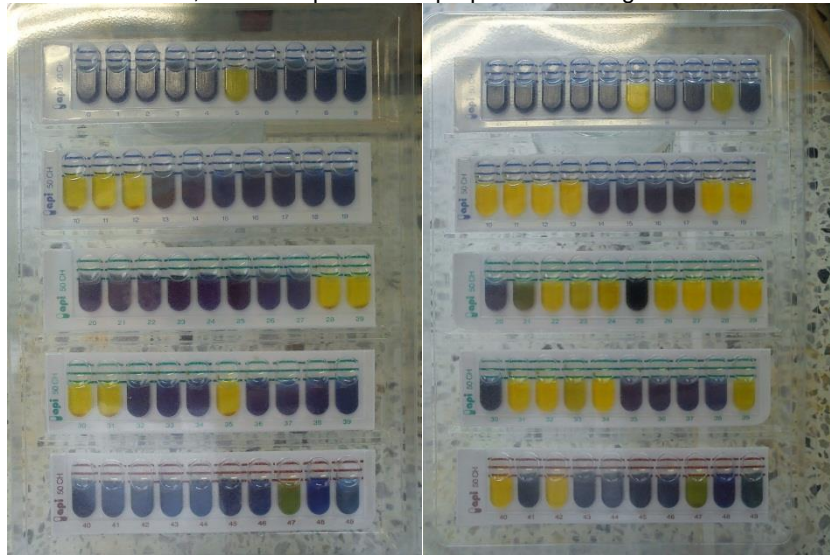
$$Biomasa = 1,7184 * D.O. + 0,299 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Anexo B. Identificación de las cepas nativas

El kit enzimático API 50 CHL V5.1 consiste en una batería de 49 carbohidratos diferentes, empleando como medio de cultivo MRS modificado. Se realizó la inoculación según las consideraciones del fabricante y se llevó a incubación a 37 °C por 48 horas. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos después de dicha fermentación.

Figura 4. Resultado de la fermentación de la batería de carbohidratos

En la izquierda se muestra el resultado que se identificó como *L. fermentum* y a la derecha el que se identificó como *L. paracasei*. El color amarillo indica positivo para la producción de ácidos, mientras que el color púrpura indica negativo.



Fuente: Autores

Se registró si hubo producción de ácidos (Cambio a tonalidad amarilla) o no (Color púrpura al final de la fermentación). Posteriormente los resultados fueron procesados mediante el uso de la plataforma APIweb, en dónde se ingresaban datos de positivo o negativo. En las figuras 5 y 6 se presentan los reportes entregados por el software.

Figura 5. Reporte positivo para *L. fermentum*

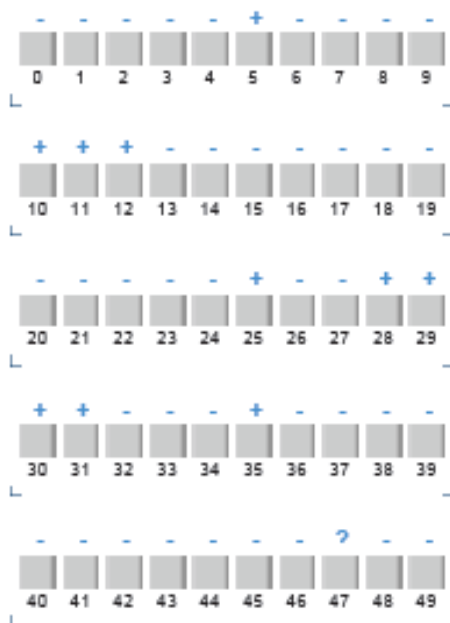
21/12/12

apiweb™ - Resultado de Identificación

Laboratorios - Bogota



API 50 CHL V5.1



REFERENCIA FECHA
21/12/12

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galeria API 50 CHL V5.1

Perfil -----+-----+++-----+-----+-----+-----?---

Nota

Taxón significativo
Lactobacillus fermentum 1

% ID	T	Pruebas en contra
99.1	0.79	EBC 5%

Taxón siguiente
Lactobacillus buchneri

% ID	T	Pruebas en contra
0.4	0.55	LARA 92% EBC 7% LAC 25% MLZ 81%

Fuente: Autores

Anexo C. Análisis de la presencia de la sustancia desconocida

Todos los cromatogramas de fermentación presentaron un aumento considerable en el pico correspondiente a los 15.04 minutos de retención. Esto se puede observar en las figuras 7 y 8 que muestran un cromatograma del blanco (medio MRS modificado con glicerol USP 8 (g/L), inoculado sin fermentar) R2B0 y un cromatograma correspondiente a una fermentación de 15 horas para la condición R2B respectivamente.

Figura 7. Cromatograma del medio MRS modificado con glicerol USP 8 g/L, inoculado sin fermentar: R2B0

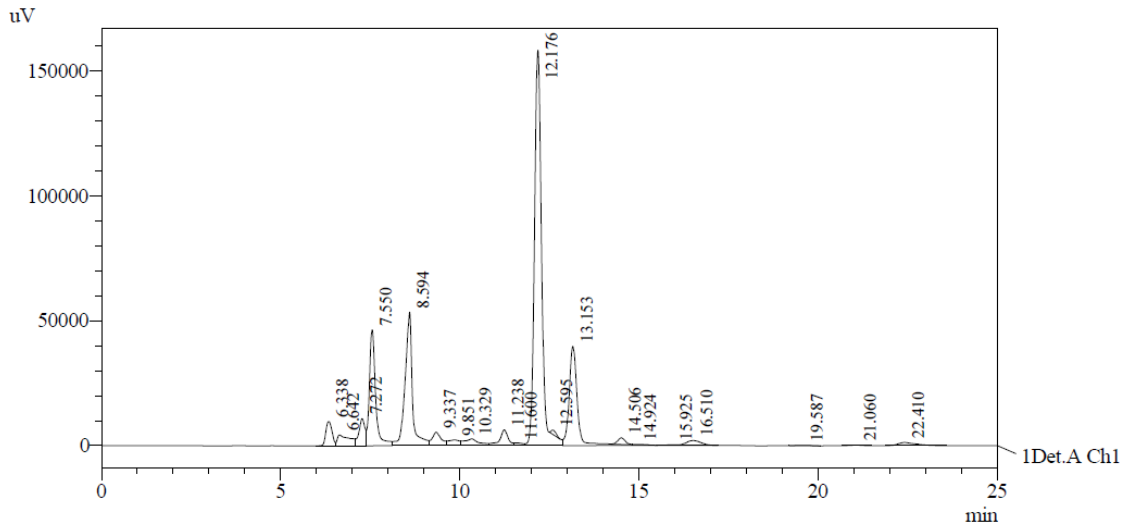
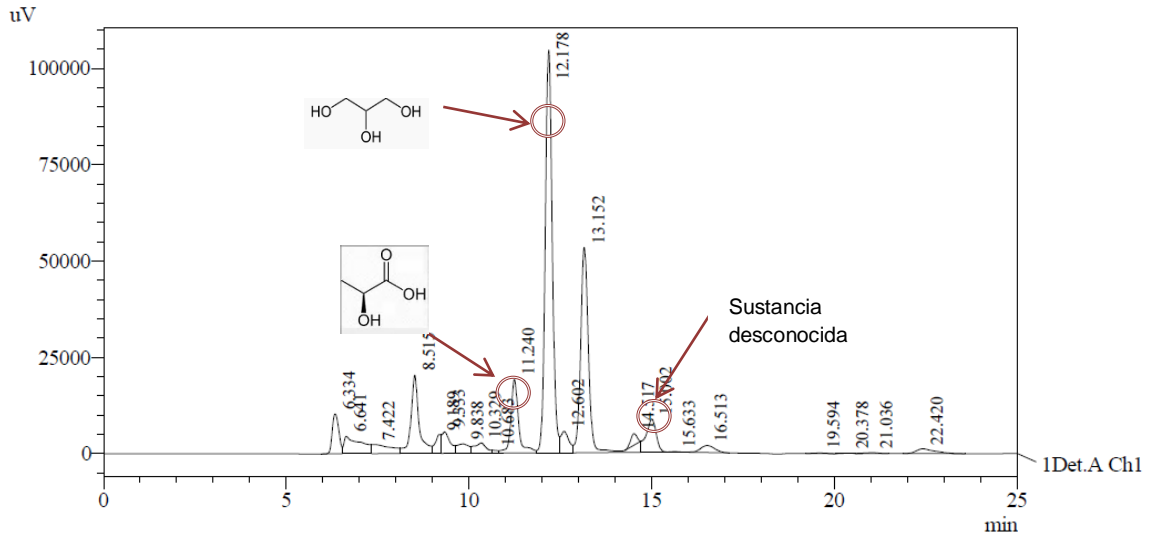


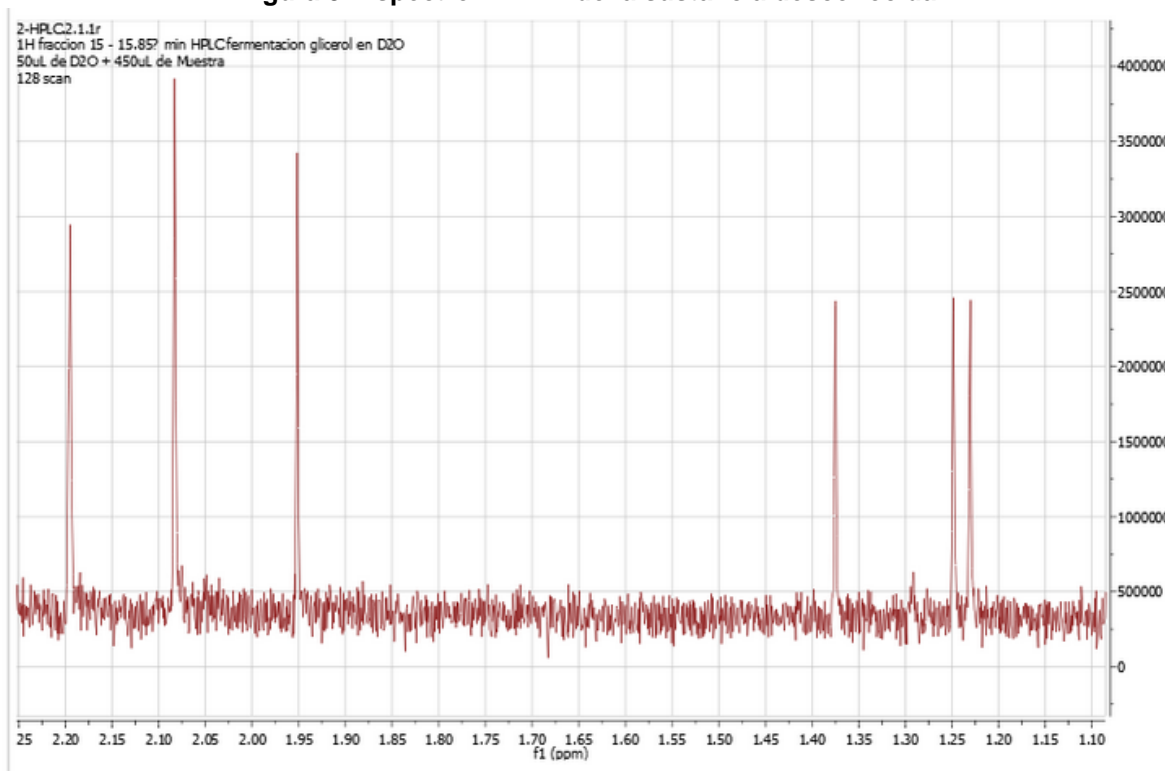
Figura 8. Cromatograma del medio MRS modificado con glicerol USP 8 g/L, inoculado con 15 horas de fermentación: R2B15



Partiendo del hipotético que el nuevo pico podría corresponder a un metabolito de la fermentación del glicerol, se realizó una búsqueda dentro de los cromatogramas proveídos por los fabricantes de la columna, en procura de una sustancia que contara con el mismo tiempo de retención, bajo las mismas condiciones del método de análisis. Sin embargo no se logró encontrar ninguna sustancia que tuviera esta característica.

De manera alternativa se decidió aislar la sustancia mediante HPLC y realizar un análisis H-RMN preliminar que permitiera en una primera instancia dar alguna información adicional acerca de la sustancia desconocida. El espectro de respuesta arrojado por el equipo de H-RMN se muestra en la Figura 9.

Figura 9. Espectro H-RMN de la sustancia desconocida



Este espectro fue analizado y comparado con el espectro simulado de diferentes metabolitos formados en fermentaciones similares: ácido propiónico, 1,3-propionaldehído, diacetil, acroleína, ácido fórmico, ácido 1,3-hidroxipropanoico,

dihidroxiacetona y ácido acético. Sin embargo no se logró una concordancia con ninguna de estas sustancias.

Aunque no se logró identificar satisfactoriamente la sustancia, se pudo inferir a partir del análisis y la distribución del espectro, que la sustancia debe ser una molécula sencilla, pequeña y simétrica.

Anexo D. Ecuaciones y parámetros finales del modelo cinético

A continuación se presentan las ecuaciones condensadas y los respectivos parámetros para el modelo cinético propuesto:

$$\frac{dx}{dt} = \left[\frac{\mu_m}{1 + \frac{ks^2}{s^2}} * \exp\left(-\frac{p^2}{kp^2}\right) \right] * x$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\left[\frac{\mu_m}{1 + \frac{ks^2}{s^2}} * \exp\left(-\frac{p^2}{kp^2}\right) \right]}{y_{x/s}} + m_s \right) * x$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{\mu_m}{1 + \frac{ks^2}{s^2}} * \exp\left(-\frac{p^2}{kp^2}\right) * y_{P/x} + m_p \right) * x$$

Tabla 2. Parámetros cinéticos empleados para el modelo

Código	μ_m	ks	kp	$y_{x/s}$	m_s [g/g]	$y_{P/x}$ [g/g]	m_p [g/g]	%Error
R1A	0,2142	0,1868	0,484	1,1847	0,0062	0,5224	0,0117	5,8631
R1B	0,2501	2,5205	0,5362	1,1999	0,0972	0,2323	0,0131	20,3907
R2A	0,2605	3,9701	0,4117	0,9712	0,0201	0,3538	0,0098	9,1016
R2B	0,2751	6,4763	3,6427	1,1822	0,029	0,2618	0,0018	9,3000
R3A	0,2349	5,1493	0,2621	0,8409	0,0316	0,2149	0,0424	17,1315
R3B	0,2452	3,9218	0,4663	1,1940	0,1422	0,2202	0,0163	11,6248

Fuente: Autores