

**BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS NATIVOS PRESENTES EN EL
GLICEROL CRUDO, SUBPRODUCTO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE
ACEITE DE PALMA, CAPACES DE UTILIZAR EL GLICEROL COMO FUENTE
DE CARBONO**

YEIMMY JOHANNA RODRÍGUEZ DÍAZ

**UIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

**BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS NATIVOS PRESENTES EN EL
GLICEROL CRUDO SUBPRODUCTO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE
ACEITE DE PALMA CAPACES DE UTILIZAR EL GLICEROL COMO FUENTE
DE CARBONO**

YEIMMY JOHANNA RODRÍGUEZ DÍAZ
Trabajo de grado para optar al Título de
INGENIERO QUÍMICO

DIRECTORA
CAROLINA GUZMÁN LUNA
Bacterióloga. Ph.D

CODIRECTORA
MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA
Química, Ph.D

PAALO ANDREA MORENO YAÑEZ
Ing. Química, Estudiante de doctorado en Ing. Química

UIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2010

Con todo mi amor y cariño dedico este proyecto:

A Dios que siempre ha estado a mi lado dándome fortaleza y sabiduría para cumplir mis metas.

A mi madre Ana, a María y Álvaro por su inmenso amor y por haberme enseñado que a pesar de las dificultades, con dedicación y perseverancia se pueden superar los obstáculos.

A mis hermanos Alex, Carolina y Eduar Andrés por su apoyo incondicional.

A todos mis amigos, en especial Luz Helena, Nohora y Felipe que siempre estuvieron a mi lado guiándome en mi proceso de formación personal y profesional.

Y eimmy

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos:

A la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, especialmente la Escuela de Ingeniería Química y su planta docente ya que con sus conocimientos me permitieron formarme como profesional

A la Dra. CAROLINA GUZMÁN por su paciencia y por su orientación durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la ingeniera PAALO MORENO por compartirme sus conocimientos y experiencias, las cuales fueron determinantes en este proyecto.

Al centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) por su apoyo brindado.

A la escuela de bacteriología y el personal técnico que nos colaboro en el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 EL GLICEROL	16
1.2 TRANSESTERIFICACIÓN.....	17
1.3 CONVERSIÓN DEL GLICEROL.....	17
1.4 MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL.....	18
1.4.1 Microorganismos industriales	18
1.4.2 Requerimientos nutricionales	20
1.4.3 Métodos Bioquímicos de Identificación.....	20
□ Tinciones simples	20
□ Tinciones Diferenciales.....	20
□ Test de la Catalasa:	21
□ Test de la Coagulasa	21
□ Sensibilidad Novobiocina:.....	21
1.5 FERMENTACIÓN	21
1.5.1 Fermentación metabólica del glicerol por microorganismo.....	22
1.5.2 Cinética de la fermentación	22
1.5.3 Clasificación de procesos de fermentación	23
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
2.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	25
2.1.1 Muestreo.....	25
2.1.2 Aislamiento	25
2.1.3 Caracterización.....	25
2.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	26
2.2.1. Fermentación por hongos.....	27
2.2.2. Fermentación por bacterias	27
2.2.3 Identificación y cuantificación de concentración celular y metabolitos	28

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
3.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	30
3.1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
3.1.2 Consorcio microbiano	31
3.1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	32
3.1.4 <i>Streptococcus</i> spp.	32
3.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	34
3.2.1 Consumo de sustratos y producción de metabolitos durante la fermentación de <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
3.2.2 Consumo de sustrato durante la fermentación del consorcio microbiano.....	35
3.2.3 Consumo del sustrato durante la fermentación con <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Streptococcus</i> spp	36
CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	44

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos de referencia.....	19
Tabla 2. Composición del medio de fermentación	26
Tabla 3. Identificación de microorganismos por medio de pruebas bioquímicas ...	33
Tabla 4. Propiedades del Glicerol USP.....	44

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aspergillus fumigatus</i> en medio PDA.....	31
Figura 2. <i>Aspergillus fumigatus</i> en microscopio (40X)	31
Figura 3. Consorcio en medio PDA.....	31
Figura 4. Consorcio en microscopio.....	31
Figura 5. <i>Staphylococcus epidermidis</i> en agar sangre	32
Figura 6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> en microscopio (100X).....	32
Figura 7. <i>Streptococcus</i> spp. en agar sangre.	32
Figura 8. <i>Estreptococos</i> spp. en microscopio (100X).....	32

LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Consumo de Glicerol por <i>A. Fumigatus</i> en medio GL	34
Gráfica 2. Producción de 1,3 - propanodiol por <i>A. fumigatus</i> en medio AL.....	34
Gráfica 3. Consumo de Glicerol por el Consorcio microbiano.....	35
Gráfica 4. Consumo de Glicerol por <i>Staphylococcus epidermidis</i>	36
Gráfica 5. Consumo de Glicerol por <i>Streptococcus</i> spp.	37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: FICHA TÉCNICA DEL GLICEROL USP.....	44
ANEXO B: DIABRAMA DE METODOLOGIA DE IDENTIFICACIÓN	45
ANEXO C: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE METABOLITOS PRODUCTO DE LA FERMENTACIÓN.....	46
ANEXO D: RUTA METABÓLICA DE DIFERENTES MICROORGANISMOS EN LA DEGRADACIÓN DE GLICEROL.....	47

RESUMEN

TÍTULO: BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS NATIVOS PRESENTES EN EL GLICEROL CRUDO, PRODUCTO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE PALMA, CAPACES DE UTILIZAR EL GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO*.

AUTOR: YEIMMY JOHANNA RODRÍGUEZ DÍAZ**

PALABRAS CLAVES: GLICEROL, IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS, BIOCOMBUSTIBLES, FERMENTACION AEROBIA, *Aspergillus fumigatus*, Consorcio microbiano, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp.

DESCRIPCIÓN:

En este trabajo se aislaron e identificaron microorganismos nativos del glicerol crudo, obtenido de dos empresas santandereanas productoras de biodiesel numeradas como A y B. Se realizaron fermentaciones con 31.5 [g/l] de glicerol comercial (USP) como fuente de carbono en un sistema aerobio con el objetivo de evaluar el consumo de glicerol por los microorganismos.

La fermentación se llevó a cabo por lotes con muestras destructivas, en un medio cultivo estéril, con el fin de evitar contaminación. Después fue inoculado y puesto en agitación a 200 rpm a temperatura 22° C y se tomaron muestras cada hora en el caso de las bacterias y cada 8 horas para los hongos.

Para observar el comportamiento de los microorganismos se realizaron curvas de crecimiento para los hongos por el método de peso seco donde la biomasa es separada por filtración al vacío y llevada a estufa a 105°C., en el caso de las bacterias, la curva se llevó a cabo por el método de recuento en placa. También se identificó metabolitos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Como resultado se identificó en la muestra A la especie fúngica *Aspergillus fumigatus* y un consorcio microbiano. En la muestra B se encontró la especie *Staphylococcus epidermidis* y una especie del género *Streptococcus* spp. Se evidenció el consumo de glicerol comercial por parte de estos microorganismos. Por otra parte utilizando almidón como fuente de carbono, *Aspergillus fumigatus* produjo 1,3 – propanodiol.

*Proyecto de grado

**Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Ph. D Carolina Guzmán. Co-directoras: Ph.D Marianny Yajaira Combariza Ing. Paolo Andrea Moreno Yañez

ABSTRACT

TITLE: SEARCH OF NATIVE MICROORGANISMS PRESENT IN THE CRUDE GLYCEROL, PRODUCT OF PALM OIL TRANSESTERIFICATION, CAPABLE OF USING GLYCEROL AS CARBON SOURCE*.

AUTHOR: YEIMMY JOHANNA RODRÍGUEZ DÍAZ**

KEYWORDS: GLICEROL, IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS, BIOFUEL, AEROBIC FERMENTATION, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp, microbial consortium.

Description:

In this work were isolated and identified microorganisms native of the crude glycerol, obtained from two companies santandereanas of production of biodiesel called A and B. Were realized fermentations with 31.5 [g/l] of commercial glycerol (USP) as a carbon source in aerobic system in order to evaluate the consumption of glycerol by microorganisms.

The fermentation was conducted for batches with destructive samples, in a sterile culture medium, to avoid contamination. Then was inoculated and placed in agitation to 200 rpm with temperature 22° C and samples were taken every hour for bacteria and every 8 hours for fungi.

To observe the behavior of the microorganisms were made growth curve for fungi by dry weight method, where biomass is separated by vacuum filtration and carried stove to 105°C, in the case of the bacteria, the curve was made by the plate count method. Also identified metabolites by high performance liquid chromatography (HPLC).

As a result was identified in the sample (A) a fungal specie *Aspergillus fumigatus* and microbial consortium. In the sample (B) was found the species *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus* spp. Was evident glicerol consumption by these microorganisms, on other hand using starch as carbon source, *Aspergillus fimigatus* produced 1,3 – propanediol.

*Degree Project

**Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Ph. D Carolina Guzmán Luna Co-directors: Ph.D Marianny Yajaira Combariza Ing. Paolo Andrea Moreno Yañez

INTRODUCCIÓN

El petróleo, es la principal fuente de energía en el mundo, pero su limitada disponibilidad, alto precio, y las preocupaciones sobre sus impactos ambientales, han llevado a la búsqueda de energías alternativas más limpias. Entre las opciones más sobresalientes se encuentran los biocombustibles. Los biocombustibles se clasifican en primera, segunda y tercera generación. El biodiesel de palma y el bioetanol de caña pertenecen a la primera generación. El biodiesel es en la actualidad el único biocombustible capaz de desplazar completamente a su homólogo el petróleo, además tiene un proceso de producción simple y una gran variedad de materias primas usadas en su fabricación ^[9] ^[19].

Colombia es el primer productor de Biodiesel en Latinoamérica, y de acuerdo con las actuales políticas gubernamentales, la producción proyectada a final de 2010 es de 516000 ton/año. El principal subproducto del biodiesel, es el glicerol, que corresponde aproximadamente al 10% en peso del total de biodiesel producido. A pesar de que el glicerol tiene gran aplicación en la industria cosmética y alimenticia, el generado a partir de biodiesel contiene tantas impurezas que el costo de su refinación hace inviable esta alternativa. Se han realizado numerosos estudios acerca de las transformaciones químicas y microbiológicas del glicerol. La conversión química es llevada a cabo por oxidación o reducción y por reacciones del glicerol con otras moléculas para formar nuevas especies. En la producción comercial se utilizan catalizadores heterogéneos con alta selectividad y conversión. Las transformaciones biológicas son procesos catalíticos que usan microorganismos en la producción de bienes y servicios. Son favorables desde el punto de vista de pre-tratamiento de la materia prima y condiciones de operación del proceso relativamente suaves. Las principales desventajas de los procesos biológicos están relacionadas con bajos rendimientos, la vulnerabilidad de las cepas y la dependencia de tecnologías foráneas ^[9] ^[20] ^[14] ^[12].

1. MARCO TEÓRICO

Actualmente la industria de biocarburantes tiene una gran demanda alrededor del mundo, principalmente en países como Alemania y Estados Unidos. El incremento de la producción de biodiesel ha generado una sobreproducción de glicerol crudo que es aproximadamente el 10 %(p/p) del biodiesel producido. Esto ha causado un gran impacto ambiental y económico ya que no se puede eliminar al medio ambiente, debido a los contaminantes presentes en este, lo que hace de su refinación un proceso costoso^[20].

1.1 EL GLICEROL

El glicerol o glicerina ($C_3H_8O_3$) es un alcohol con tres grupos hidroxilos (-OH) y es uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos (ver propiedades en el ANEXO A). Puede ser obtenido de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales, también por fermentación microbiana o síntesis química de materias primas de la industria petroquímica. También se recupera de la fabricación de jabones por hidrólisis de grasas, proceso que actualmente es de menor importancia, debido a que el jabón es remplazado por detergentes^[19].

El glicerol es un producto que tiene gran aplicación en la industria química, automotriz, textil, y en productos farmacéuticos. Nuevas aplicaciones se están evaluando en la industria alimentaria, en la industria de poliglicerol y poliuretano^[19]. También está siendo considerado como materia prima en la fermentación microbiana como única fuente de carbono.

1.2 TRANSESTERIFICACIÓN

Es un proceso donde hay una reacción entre un aceite o grasa y un alcohol en un medio catalizado, para producir esteres alquílicos de ácidos grasos (Ej. Biodiesel) y glicerol. Los alcoholes utilizados en este proceso deben ser de bajo peso molecular, el más utilizado es el metanol por su bajo precio^[22].

La reacción de transesterificación transforma las moléculas de triglicéridos, grandes y ramificadas en moléculas de esteres alquílicos, lineales, no ramificados, de menor tamaño y muy similares a las del petrodiesel. Para que la reacción sea completa se requiere de temperatura y un potente catalizador, puede ser ácido, básico, enzimas, catalizadores básicos no iónicos como hidróxido de sodio o de potasio^[11].

1.3 CONVERSIÓN DEL GLICEROL

El glicerol no se puede añadir directamente al combustible, porque se polimeriza a altas temperaturas, y una parte se oxida a acroleína, por esta razón debe ser modificado para poder utilizarse como un aditivo en los combustibles^[3].

Existen dos alternativas para la transformación del glicerol crudo; por conversión catalítica heterogénea, y procesos microbiológicos, que aprovechan la capacidad que tienen algunos microorganismos para utilizar el glicerol crudo como fuente de carbono y energía, para producir sustancias de interés industrial y/o energético, a través de diversas rutas metabólicas que dependen del tipo de microorganismo, las condiciones del crecimiento y algunos factores como la temperatura y el pH^[9].

En los procesos industriales microbiológicos, el principal producto obtenido por la fermentación de glicerol es el 1,3 –propanodiol (1,3-PDO), este producto fue observado por primera vez en 1881, pero no se prestó atención durante más de

un siglo. 1,3-PDO puede ser utilizado como monómero de poli-condensación para producir plásticos con propiedades especiales, es decir, poliésteres, poli-éteres y poliuretanos. Puede servir como un solvente. Otros productos que se obtienen por fermentación utilizando el glicerol como fuente de carbono son: ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico y el butanol. Esto ha generado un gran interés por la investigación de nuevas alternativas para utilizar el glicerol como materia prima en procesos biológicos y convertirlo en un producto de mayor valor ^[19].

1.4 MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

Constituye aquellos procesos industriales catalíticos basados en el uso de microorganismos. Utilizando principios científicos y de ingeniería en la producción de bienes y servicios con agentes biológicos ^[5].

1.4.1 Microorganismos industriales

El microorganismo de tipo industrial debe ser capaz de crecer y sintetizar el producto en un cultivo a gran escala. También debe producir esporas o alguna otra forma de célula reproductiva de modo que pueda ser fácilmente inoculada en grandes fermentadores ^[10].

Un microorganismo industrial se caracteriza por crecer rápidamente y sintetizar el producto deseado, en un periodo corto, que utilice medios de cultivo líquido relativamente barato, obtenido en grandes cantidades. No debe ser patógeno, debido al enorme tamaño de la población microbiana de un fermentador industrial, es prácticamente imposible evitar la contaminación del ambiente fuera del fermentador. Por último, un microorganismo debe ser susceptible a la manipulación genética, ya que de esta manera, se incrementa el rendimiento del proceso. Por lo tanto, disponer de un microorganismo productor estable y fácilmente manipulable es una clara ventaja ^[10].

En la tabla 1, se encuentran algunos microorganismos aislados a partir del glicerol, productores de sustancias de interés.

Tabla 1. Microorganismos de referencia

MICROORGANISMOS			CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	METABOLITO
Familia	Género	Especie		
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	Bacilo Gram negativo no esporulados inmóvil anaerobio facultativo	1,3 -propanodiol Acido láctico
		<i>pneumoniae</i>		1,3-propanodiol
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	Bacilo Gram negativo no esporulado Móvil anaerobio Facultativo	1,3- propanodiol
	<i>Cloustridium</i>	<i>pasteurianum</i>	Bacilos anaerobios esporulado Gram positivo	1,3 - propanodiol
		<i>butylicum</i>		
		<i>butylicum</i>		
		<i>acetobutylicum</i>		
	<i>kainantoi</i>			
Dipodascaceae	<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	Levadura aerobia que presenta dimorfismo	Ácido cítrico
Saccharomycea	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Levadura que se divide por gemación	Etanol

Fuente: (Yazdani *et al.* 2007; Rehman *et al.* 2008; Silva *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2007)

1.4.2 Requerimientos nutricionales

El agua es de gran importancia para el crecimiento de los microorganismos y los nutrientes son las sustancias que requieren para formar su material genético y obtener energía. Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que son los microorganismos que obtienen el carbono del CO₂ como las algas y los heterotróficos, que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Otro factor esencial está determinado por las condiciones de cultivo, que dependen si el microorganismo es aerobio o anaerobio. A continuación se nombrarán algunos nutrientes^{[5] [10]}:

- **Macro nutrientes:** H, O, C, N, S, P
- **Micronutrientes:** Co, Zn, Mo, Cu, Mn, Ni, Se, W
- **Factores de crecimiento:** Vitaminas, Purinas, Pirimidinas, Aminoácidos.

1.4.3 Métodos Bioquímicos de Identificación

Las pruebas más comunes utilizadas en la identificación de microorganismos son:

- **Tinciones simples**

Azul de metileno (Tinción positiva): Permite teñir el interior celular. Tiñe microorganismos procarióticos (vivos o muertos). Los eucarióticos sólo se tiñen si están muertos. Algunas estructuras, como los corpúsculos metacromáticos, se tiñen más intensamente con este colorante que el resto de la célula^[13].

- **Tinciones Diferenciales**

Tinción de Gram: Permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias Gram(+) y Gram(-), según como se comporten ante esta tinción. El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram + tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, que se tiñe con la coloración tomando un color azul, mientras que las bacterias Gram (-), tienen una

capa de peptidoglicano más fina, que se tiñe con una coloración de contraste, y una capa lipopolisacáridica externa ver ^[13].

- **Test de la Catalasa:**

Algunas bacterias poseen **catalasa**, una enzima capaz de destruir el agua oxigenada generada en algunos procesos metabólicos. Esta enzima está presente en la mayoría de las bacterias que contienen citocromos (*Enterococcus* y *Streptococcus*), bien sea aerobias o anaerobias facultativas. Si en la prueba aparecen burbujas indica que el microorganismo es catalasa positiva ^[13].

- **Test de la Coagulasa**

Es una prueba que permite diferenciar las especies del genero *staphylococcus* (*S.aures*, *S. epidermidis*, *S. saprophylico*). La coagulasa es una enzima producida por *S.aures*, capaz de aglutinar el fibrinógeno presente en el plasma. Si la prueba es cuagulasa positiva se forma un coagulo y la especie es *S. aures* ^[17].

- **Sensibilidad Novobiocina:**

Prueba que permite identificar los *staphylococcus coagulasa negaticos* (*S. epidermidis* y *S. saprophylicos*) que se diferencia en dos grupos según sea sensible o no a la novobiocina. Se considera un *staphylococcus* sensible (*S.epidermidis*) cuando se forma un halo de inhibición de crecimiento superior a 16 mm ^[6].

1.5 FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación completa, regenerador de ATP realizado por microorganismos, donde los productos en que se divide el sustrato orgánico, sirven a la vez como dadores inmediatos de energía libre ^[18]. Este proceso es llevado a cabo en un birreactor mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivos son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa ^[5].

1.5.1 Fermentación metabólica del glicerol por microorganismo

Aunque muchos microorganismos pueden metabolizar el glicerol, en presencia de aceptores externos de electrones (metabolismo respiratorio), pocos lo pueden hacer fermentativo. El metabolismo fermentativo del glicerol se ha estudiado en gran detalle en varias especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *Citrobacter* y *Klebsiella* [21]. La relación del glicerol con estos microorganismos está estrictamente vinculada con la capacidad para sintetizar el 1,3-propanodiol (1,3-DOP). Las vías de dismutación del proceso que son responsable de este fenómeno son las siguientes:

a) Reacción de oxidación: El glicerol es deshidrogenado por NAD enlazado al glicerol deshidrogenasa (glyDH) a dihidroxiacetona (DHA), que luego es fosforilado por PEP y ATP dependiendo de las quinasa DHA (DHAK) [21].

b) Reacción de reducción: El glicerol es deshidrogenado por la coenzima B12, que depende del glicerol para formar dehidratasa 3- hidroxipropionaldehído, que después se reduce a los productos principales de fermentación 1,3- PD por el NADH enlazado al 1,3- DOP deshidrogenasa (1,3- PDODH) [21].

1.5.2 Cinética de la fermentación

La cinética de los procesos de fermentación es potencialmente valiosa para mejorar el rendimiento de los mismos, los cuales son esenciales para el diseño de los procesos continuos y se refiere a la velocidad de reacción en general [7].

El estudio de la cinética de la fermentación crea expresiones de velocidad, y selecciona tasas significativas que serán medidas para describir el rendimiento o factibilidad del proceso. Estas expresiones se nombran a continuación [7]:

a) Productividad: La productividad se define como la concentración del producto final dividido por el tiempo transcurrido desde la inoculación a la entrega del reactor.

b) Factores de un sistema de fermentación:

- Crecimiento: Es tomada como el total de la actividad catalítica del sistema.
- Utilización de azúcar: Indica la tasa de energía para el sistema.
- Formación de producto

c) Variables del proceso

Las principales variables en el proceso de fermentación son: la temperatura, pH, y los nutrientes (o reactivo) del medio de cultivo (incluyendo el oxígeno). Además, ciertas condiciones del entorno físico, como la turbulencia del fluido y el equipo, son características de diseño que afectan la transferencia de masa en la zona de reacción ^[7].

1.5.3 Clasificación de procesos de fermentación

Los procesos de fermentación se pueden agrupar de acuerdo a la fase metabólica de donde se obtiene el producto principal y como se genera. A continuación se describe cada tipo ^[7]:

- **Tipo I:** Proceso en el cual el producto principal es resultado del metabolismo primario que se forma durante la fase exponencial.
- **Tipo II:** En este proceso el producto principal se obtiene indirectamente de las reacciones del metabolismo energético. El resultado es de un lado de la reacción o posterior interacción entre los productos metabólicos.
- **Tipo III:** En el proceso el producto principal no surge del metabolismo energético, es elaborado por las células.

En general, la búsqueda de microorganismos nativos en el glicerol crudo y su posterior identificación serán utilizados en procesos fermentativos para obtener productos de interés, siendo una alternativa nueva que permite dar solución a la problemática que se ha generado por la producción de biodiesel en el mundo.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Una gran variedad de microorganismos pueden utilizar el glicerol como única fuente de carbono. En estudios realizados, se ha encontrado que las especies de la familia *Enterobacteriaceae* son las que mejores resultados han arrojado, obteniendo como producto primario 1,3 – propanodiol y la especie *Yarrowia lipolytica* generando ácido cítrico ^[9].

2.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

En la identificación de microorganismos se llevó a cabo una serie de pasos que se enuncian a continuación¹ ANEXO B:

2.1.1 Muestreo

El procedimiento de muestreo se llevó a cabo en dos plantas productoras de Biodiesel ubicadas en el departamento de Santander numeradas como A y B^[17].

2.1.2 Aislamiento

El aislamiento se realizó por siembra de la muestra por agotamiento en medios sólidos no selectivo para hongos y bacterias, como agar Nutritivo y Papa Dextrosa Agar, y en medios selectivos como MacConkey, agar sangre, agar clostridium (RCM), agar mossel, agar kliger, rosa de bengala y agar reductores de sulfito. Luego de la incubación a temperatura de 37°C por 24 horas para bacterias y ambiente para los hongos por 8 días, se procedió a su identificación correspondiente.

2.1.3 Caracterización

Para la identificación de los microorganismos se utilizaron pruebas bioquímicas como coloración Gram, tinción con azul de lactofenol y baterías bioquímicas ^[18]^[1].

2.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN

En este trabajo se realizó un proceso fermentativo aerobio, con los microorganismos aislados de las muestras, en un medio con glicerol comercial (USP) como única fuente de carbono, que contenía nutrientes y oligoelementos que favorecían el metabolismo de los microorganismos ^[4].

El proceso de fermentación se realizó en un medio mineral, que fue propuesto por Rennie (1981)^[15] y que luego fue modificado por Salinas A^[16]. También para este trabajo se modificó el medio agregando glicerol como fuente de carbono. Otros medios que se utilizaron fueron: medio líquido de almidón (AL) y uno con almidón y glicerol (AGL) su composición se enuncia en las tabla 2, que se encuentra a continuación:

Tabla 2. Composición del medio de fermentación

MEDIO	COMPOSICIÓN	CANTIDAD (g/L)
1 (AL)	Almidón	250
2(AGL)	Glicerol	31.5
	Almidón	250
3 (Medio mineral)	Glicerol	31.5l
	K ₂ HPO ₄	1.5
	KH ₂ PO ₄	1.5
	NH ₄ NO ₃	2.0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
	NaCl	1
	FeSO ₄ .7H ₂ O [16mM]	5.4
	EDTA [18.6 mM]	4.4

2.2.1. Fermentación por hongos

Este proceso se llevó a cabo por lotes con muestras destructivas, con 40 ml de medio de fermentación estéril contenido en erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con el fin de evitar contaminación. Después fue inoculado y puesto en agitación a 200 rpm a temperatura de laboratorio (22°C) y se tomaron muestras cada 8 horas por 3 días, ver diagramas de proceso.

a) Pre-inóculo

Para la preparación del pre-inóculo se utilizaron 5ml de agua destilada para diluir las esporas del hongo que se encuentran en el medio de cultivo previamente repicado. Se hace un recuento de esporas de la dilución anterior, con la cámara de Neubauer, para obtener el número determinado de esporas necesarias para inocular el medio de fermentación.

b) Inoculación

Con el número de esporas obtenido, se procedió a inocular el medio de fermentación previamente preparado y esterilizado, que contiene glicerol como fuente de carbono y luego se distribuyó en los erlenmeyer de trabajo.

2.2.2. Fermentación por bacterias

Este proceso se diferencia del utilizado para hongos, en el intervalo de toma de muestra de 1 hora en lugar de 8 horas.

a) Pre- inóculo

En la preparación del pre-inoculo se utilizó 40 ml de luria bertani (LB) medio selectivo, donde se dejó crecer el microorganismo a temperatura de 37° C hasta obtener una densidad óptica de 0.3 leída a 540 nm.

b) Inoculación

Después de obtener la densidad óptica de 0.3, se procedió a inocular el medio de fermentación estéril que contiene glicerol con 3 ml de pre-cultivo a temperatura de laboratorio (22°C).

2.2.3 Identificación y cuantificación de concentración celular y metabolitos

Para la identificación de los metabolitos en la fermentación se tomó una cantidad de medio que fue filtrado (hongos) o centrifugado (bacterias). El sobrenadante (10 ml) fue llevado al laboratorio de cromatografía para su posterior análisis. En el sedimento obtenido se determinó el crecimiento de los microorganismos por peso seco (método directo) para los hongos y por recuento en placa (método indirecto) en el caso de las bacterias ^[8].

a) Peso Seco

El medio de cultivo que contenía la concentración de células se separó por filtración al vacío. La cantidad de biomasa obtenida fue llevada a la mufla por 24 horas a 105°C. Después se pasó al desecador y luego fue pesado.

b) Recuento en placa

Del medio de fermentación, a intervalos determinados, se tomó una muestra que fue diluida hasta obtener la menor concentración de células y luego se hizo siembra en un medio sólido de agar recuento. Se llevó a incubadora por 24 horas a 37°C para su posterior recuento de células viables (Cámara de Quebec).

c) Cromatografía

La cromatografía líquida es una técnica de análisis usada principalmente para la separación de los componentes de una muestra, que permite determinar, cuantificar e identificar las cantidades de dichos componentes.

Para la determinación de los metabolitos obtenidos en la fermentación, se hizo un análisis de cromatografía líquida de Alta Eficiencia (HPLC), utilizando una columna SUPELCOGEL C-610H y ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.8 mM como fase móvil a un flujo de 0.8 ml/min, el detector usado fue de índice de refracción. Se realizaron curvas de calibración con patrones de glicerol, ácido butírico, 1,3 – propanodiol, butanol y etanol, ya que de acuerdo con la bibliografía son los posibles productos de la fermentación del glicerol crudo ^[19].

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Al considerar la conversión microbiana del glicerol en productos valiosos, las opciones son muy limitadas, pero una gran variedad de microorganismos pueden utilizar el glicerol como única fuente de carbono, aunque en la mayoría de los casos en los resultados sólo hay producción de biomasa [9].

3.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

De la muestra A se obtuvo un *Aspergillus fumigatus* a las 72 h de incubación y un consorcio microbiano obtenido a las 37°C.

De la muestra B se aislaron en agar nutritivo cocos GRAM (+), lo cuales fueron confirmados como *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus* spp., así como algunas bacterias anaerobias.

Es de resaltar, que el aislamiento de los microorganismos fue más complejo a partir de la muestra A posiblemente por las características fisicoquímicas de la muestra, presentando un pH alcalino y una viscosidad muy alta. La muestra B se caracterizo por tener un pH acido.

3.1.1 *Aspergillus fumigatus*

Características macroscópicas:

En el medio papa dextrosa agar (PDA), se observaron colonias cerebriformes, aterciopeladas de color verde oscuro vellosas.

Características microscópicas:

Hongos filamentosos con conidióforos cortos de pared lisa, ligeramente verdosos. Nacen de una célula base del micelio, ensanchado al final en una vesícula amplia coronada de esterigmas en forma de redoma.

Figura 1. *Aspergillus fumigatus* en medio PDA

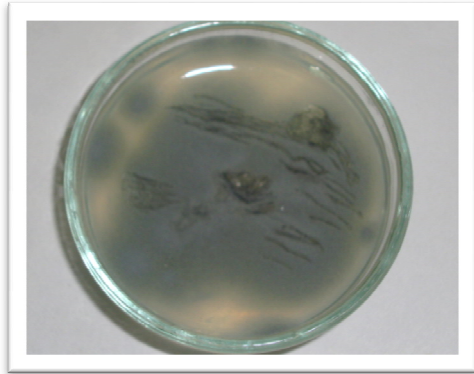
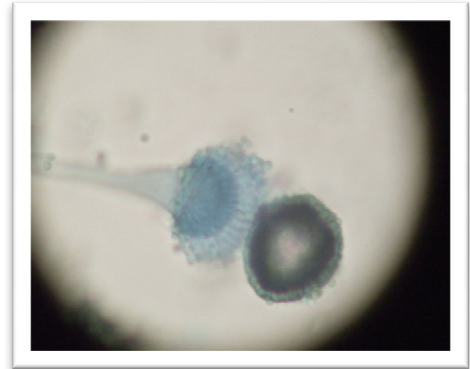


Figura 2. *Aspergillus fumigatus* en microscopio (40X)



3.1.2 Consorcio microbiano

Macroscópicamente, las colonias son cremosas traslúcidas (Figura 3), el tamaño varía entre colonias. Bioquímicamente son fermentadoras de lactosa. En la coloración se observó cocobacilos Gram variables (Figura 4). Luego de repicar una única colonia en otros medios de cultivo, no fue posible la separación de los microorganismos, concluyéndose la presencia de un consorcio microbiano. Durante el recuento en placa se observaron tres colonias diferentes en cuanto a población celular.

Figura 3. Consorcio en medio PDA

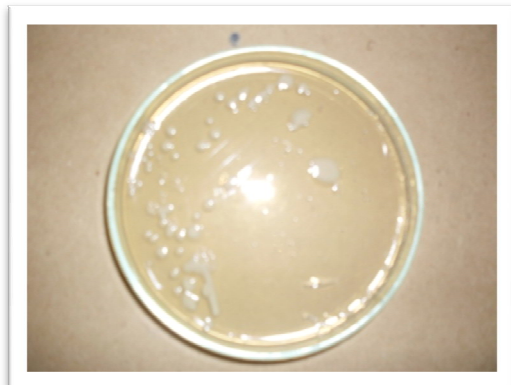
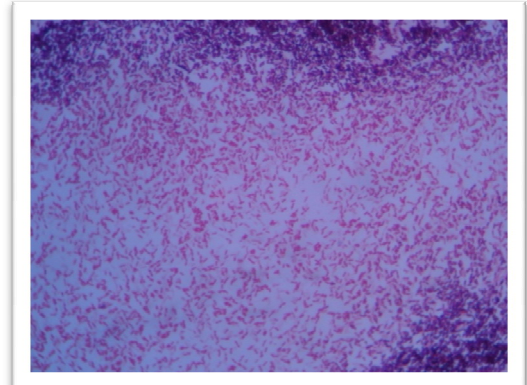


Figura 4. Consorcio en microscopio



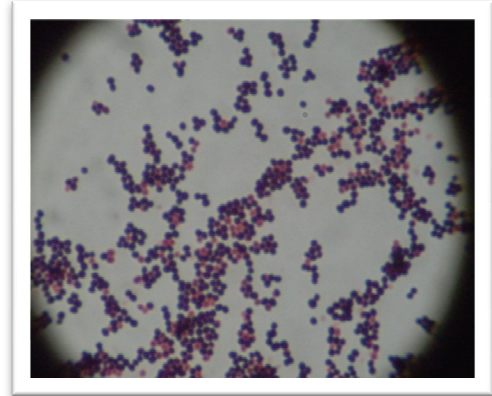
3.1.3 *Staphylococcus epidermidis*

Las colonias son tornasoladas, de apariencia cremosa, de color verdoso (Figura 5). En el microscopio se observaron cocos Gram positivos grandes y crecen aglomerados (Figura 6).

Figura 5. *Staphylococcus epidermidis* en agar sangre



Figura 6. *Staphylococcus epidermidis* en microscopio (100X)



3.1.4 *Streptococcus* spp.

Las colonias son tornasoladas, cremosas y pequeñas. En el microscopio se observaron unos cocos Gram positivos pequeños y que crecen en cadenas.

Figura 7. *Streptococcus* spp. en agar sangre.

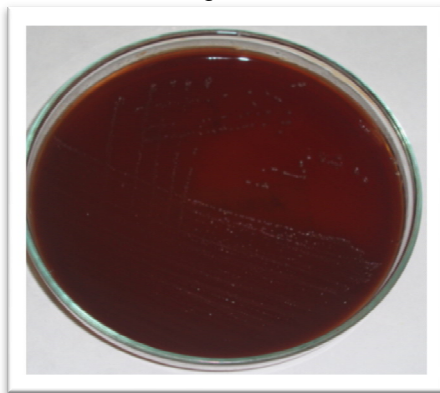
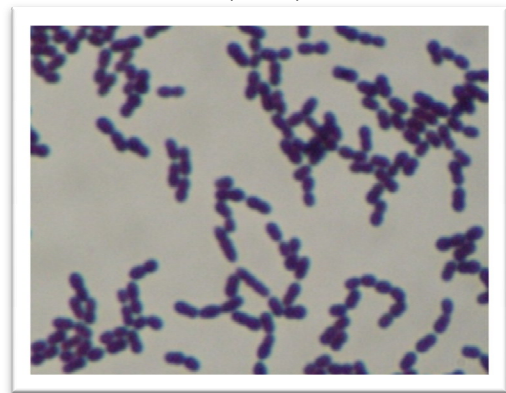


Figura 8. *Streptococcus* spp. en microscopio (100X)



En la tabla 3 se puede observar los resultados de la caracterización fisicoquímica

Tabla 3. Identificación de microorganismos por medio de pruebas bioquímicas

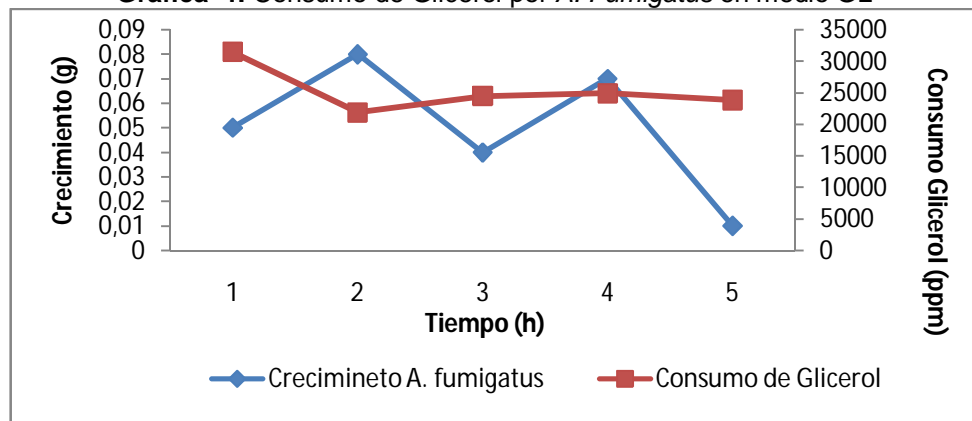
MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA POR COLORACION	RESULTADO	PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESULTADOS	MICROORGANISMO
GLICEROL A	Azul de lactofenol	Hifas septadas hialinas	Se identifica por literatura (Klich & Pitt 1992, Kozakiewicz, 1989 ^[2])		<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Gram	Coco bacilos Gram (+) Gram (-) Gram variables	Dada de la presencia de más de un microorganismo no fue posible hacer una caracterización de microorganismos por sustratos definidos. Posteriormente se hará una caracterización teniendo en cuenta los productos de su metabolismo.		Consortio microbiano
GLICEROL B	Gram	Cocos Gram(+)	Catalasa Coagulasa Novobiocina	Catalasa (+) Coagulasa (-) Novobiocina sensible	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Cocos pequeños Gram(+)		Catalasa (-)	<i>Streptococcus spp.</i>
		Coco bacilos Gram (+) anaerobios	La identificación de estos microorganismos se continuará en el siguiente proyecto		

3.2 PROCESOS DE FERMENTACIÓN

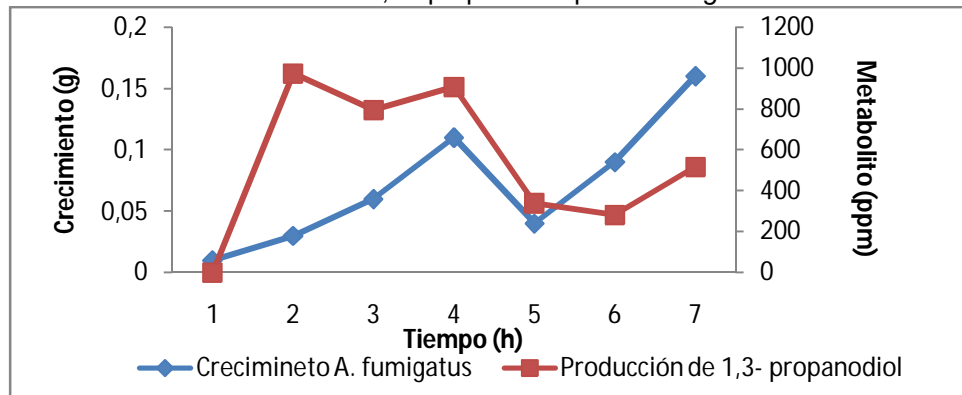
En el proceso de fermentación, en el medio mineral que contenía 31,5 [g/l] de glicerol USP, se observó un aprovechamiento de la fuente de carbono por los microorganismos aislados. El proceso de fermentación para los hongos duró 72 horas teniendo en cuenta el crecimiento lento en comparación con las bacterias (24 h). Los resultados se observan en las siguientes gráficas:

3.2.1 Consumo de sustratos y producción de metabolitos durante la fermentación de *Aspergillus fumigatus*

Gráfica 1. Consumo de Glicerol por *A. Fumigatus* en medio GL



Gráfica 2. Producción de 1,3 - propanodiol por *A. fumigatus* en medio AL

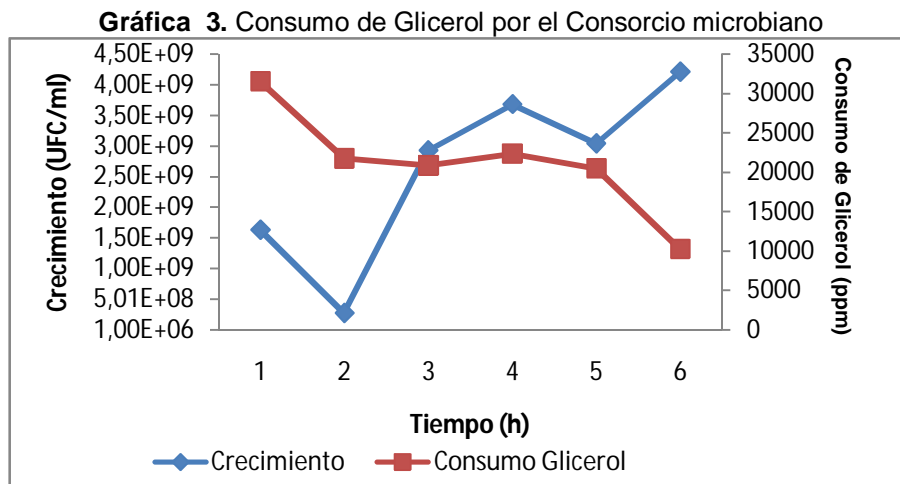


A pesar de observar un crecimiento se ve una disminución en el peso seco a intervalos de 24 h, fenómeno que puede estar relacionado con el comportamiento atípico del microorganismo o por un error del equipo de medición. Teniendo en cuenta los valores de peso seco de *A. fumigatus*, en la gráfica 1 se evidencia una dificultad para adaptarse al medio y solo aprovecha la fuente de carbono en la primera fase.

En el medio líquido de almidón (AL), se evaluó la capacidad fermentativa de este hongo a partir de almidón como fuente de carbono de fácil aprovechamiento. En la gráfica 2, se observó la concentración de 1,3- propanodiol encontrada, utilizando el almidón como fuente de carbono.

3.2.2 Consumo de sustrato durante la fermentación del consorcio microbiano

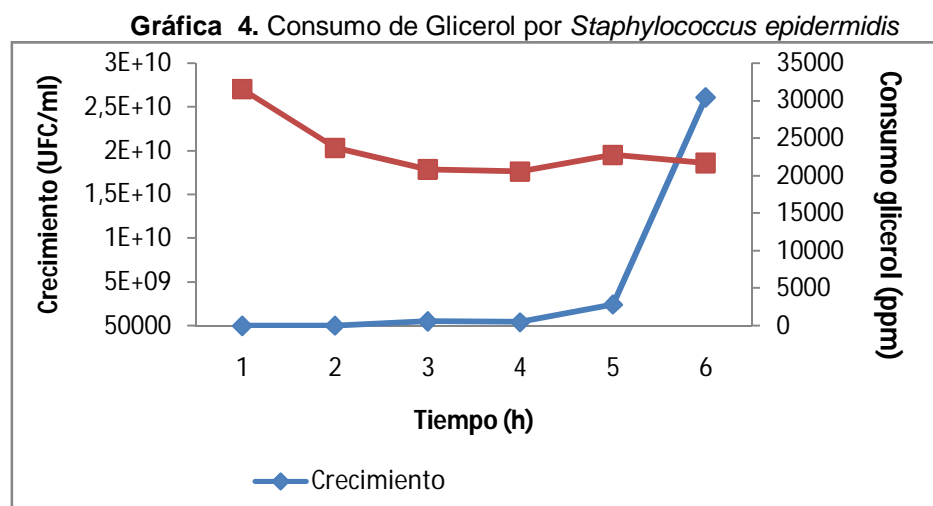
En este ensayo, se evaluó el consorcio microbiano por triplicado. Los ensayos de fermentación se realizaron en una solución mineral y glicerol como única fuente de carbono.



Durante la primera hora de fermentación se observa un consumo en la concentración de glicerol de 7826 ppm y una disminución de los microorganismos de 0,8 Ulog₁₀. A partir de este tiempo, se ve un crecimiento que está directamente relacionado con la disminución previa del glicerol como única fuente de carbono. A las 5 horas de fermentación se evidencia un incremento relacionado con un consumo de glicerol de 10237 ppm.

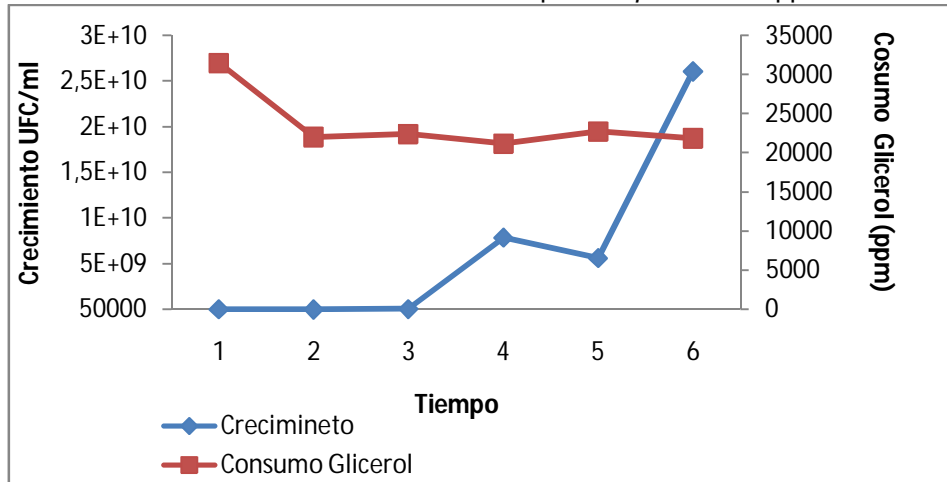
El análisis de cromatografía no detectó ninguno de los metabolito de interés (acido butírico, 1,3 – propanodiol, butanol y etanol) analizados que se escogieron de las rutas metabólicas de los microorganismos de referencias (Tabla 1) ver ANEXO D.

3.2.3 Consumo del sustrato durante la fermentación con *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus* spp.



La fase de adaptación para *Staphylococcus epidermidis* (3 h) fue mayor comparada con el consorcio microbiano. Esto indica que estos microorganismos no metabolizan fácilmente el glicerol como fuente de carbono. El consumo de glicerol fue de 9781 ppm.

Gráfica 5. Consumo de Glicerol por *Streptococcus* spp.



La fase de adaptación para *Streptococcus* spp. (2 h) fue mayor comparada con el consorcio microbiano. Esto indica que estos microorganismos no metabolizan fácilmente el glicerol como fuente de carbono. El consumo de glicerol fue de 9616 ppm.

En el proceso fermentativo aerobio que se llevo a cabo con las bacterias no se observó formación de metabolitos. Esto puede estar relacionado con el sistema de respiración (aerobio) o por las condiciones de operación (Temperatura y pH) que no eran las más adecuadas.

CONCLUSIONES

- A partir de dos muestras de glicerol crudo generado en dos empresas productoras de Biodiesel en Santander se identificaron especies microbianas como *Aspergillus fumigatus*, un consorcio microbiano, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus* spp. Estos microorganismos utilizaron el glicerol USP como fuente de carbono durante el proceso de fermentación.
- La especie fúngica, *Aspergillus Fumigatus*, utilizó el almidón como fuente de carbono en el proceso de fermentación generando 973 ppm de 1,3-propanodiol.

RECOMENDACIONES

Para la siguiente fase de la investigación, es necesario proponer un diseño de experimentos que permita evaluar durante el proceso, variables fisicoquímicas como temperatura y pH, que influyen en el crecimiento de un microorganismo.

Realizar un muestreo en el aceite de palma africana, con el propósito de aislar microorganismos que puedan fermentar el glicerol y así poder hacer una comparación de los factores que intervienen en los procesos metabólicos fermentativos, entre estos microorganismos y los ya aislados.

Buscar un método analítico que permita detectar todas otras sustancias que se hayan podido generar durante la fermentación.

Identificar la ruta metabólica de los microorganismos que favorecen la producción de biocombustibles de acuerdo a las condiciones desarrolladas en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] AQUIAHUATL M; Pérez M. Manual de prácticas. 1 ed. México: Universidad Autónoma Metropolitana, 2004. 29, 55p
- [2] CARRILLO Leonor. *Aspergillus* [Online]. En: Los hongos de los alimentos y forrajes. 1 ed. Argentina. Salta, 2003. 45, 46, 47 p
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/>
- [3] DEMIRBAS A. Glycerol-Based fuel oxygenates for Biodiesel and Diesel fuel Blends. Energy Soures, Part A: Recovery, Utilization and Environmental effects (2009). Vol 3 N°19. 1771p
- [4] DÍAZ, G. Comparación de la Producción de las Enzimas Exopectinasas de *Aspergillus Niger* Obtenidas por Fermentación Sólida y Sumergida. Tesis de Doctorado. Mexico D.F. UAM. 2001. 33, 35, 62 p
- [5] ERTOLA R. Yantorno O. & Mignone C. Microbiología Industrial: Medio de Fermentación [Online]. Biología UnalM [Citado 25 de Septiembre de 2007] Disponible en Internet:
<http://biounalm.blogspot.com/2007/09/libro-microbiologa-industrial-ebook.html>
- [6] GARCÍA A. Colom F. Jaramillo J. Manual del Auxiliar de Laboratorio: Temario General. 2° ed. MAD S.L. 2003. 471p
- [7] GADEN E. Fermentation Process Kinetics. En: Biochemical and Microbiological Technology an Engineering (1959). Vol 1 N° 4. 631, 632p

- [8] GUZMAN A. Hernández M. Jiménez D. Mendoza D. determinación y curva de crecimiento de microorganismos (*E. Coli* y levadura *Candida*). Practica de laboratorio. Chiapas: México. Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Microbiología. 2009.
- [9] JOHNSON D. Taconi K. The Glycerin Glut: options for the value-added conversion of crude Glycerol Resulting from Biodiesel production. (2007). Vol 26 N° 4. 342, 343p
- [10] MADIGAN M. Martinko J. Parker J. biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid. Prentice hall. 2004. 958-963 p
- [11] MANZANO M. plaza F. Reyes I. Desarrollo de tecnología para la producción de biodiesel. Trabajo de grado. México D.F: Universidad Autónoma Metropolitana. Ciencias Básicas En Ingeniería. Licenciatura en Ingeniería química (2004). 4,5 p
- [12] PAPANIKOLAOU S. Fick M. Aggelis G. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3 propanediol by *Clostridium butyricum*. En: J Chem Technol Biotechnol (2004). Vol 79. 1189, 1190,1191p.
- [13] PRACTICAS DE LABORATORIO: 2° curso (Lic. Biología). Departamento de Microbiología y Genética. España Universidad de Salamanca (2007). 7,8,9 y 29p <http://imb.usal.es/Practicas2/Practicas2.htm>
- [14] REHMAN A. wijesekara S. Nakao N. Seigo S. and Masatoshi M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3- propanediol production by *Clostridium butyricum*. En: J chem. Technol Biotechnol (2008). Vol 83. 1072, 1073p

- [15] RENNIE, R.J. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. En: Canadian Journal of Microbiology (1981). Vol 27, 8–14p.
- [16] SALINAS A. De Los Santos M. Soto O. Delgado E. Pérez H. Háuad L. Medrano H. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. En: Journal of Environmental Management (2008). Vol 88. 116p
- [17] SANABRIA J.; Acevedo D. Manual de microbiología: Curso de Microbiología Ambiental, Universidad del valle, 34-38, 79p.
- [18] SCHLEGEL, H. Zaborosch C. Microbiología General. 1 ed. Barcelona: Omega, 1997. 193,196 p
- [19] SILVA G. Mack M. Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: Biotechnology Advances (2009). Vol 27. 31, 32,33 p
- [20] TACONI K. Venkataramanan K. and Jonhson D. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC^R 6013TM utilizing Biodiesel – derived Crude Glycerol as the Sale Carbon Source. En: Environmental Progress & Sustainable Energy (2009). Vol 28 N°1. 101, 102 p
- [21] YAZDANI S, Gonzalez R. Anaerobic Fermentation of Glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry, Energy biotechnology (2007). Vol 18. 213,216p

[22] ZAPATA C. Martínez I. Arenas E. Henao C. Producción de biodiesel a partir de aceite crudo de palma: 1. Diseño y simulación de dos procesos continuos. En: Dyna (2007). Vol 4 N° 151. 71, 72 p

ANEXOS

ANEXO A: FICHA TÉCNICA DEL GLICEROL USP

Es un líquido incoloro, inodoro y viscoso, que se obtiene comercialmente a partir del propileno. También se puede obtener como subproducto de la hidrólisis de los ácidos grasos o a partir de procesos fermentativos.

USP: Producto que cumple las especificaciones de la farmacopea de los E.U.A (United States Pharmacopea).

Formula química: $C_3H_8O_3$ (CHOH – CH₂OH)

Sinónimos: Glicerina / 1,2,3 – propanotriol / 1,2,3 – trihidroxipropano

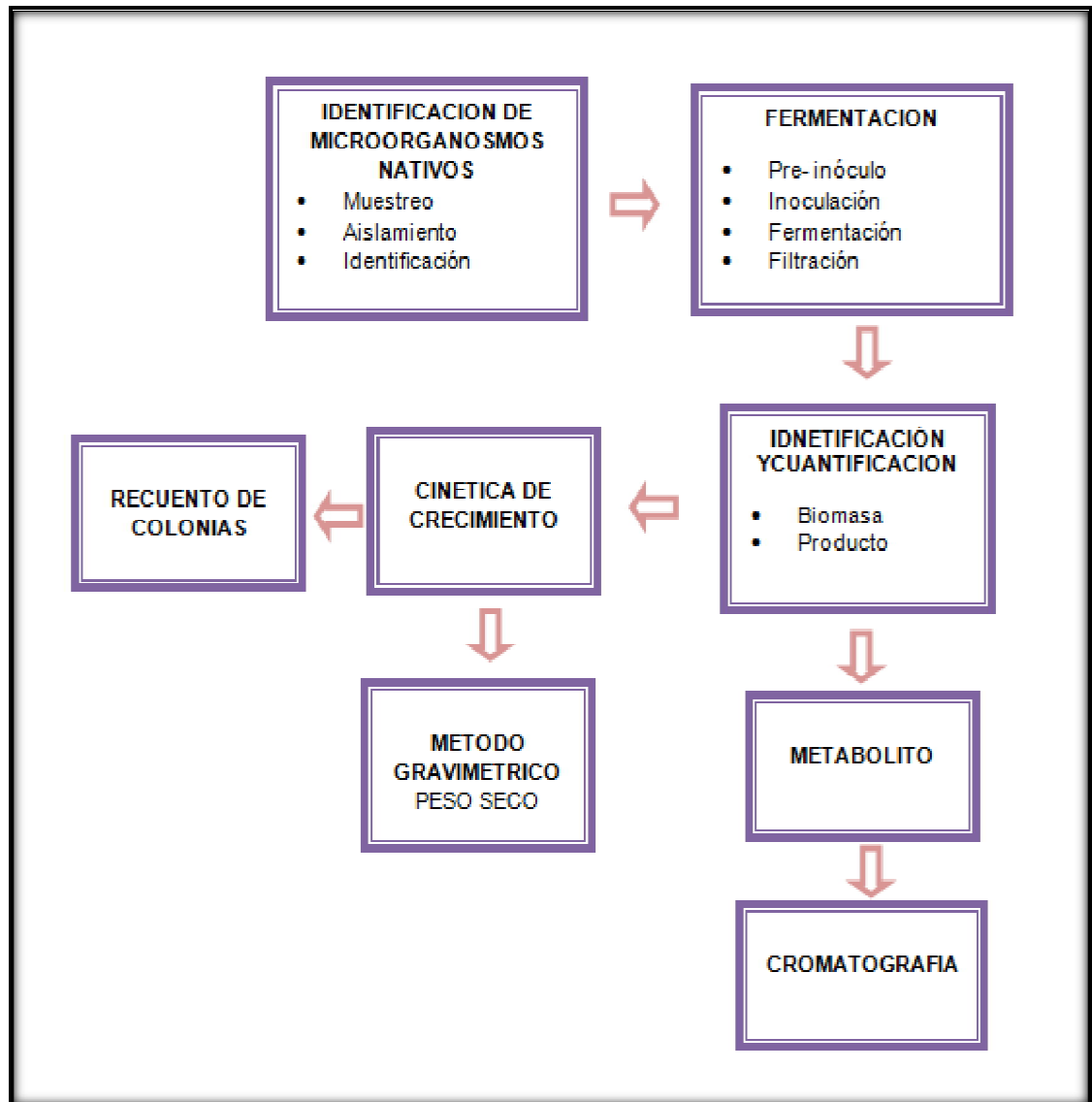
Tabla 4. Propiedades del Glicerol USP

PROPIEDADES	
Masa molecular	92.09 g/mol
Densidad relativa del vapor (aire = 1)	3.17
Densidad	1.26 g/ml
Viscosidad	1.5 Pa.s
Solubilidad	Miscible en agua
Presión de vapor	< 0.1 KPa a 20°C
Punto de inflamabilidad	22 ° C
Punto de Fusión	-128.8 °C
Punto de ebullición	96.6°C

Fuente: <http://www.ecosur.net/Sustancias%20Peligrosas/glicerol.html>

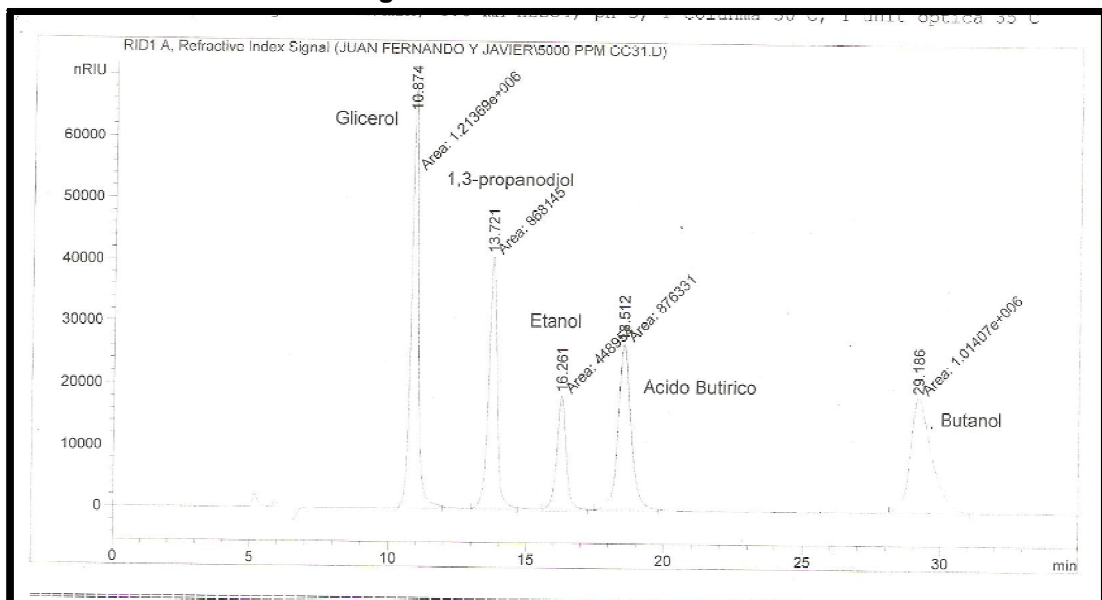
La sustancia se descompone al arder en contacto con superficies calientes o materiales oxidantes fuertes, bajo la influencia de sustancias higroscópicas, produciendo acroleína. Se debe evitar llama abierta.

ANEXO B: DIABRAMA DE METODOLOGIA DE IDENTIFICACIÓN

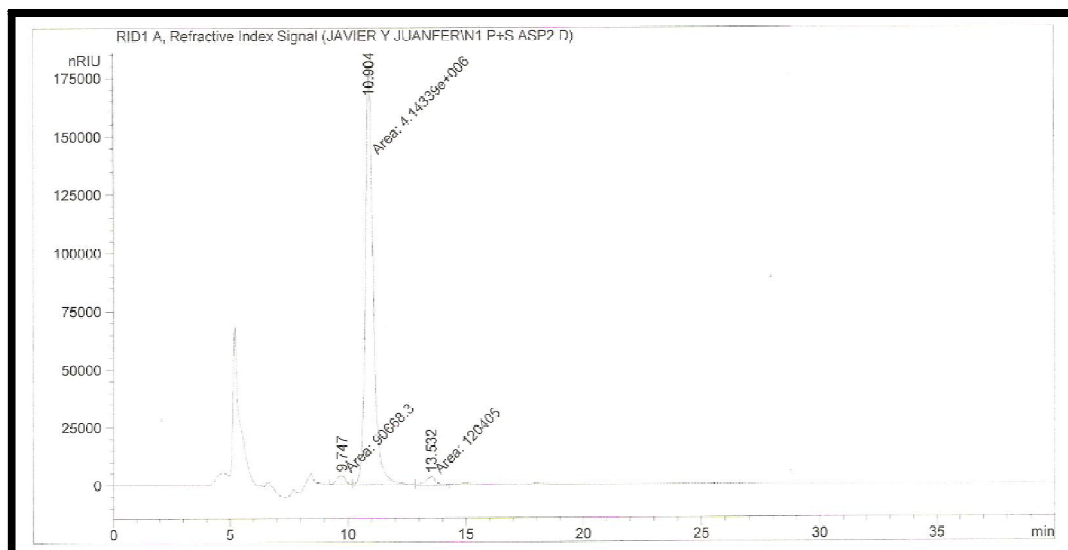


ANEXO C: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE METABOLITOS PRODUCTO DE LA FERMENTACIÓN

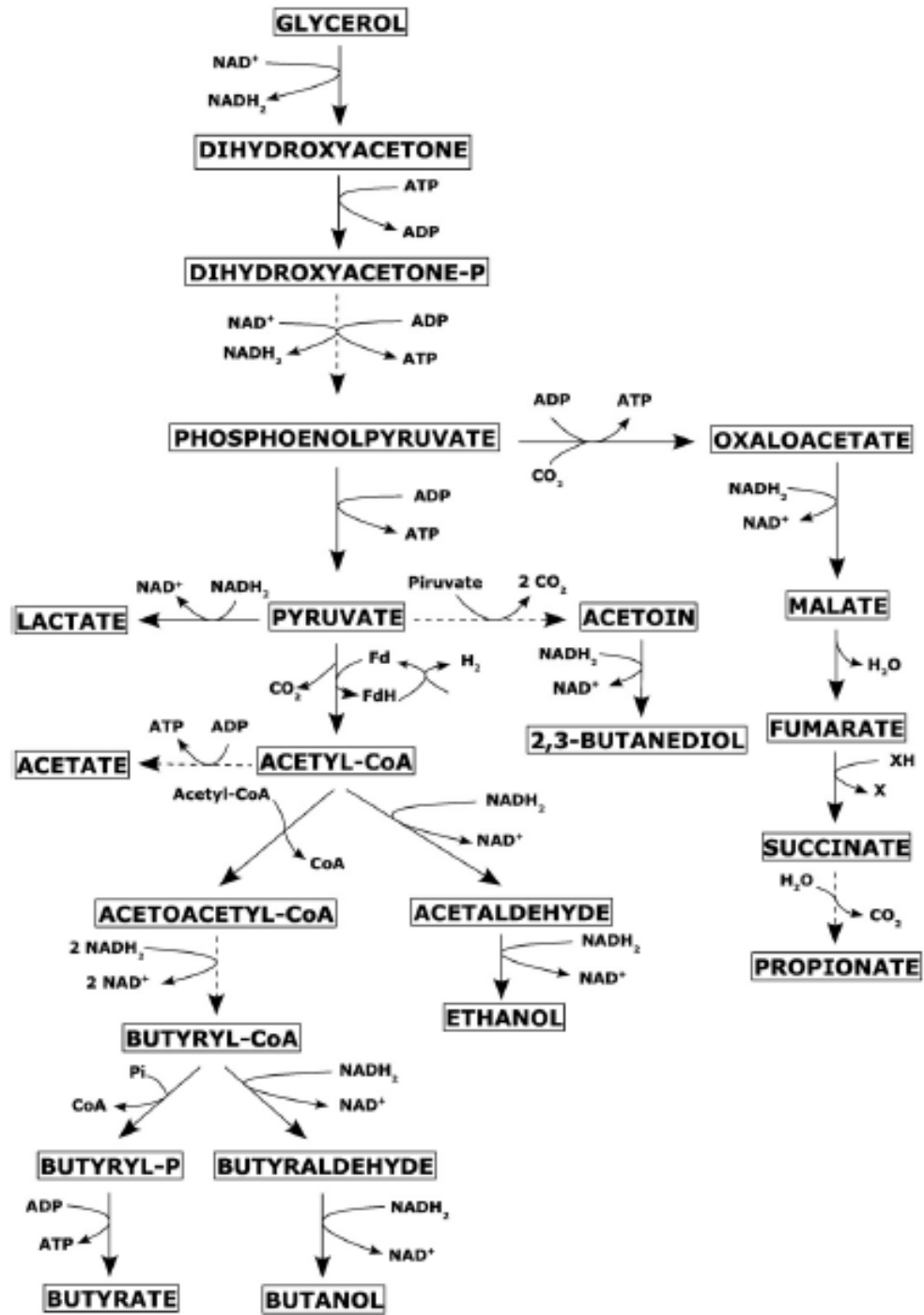
Cromatograma de las sustancias de referencia



Cromatograma de producción de 1,3- propanodiol



ANEXO D: RUTA METABÓLICA DE DIFERENTES MICROORGANISMOS EN LA DEGRADACIÓN DE GLICEROL



Fuente: Silva *et al*, 2009