

**CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA
FERMENTACION DE GLICEROL CRUDO CON MICROORGANISMOS
NATIVOS**

JAVIER RICARDO GÓMEZ RUEDA

JUAN FERNANDO CANCINO ORTIZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2011

**CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA
FERMENTACION DE GLICEROL CRUDO CON MICROORGANISMOS
NATIVOS**

JAVIER RICARDO GÓMEZ RUEDA
JUAN FERNANDO CANCINO ORTIZ

Trabajo de grado presentado para optar a título de Químico

Directoras

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA

Química, Ph. D.

CAROLINA GUZMÁN

Microbióloga Ambiental y Biotecnóloga, Ph. D

Codirectora

PAALO ANDREA MORENO YAÑEZ

Ing. Química, candidata a doctor en Ing. Química

CENTRO DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES AMBIENTALES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2011

Agradecimientos

A mis padres por haberme dado su apoyo, amor y comprensión durante toda mi carrera y mi familia por estar ahí con su cariño y dosis de sabiduría.

A las Doctoras Marianny Yajaira Combariza y Carolina Gusmán por los conocimientos impartidos su paciencia y disposición.
A mi adorada codirectora y desde siempre amiga por su preocupación y absoluta entrega.

A Javier mi compañero de batalla.

A mis queridos compañeros de laboratorio y de proyecto por su compañía y camaradería.

A mis amigos a quienes llevaré a todos lados, por compartir tantísimos momentos buenos y difíciles hasta el final.

Y nunca menos importante, a mi Julian.

Gracias a todos infinitamente por hacer de mis años de pregrado de los más dulces.

Juanfer

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carlos y Miriam por inculcarme principios y valores, darme apoyo y enseñarme lo importante de ser persistente para cumplir con cada objetivo trazado.

A mi amor Johana Suarez por su amor, apoyo inquebrantable y confianza.

A mis directoras Marianny y Carolina por brindarme la oportunidad de formarme como profesional y regalarme tantos conocimientos y experiencias de vida.

A mi codirectora Paolo Moreno por su amistad, orientación y fe en nosotros.

A mi amigo y compañero de proyecto Juan Cancino por su dedicación y apoyo.

También doy gracias a cada uno de los demás miembros del macroproyecto.

A mi familia y amigos que de alguna u otra manera contribuyeron en el éxito de este trabajo.

Javier Gomez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 Biodiesel	19
1.2 Glicerol	21
1.3 Transformación del glicerol crudo	23
1.4 Metabolitos	26
1.5 Metabolismo del glicerol	29
1.6 Microorganismos extraídos del glicerol crudo	31
1.7 Nutrientes de los microorganismos	33
1.8 Efectos ambientales en los microorganismos	35
1.8.1 Temperatura	35
1.8.2 pH	35
2. METODOLOGIA	37
2.1 Recolección de muestras	37
2.2 Caracterización fisicoquímica	37
2.2.1 pH	37
2.2.2 Densidad	37
2.2.3 Humedad	38
2.2.4 Jabones	38
2.3 Caracterización espectrométrica	40
2.3.1 Metales	40
2.3.1.1 Preparación curva de calibración para sodio y potasio	40
2.3.1.2 Preparación curva de calibración para calcio y magnesio	41
2.3.1.3 Preparación de las muestras	41
2.3.1.3.1 Determinación de cenizas	41
2.3.1.3.2 Digestión ácida de la muestra	41
2.3.1.4 Parámetros Instrumentales utilizados	42

2.3.1.5 Determinación de límites de detección y cuantificación	42
2.3.2 Caracterización cromatografía	43
2.3.2.1 Glicerol, metanol y etanol	43
2.3.2.2 Selección del glicerol crudo	44
2.3.2.3 Determinación de metabolitos	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
3.1 Recolección de muestras	46
3.2 Caracterización fisicoquímica	47
3.2.1 pH	47
3.2.2 Densidad	48
3.2.3 Humedad	48
3.2.4 Jabones	48
3.2.5 Cenizas	49
3.3 Caracterización espectrofotométrica	49
3.3.1 Metales	49
3.3.1.1 Sodio	49
3.3.1.2 Potasio	50
3.3.1.3 Magnesio	50
3.3.1.4 Calcio	51
3.4 Caracterización cromatográfica	51
3.4.1 Glicerol, metanol y etanol	52
3.5 Discusión de Resultados	52
3.6 Selección del glicerol crudo	56
3.7 Determinación de metabolitos	58
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACION	60
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de transesterificación (Modificada Van Gerpen, 2004)	19
Figura 2. Aplicaciones Industriales del glicerol	22
Figura 3. Ruta oxidativa y reductiva del glicerol	30
Figura 4. Ruta oxidativa del glicerol por <i>G. oxydans</i> .	31
Figura 5. Consumo de glicerol por <i>Bacillus circulans</i>	32
Figura 6. Fotografía <i>Bacillus circulans</i> 1000x	33
Figura 7. pHmetro Hanna Instruments pH 211	37
Figura 8. Montaje determinación volumétrica de jabones.	38
Figura 9. Espectrómetro de absorción atómica (THERMO ELECTRON modelo S4)	40
Figura 10. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, (Agilent Technologies serie 1100) y detector de índice de refracción (Agilent Technologies 1200)	44
Figura 11. Toma de muestra de glicerol crudo	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de biodiesel de Colombia	21
Tabla 2. Composiciones de glicerol crudo en otros países	25
Tabla 3. Composición de los metales en el glicerol crudo de otros países	25
Tabla 4. Función de metales en microorganismos	34
Tabla 5. Parámetros espectrométricos	42
Tabla 6. Parámetros de llama	42
Tabla 7. Descripción organoléptica de las muestras de glicerol crudo.	46
Tabla 8. pH de las muestras de glicerol crudo	47
Tabla 9. Densidad de las muestras de glicerol crudo	48
Tabla 10. Humedad de las muestras de glicerol crudo	48
Tabla 11. Concentración de jabones de las muestras de glicerol crudo	48
Tabla 12. Porcentaje de cenizas de las muestras de glicerol crudo	49
Tabla 13. Concentración de sodio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)	49
Tabla 14. Concentración de potasio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)	50
Tabla 15. Concentración de magnesio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)	50
Tabla 16. Concentración de calcio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)	51
Tabla 17. Concentración de glicerol en las muestras de glicerol crudo (% p/p)	52
Tabla 18. Concentración de metanol en las muestras de glicerol crudo (% p/p)	52
Tabla 19. Composición general de las muestras de glicerol crudo	53
Tabla 20. Composición elemental de las muestras de glicerol crudo	53
Tabla 21. Composición general de la muestras de glicerol crudo C3	57
Tabla 22. Composición elemental de la muestra de glicerol crudo C3	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	69
Anexo 2	70
Anexo 3	71

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA FERMENTACION DE GLICEROL CRUDO CON MICROORGANISMOS NATIVOS.*

AUTORES: JUAN FERNANDO CANCINO ORTIZ; JAVIER RICARDO GÓMEZ RUEDA*

PALABRAS CLAVES: Caracterización, glicerol crudo, biodiesel, fermentación, microorganismos nativos, *Bacillus circulans*.

DESCRIPCIÓN

El glicerol ha sido históricamente un compuesto ampliamente utilizado por varias industrias en la síntesis y elaboración de una amplia gama de productos. Actualmente la gran producción que ha experimentado el biodiesel ha generado un superávit de glicerol crudo cuya composición dificulta su comercialización. Debido a su abundancia y costosa refinación ha causado la caída de sus precios en los mercados mundiales, siendo este catalogado como residuo industrial. Su mal manejo y disposición, se ha convertido en un tema de importancia ambiental. Como una alternativa a su utilización se ha planteado su conversión microbiológica con el fin de obtener productos de mayor valor agregado.

Este es el primer trabajo donde fueron recolectadas muestras de glicerol crudo de plantas nacionales de biodiesel. A estas muestras se les determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas y se cuantificaron sus componentes mas significativos tales como: glicerol y metanol por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de índice de refracción, cenizas mediante calcinación, jabones utilizando titulación colorimétrica, humedad por volumetría Karl Fischer y algunos metales de importancia biológica (Na, K, Ca y Mg) a partir de espectrofotometrías de emisión y absorción atómica por llama. Dicha caracterización permitió al equipo de microbiología la selección de la muestra más apta para su posterior fermentación con microorganismos nativos. Los productos de estos ensayos fueron leídos por Cromatografía líquida de Alta Eficiencia usando un detector de Índice de Refracción.¹

*Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directoras: Marianny Yajaira Combariza Ph. D, Carolina Gusmán Ph. D. Codirectora: Paolo Moreno Ing. Química.

ABSTRACT

TITLE: CHARACTERIZATION OF FERMENTATION PRODUCTS OBTAINED FROM RAW GLYCEROL WITH NATIVE MICROORGANISMS.*

AUTHOR: JUAN FERNANDO CANCINO ORTIZ; JAVIER RICARDO GÓMEZ RUEDA. **

KEYWORDS: Characterization, raw glycerol, biodiesel, fermentation, native microorganisms, *Bacillus circulans*

Description:

Historically glycerol has been a broadly used compound by lots of industries on the synthesis and elaboration of a wide products spectra. Nowadays the production of biodiesel is generating a raw glycerol surplus which composition difficults its commercialization. Due to its abundance and its refination's high costs, it has been recognized as an industrial waste. The bad handling and disposal of raw glycerol it's becoming an issue of environmental importance. As an utilization alternative, microbiological conversion has been suggested to obtain added value products. This is the first work where national biodiesel samples of raw glycerol were collected. These samples were characterized determining some of their physical-chemical properties and quantifying their more significant components: Glycerol and methanol by High Performance Liquid Chromatography coupled with a Refractive Index Detector (HPLC- RID), ashes by sample calcination, soaps using colorimetric titration, moisture by Karl Fischer volumetric titration and some metals of biological matter (Na, K, Mg & Ca) with Flame Atomic Emission and Absorption (FAAS & FAES). This Characterization allows microbiology work team to pick the most appropriate sample for fermentation with native microorganisms. The fermentation products were analyzed using HPLC-RID.

* grade work

** Science Faculty. Chemistry School. Directoras: Marianny Yajaira Combariza Ph. D, Carolina Gusmán Ph. D. Codirectora: Paolo Moreno Ing. Química.

INTRODUCCIÓN

El transporte de bienes y servicios es imprescindible para el desarrollo de todas las civilizaciones. La tracción animal y la fuerza de los elementos (energía hídrica, energía eólica y la combustión) permitieron a la humanidad solventar este aspecto. El descubrimiento de los combustibles fósiles llevó al auge a muchas naciones, impulsando sus economías y su grado de tecnificación. Sin embargo, existen dos grandes problemáticas asociadas al uso de combustibles fósiles: su disponibilidad cada vez más limitada y su creciente impacto negativo en el medio ambiente. El surgimiento de los biocombustibles se presenta como una solución alternativa a estos problemas. Considerando la gran variedad de fuentes renovables disponibles para su producción, los biocombustibles, que a diferencia de los combustibles fósiles generan un menor grado de polución, se convierten en una opción rentable y ambientalmente amigable.

El biodiesel se obtiene a partir de la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales [1]. Su manufactura se ha incrementado alrededor del mundo como una opción para disminuir el uso de los combustibles fósiles, sin embargo, su producción genera un 10% (w/w) de glicerol crudo como subproducto [2]. El enorme crecimiento en la producción de este biocombustible ha creado un superávit de glicerol crudo, que a su vez ha provocado una caída dramática de los precios. Sin procesos económicos para su purificación, y/o transformación, el exceso de glicerol indujo al cierre de las plantas productoras y refinadoras de glicerina de Dow Chemicals y Procter & Gamble [3].

La gran cantidad de glicerol crudo generado a partir de la producción del biodiesel podría suplir las demandas globales de glicerina [2], que es ampliamente utilizada en la industria. Sin embargo la utilización del glicerol crudo esta asociada a procesos costosos de refinación, que amenazan la viabilidad económica de las plantas productoras de biodiesel [4,5]. Esta situación no solo ha ocasionado un

problema económico para las plantas de biodiesel sino también ambiental ya que en muchos casos el glicerol crudo ha sido vertido en cuerpos de agua [6].

Colombia es uno de los principales productores de biodiesel en Latinoamérica [7], por consiguiente sus plantas eventualmente están expuestas al problema del exceso de glicerol. Por esta razón es necesario que el país realice investigación y desarrollo en procesos que permitan transformar el glicerol crudo en productos de mayor valor agregado.

Los procesos de transformación del glicerol se pueden dividir en dos: químicos y biológicos. En los primeros se utilizan reacciones químicas y catalizadores para producir sustancias derivadas del glicerol. Esta aproximación, requiere condiciones de reacción drásticas y costosas desde el punto de vista energético. Por otra parte los procesos biológicos basados en el uso de microorganismos, aunque requieren mucha investigación eventualmente culminan con procesos más amigables ambientalmente y menos drásticos en relación con el consumo energético.

La capacidad de los microorganismos para aprovechar el glicerol crudo como una fuente de carbono depende de la composición del subproducto, ya que algunos de sus compuestos pueden actuar como inhibidores o nutrientes. En este proyecto de investigación se determinó la composición de glicerol crudo proveniente de varias plantas de producción de biodiesel utilizando técnicas analíticas volumétricas e instrumentales. Adicionalmente, se realizó la caracterización de los metabolitos producidos en los ensayos iniciales de fermentación con microorganismos nativos. Finalmente, este trabajo hace parte del macroproyecto “BÚSQUEDA DE CEPAS NATIVAS PARA PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL CRUDO PROVENIENTE DEL BIODIESEL DE PALMA AFRICANA ORIENTADO A LA OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE MAYOR VALOR AGREGADO” que se

realiza en el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) y es financiado por la Gobernación de Santander y NEOMUNDO.

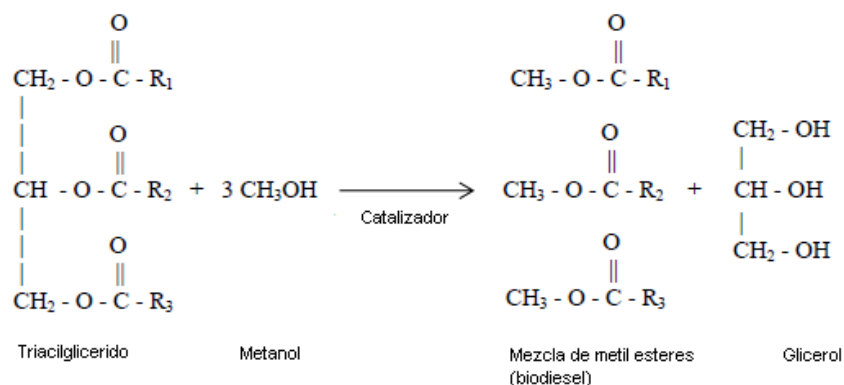
1. MARCO TEÓRICO

El aumento de los precios en los combustibles fósiles en las dos últimas décadas ha incentivado la producción de los biocombustibles. Dentro del amplio espectro de posibilidades el biodiesel se destaca por que puede usarse puro o en mezclas con diesel sin modificar el motor del vehículo, adicionalmente su uso reduce las emisiones de contaminantes [8].

1.1. Biodiesel

El biodiesel se define según la ASTM (American Society for Testing and Materials) como una mezcla de ésteres monoalquílicos de cadena larga de ácidos grasos derivados de glicéridos naturales [6]. Su producción es la mejor alternativa en cuanto a biocombustibles ya que puede competir con su equivalente del petróleo. Las fuentes más usadas para la producción de biodiesel son los aceites de soya, canola, palma, palmiste, maní, girasol, algodón y maíz, también se obtiene a partir de grasas animales y desechos de frituras [8]. Típicamente el biodiesel se obtiene por reacciones de transesterificación de los glicéridos de los aceites vegetales o las grasas animales con metanol o etanol por medio de catálisis ácida o alcalina (Figura 1).

Figura 1. Reacción de transesterificación [8]



Cuando se utilizan los biocombustibles las emisiones asociadas con dióxido de azufre disminuyen en un 100%, las de monóxido de carbono en 48% y las de material particulado en, 47% [9], consecuentemente la utilización del biodiesel conlleva a una reducción de compuestos que originan la formación del *smog* fotoquímico, la lluvia ácida y la mortalidad por inhalación de contaminantes [10].

La disponibilidad de las materias primas que se utilizan en la generación de biodiesel, su rentabilidad económica y la evidente reducción de los niveles de polución del aire, han promovido en algunos países que desean prescindir de los combustibles fósiles, leyes que propician el desarrollo de la industria de este biocombustible. La Unión Europea (UE) es líder en la producción mundial del biodiesel con más del 24.4%, llegando a generar hasta 20 mil millones de litros en el 2010 [11].

En Colombia la producción de biodiesel se ha incrementado en los últimos años con la creación de plantas en el territorio nacional (Tabla 1). Considerando que Colombia es el cuarto productor mundial de aceite de palma, en el país se han puesto en marcha políticas que incentivan la producción de biodiesel a partir de esta materia prima. Con la entrada en rigor del B10 (10% de biodiesel, 90% de diesel) en toda la nación salvo en la capital, en donde se aplica el 7%, la demanda del biodiesel en Colombia ha aumentado [12]. Actualmente Colombia es el tercer productor de biodiesel en América Latina y el Caribe [11].

Tabla 1. Plantas de biodiesel de Colombia [12] visitado 24 de octubre 2011

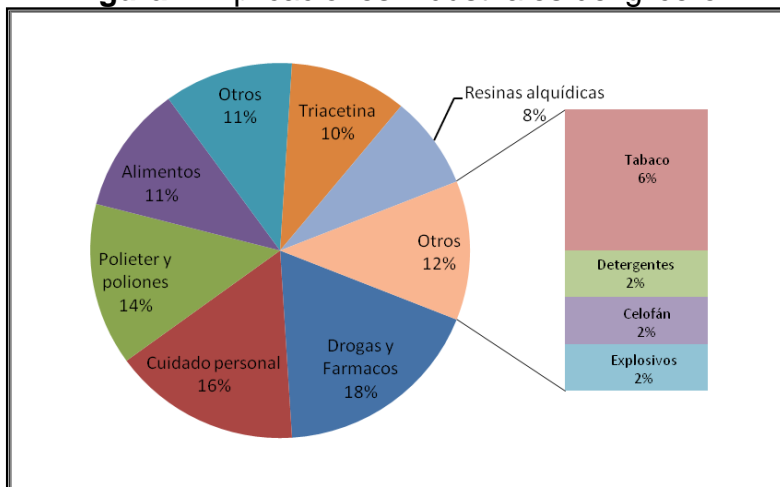
Empresa	Fecha de entrada en operación	Región	Capacidad ton/año
Oleoflores	Enero 2008	Codazzi, Cesar	70.000
Odin energy	Junio 2008	Santa Marta, Magdalena	36.000
Biocombustibles Sostenibles del Caribe	Marzo 2009	Santa Marta, Magdalena	100.000
BioD	Febrero 2009	Facatativá, Cundinamarca	100.000
Ecodiesel de Colombia	Junio 2010	Barrancabermeja, Santander	100.000
Aceites Manuelita	Julio 2009	San Carlos de Guaroa, Meta	100.000
TOTAL			506.000

1.2. Glicerol

Tradicionalmente el glicerol se obtenía como subproducto de la saponificación de las grasas en la industria oleoquímica. A principios del siglo XX, con el desarrollo de la industria petroquímica, se empezó a sintetizar a partir de la hidroxilación del propileno. En la actualidad, con el auge en la producción de biodiesel, el mercado está saturado de glicerol crudo. El glicerol tiene una amplia gama de aplicaciones industriales (Figura 2) como humectante, plastificante, emoliente, espesante, disolvente, medio de dispersión, lubricante, edulcorante y anticongelante, también es utilizado como aditivo o material crudo en las industrias farmacéutica y cosmética, adicionalmente es usado en la industria de explosivos [13, 14].

Aunque el glicerol tiene un amplio espectro de aplicaciones, todos los procesos que lo utilizan solo pueden admitir cierta cantidad y no pueden absorber por completo el superávit provocado por la producción de biodiesel [2].

Figura 2. Aplicaciones Industriales del glicerol



[14]

El acelerado crecimiento de la industria del biodiesel, ha traído consigo una alta acumulación de excedentes de glicerol crudo. La sobreproducción de glicerol ha ocasionado una caída vertiginosa de sus precios, a US\$0.05/lb, en los mercados mundiales durante los últimos años [2, 15]. El glicerol crudo por su abundancia ha sido incluso catalogado como residuo siendo almacenado en bidones, desechado en vertederos [16] y en cuerpos de agua [6] convirtiéndose así en un problema ambiental.

En la síntesis del biodiesel se producen otros subproductos que dependen del tipo de aceite o grasa y el proceso de producción (Tabla 2 y Tabla 3). En el proceso tradicional de transesterificación se utiliza exceso de metanol, el cual termina asociado a la fracción polar de la reacción y se mezcla con el glicerol crudo. El contenido de cenizas del glicerol crudo es variable y están compuestas por lo general por sales inorgánicas precipitadas de los metales contenidos en el aceite y los provenientes del catalizador (sodio y potasio) [4]. Los ácidos grasos libres

presentes en el glicerol crudo provienen del aceite, y se producen por la hidrólisis de los triglicéridos. Los jabones que se encuentran en el glicerol crudo son producto de la saponificación de los ácidos grasos libres del aceite (Anexo 1). La reacción de saponificación compite con la de transesterificación [15]. El contenido de agua del glicerol crudo se debe al carácter higroscópico del catalizador y el alcohol que se usan para la formación de metóxido de sodio, ya que estos toman la humedad de los alrededores [8].

Como consecuencia de la gran abundancia de glicerol crudo, se han propuesto múltiples usos. Entre ellos está utilizarlo como fuente de energía para alimentación de cerdos y aves de corral. En los trabajos de Handsen y colaboradores se esperaba que al ser incluido en las dietas de porcinos, se podría mejorar su nutrición, pese a que no se confirmó la hipótesis, el estudio concluyó que el glicerol crudo puede introducirse en la alimentación de los cerdos sin llegar a afectar sus carnes ni a los consumidores [14, 17].

1.3. Transformación del glicerol crudo

La alta producción del biodiesel a nivel mundial ha generado un superávit de glicerol crudo que se traduce en la baja del precio y la aparición de problemas ambientales relacionados con su incorrecta disposición. La necesidad de cambiar esta realidad lleva a la investigación de alternativas que permiten transformar el glicerol crudo en productos de mayor valor agregado, con menor impacto ambiental y con la capacidad de sustituir los productos derivados del petróleo [18, 2].

En general hay dos tipos de procesos para la transformación del glicerol: su oxidación o reducción a compuestos alternativos de tres carbonos o su reacción con otras moléculas para formar nuevas especies. Las transformaciones químicas y microbiológicas están basadas en éste tipo de procesos [2].

Las transformaciones químicas se llevan a cabo utilizando como catalizadores metales de coordinación o sus óxidos, que logran la transformación del glicerol crudo con altos rendimientos a expensas de grandes costos operacionales y problemas de adaptación de procesos a las plantas de biodiesel. Por otra parte, aunque los procesos microbiológicos presentan bajos rendimientos de transformación, no tienen los inconvenientes de los procesos químicos y generan productos de mayor valor agregado [2].

La fermentación microbiológica del glicerol crudo es bastante atractiva económicamente debido a su bajo costo de operación y de materia prima, adicionalmente los productos que se obtienen a partir de estos procesos son atractivos en el mercado lo cual hace de esta opción un proceso industrial viable [1].

Tabla 2. Composiciones de glicerol crudo en otros países [15, 16, 19, 20, 22]

País		Japón	Korea del Sur	Tailandia		Malasia	Polonia	
Materia prima		Girasol	Soya	Residuos de Aceite Vegetal		Palmiste	Colza	
pH		12,5	-	-	9,08	12,8	-	-
Glicerol (%)		30	75,56	63,70	36,70	20,20	76,00	65,00
Humedad (%)		2	12,60	0,07	14,70	3,00	19,50	26,00
Cenizas (%)		3	3,93	2,27	4,31	64,30	4,00	5,00
MONG (%)	Metanol (%)	50	0,20	2,66	44,00	12,40	0,10	3,00
	Jabones (%)	13	7,71	31,30			0,80	1,00
	OMO	2						

Tabla 3. Composición de los metales en el glicerol crudo de otros países. [4, 5, 15, 20, 22]

RU: Reino Unido; Ida Gold: Mostaza blanca (*Sinapis alba L.*); Pac Gold: Mostaza india (*B. Juncea L.*); Crambe: plantas pertenecientes a la familia de las *Brassicaceae*; WVO: Waste Vegetable Oil; RVO: Recovered Vegetable Oil;

Países		Estados Unidos							RU	Corea del Sur		Tailandia
Materia Prima		IdaGold	PacGold	Colza	Canola	Soya	Crambe	WVO	RVO	Soya	WVO	WVO
Elementos (mg/kg)	Sodio	11700	12300	10600	10700	12000	11000	14000	21400	12743	7357.9	11700
	Potasio	-	-	-	-	-	216.7	-	800	242	49.8	-
	Magnesio	3.9	6.6	4.0	5.4	6.8	126.7	0.4	200	101.8	2.3	3.9
	Calcio	11.7	23.0	24.0	19.5	11.0	163.3	-	400	-	-	11.7

MONG: Material Orgánica No Glicerol.

1.4. Metabolitos

Especies como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* y *Lactobacillus reuteri*, entre otras, pueden utilizar el glicerol, bajo condiciones apropiadas, como única fuente de carbono [1]. Mediante procesos de transformación microbiana con estos microorganismos se puede obtener una gran variedad de productos (Anexo 2). El 1.3-propanodiol, por ejemplo, tiene aplicaciones interesantes relacionadas con la síntesis de compuestos cíclicos. Siendo un poliglicol puede usarse como un sustituto de los glicoles tradicionales en la producción de poliésteres, poliuretanos y polieteres biodegradables, así como un aditivo en anticongelantes, solventes, adhesivos, *composites*, laminados, colorantes, detergentes y otros productos [1, 2].

El politrimetil tereftalato (PTT), principal compuesto que se genera a partir del 1.3-propanodiol, es un termoplástico biodegradable con la capacidad de formación de fibras e hilos con los que se pueden elaborar textiles y alfombras. Para que el PTT pueda remplazar completamente al polietileno (PET), es necesario que el 1.3-propanodiol se produzca en cantidades superiores a 11250 millones de libras [2, 23].

La dihidroxiacetona es otro de los metabolitos cuya obtención es más viable económicamente por vía microbiológica que por métodos químicos. Se utiliza a menudo en la industria cosmética y también como reactivo base para muchas síntesis orgánicas. Esta sustancia es producida por *Gluconobacter oxydans* en un proceso aeróbico y en un medio semisintético con extracto de levadura. Uno de los principales problemas de este proceso es que tanto el glicerol como la hidroxiacetona inhiben el crecimiento del microorganismo. Para solventar este inconveniente se ha propuesto un modo de producción repetido “*fed-batch*”, con el

que se puede mantener varios meses la producción sin disminuir la productividad de dihidroxiacetona, incluso logrando incrementarla hasta un 75% [1].

El ácido succínico es uno de los metabolitos que tiene mayores ventajas cuando se produce a partir de glicerol en comparación con su producción a partir de glucosa. Los mayores rendimientos de éste ácido se han observado utilizando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* en condiciones de baja acidez. Pese a ello, el costo de separación del ácido succínico de los demás componentes del medio de fermentación hace poco rentable su obtención microbiológica. La optimización de este proceso y los avances en la ingeniería metabólica permitirían la utilización a escala del ácido succínico para la producción de fármacos, detergentes, surfactantes, solventes ambientalmente amigables y plásticos biodegradables. Actualmente el ácido succínico obtenido por vía fermentativa es únicamente comercializado para la industria alimentaria [1].

El ácido cítrico es uno de los ácidos orgánicos más importantes producidos por procesos fermentativos con *Aspergillus niger*. La producción de ácido cítrico a nivel global alcanza 1.4 millones de toneladas anuales y su demanda y consumo se mantienen de manera creciente. Este metabolito se valora en US\$1.3 por kilogramo, y se produce industrialmente a partir de melaza, glucosa y sacarosa. Se utiliza ampliamente en las industrias farmacéutica, química y alimenticia. Debido a sus propiedades se usa como agente acidificador, preservante, de ajuste de pH y antioxidante. También se usa como aditivo en cosméticos, preservantes y artículos de tocador [24]. En los estudios de Papanikolaou y colaboradores, se comparó la eficiencia de *Yarrowia lipolytica* para transformar el glicerol crudo y la glucosa en ácido cítrico, y se obtuvieron resultados satisfactorios en la fermentación con altas concentraciones de glicerol [25].

El etanol es ampliamente producido mediante vías microbiológicas a partir de la caña de azúcar, almidón de maíz y la remolacha azucarera. En diversas

investigaciones se observó la obtención de etanol a partir de glicerol mediante el uso de *Klebsiella planticola* aislada del estómago del ciervo.

E. coli, bajo condiciones definidas de pH y en presencia de dióxido de carbono, puede metabolizar el glicerol a etanol mediante la oxidación de formato por la enzima formiatohidrógenoliasa, con un 93% de productos entre etanol (86%) y ácido succínico (7%) en una fermentación de 84h. *E. aerogenes* se utilizó para transformar desechos de biodiesel con un alto contenido de glicerol, produciéndose H₂ y etanol, no obstante al aumentar la concentración de sustrato a 25g/L, se inhibió la producción de H₂ y se obtuvieron menores cantidades de Etanol [2, 3].

La incursión de los polihidroxicanoatos (PHAs) en el mercado podría desplazar la utilización de polímeros derivados del petróleo, tales como el polietileno y el polipropileno. Estos biopolímeros presentan propiedades termoplásticas y elastoméricas, son insolubles en agua, poseen alto grado de polimerización, no son tóxicos, son biocompatibles y biodegradables [9].

Los PHAs se pueden sintetizar *In vivo* a partir de fermentación con microorganismos y a través de plantas modificadas genéticamente ya que los PHAs existen en las células como inclusiones citoplasmáticas ocupando un 90% del peso seco celular, actuando como reserva de carbono. La generación de PHAs se da bajo condiciones nutricionales de estrés mediante la restricción de nitrógeno, fósforo u oxígeno y exceso de una fuente de carbono [9].

Se han encontrado más de 100 especies de microorganismos nativos capaces de sintetizar PHAs, entre los que se destacan *P. oleovorans* por tomar el glicerol de los desechos del biodiesel para la generación de polihidroxibutirato (PHB), así como *P. corrugata* bajo iguales condiciones de fermentación permite la obtención de PHAs de cadena media. Esta particularidad en los parámetros de cultivo

permite combinaciones de dichas *Pseudomonas* para la formación de PHAs variando las proporciones de las mezclas de polímeros [9, 26].

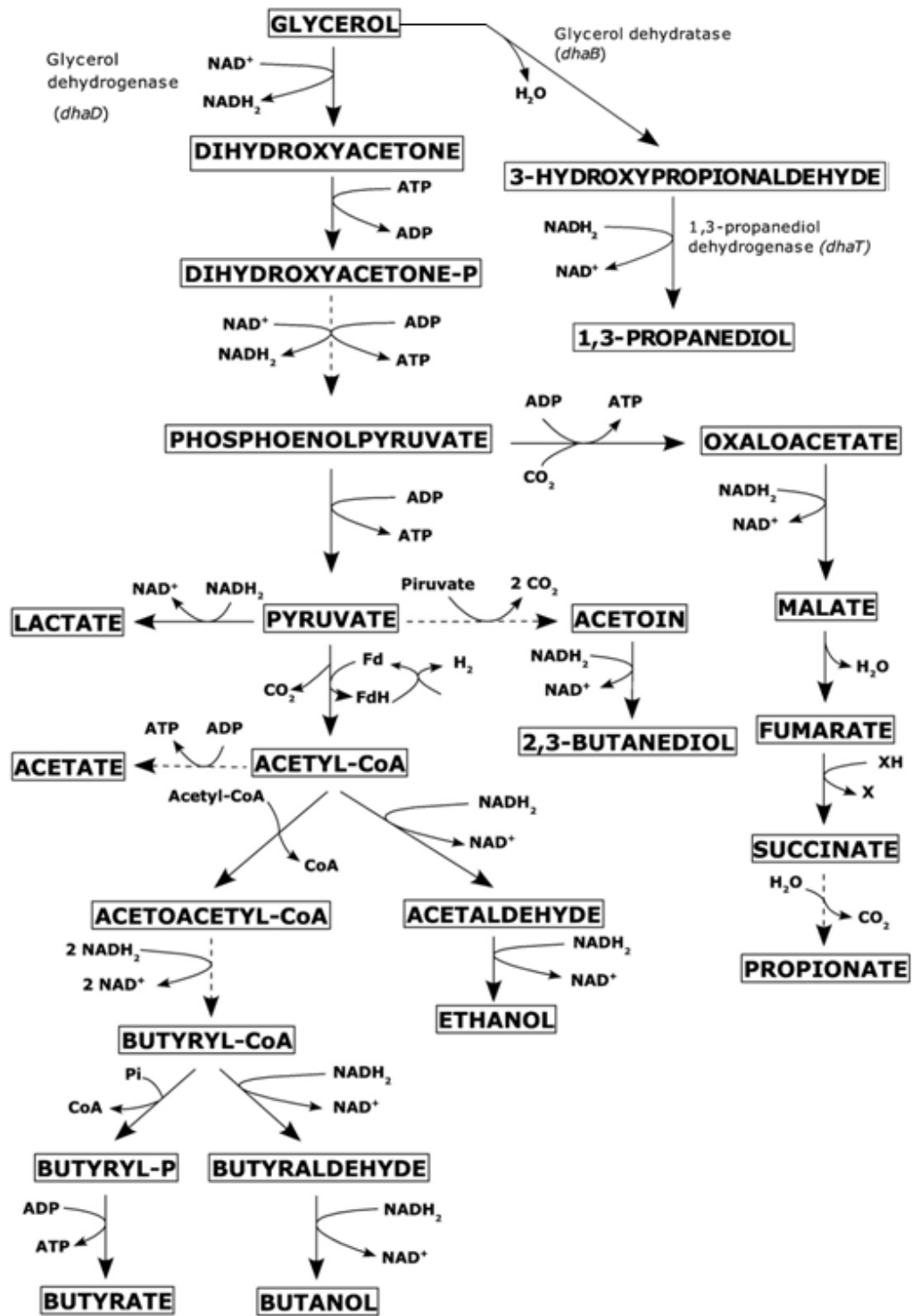
1.5. Metabolismo del glicerol

El estudio de las rutas metabólicas permite a los investigadores dirigir su atención hacia los microorganismos y la amplia gama de posibilidades que estos ofrecen en los procesos de biosíntesis y biodegradación, desde el uso de cepas de colección y microorganismos nativos hasta la utilización de cepas que se desarrollan para fines específicos.

Muchos microorganismos pueden metabolizar el glicerol por vías tanto oxidativas como reductivas. La vía oxidativa del glicerol comienza con su deshidrogenación por acción de la enzima gliceroldeshidrogenasa (dhaD) convirtiéndolo en dihidroxiacetona, la cual se cataliza posteriormente por acción de la enzima dihidroxiacetona kinasa (dhaK) que en *S. cerevisiae* y otros microorganismos puede ser usada como precursor para la biosíntesis de lípidos o en la formación de dihidroxiacetona-fosfato (Figura 3) que se canaliza hacia la ruta de la glicolisis en donde algunos microorganismos como los pertenecientes al género *Clostridium* lo utilizan como sustrato en la síntesis de metabolitos como lactato, acetato, butirato, etanol y butanol (Ilustración 2) [1, 2].

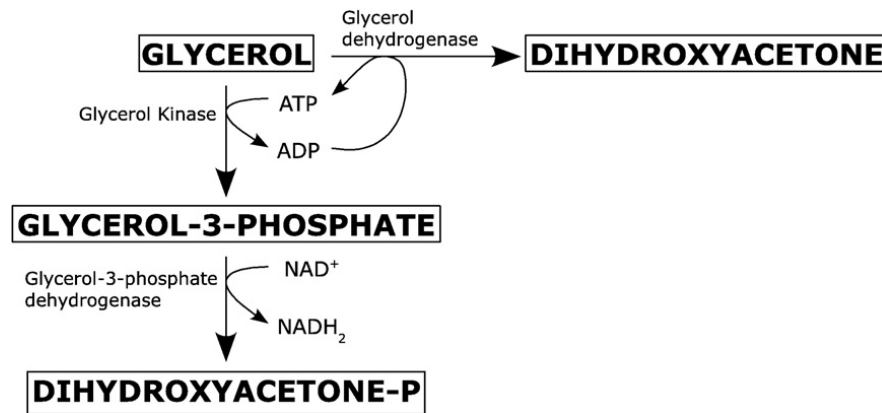
Especies tales como *K. pneumoniae*, *G. oxidans* y *C. acetobutylicum* son microorganismos facultativos que presentan rutas oxidativas del glicerol similares. En ellas se observó que la degradación anaeróbica del glicerol depende de la ruta del glicerol-3-fosfato, mientras que su degradación aeróbica se origina por la vía metabólica de la dihidroxiacetona (Figura 4) [1].

Figura 3. Ruta oxidativa y reductiva del glicerol



Modificado de [1]

Figura 4. Ruta oxidativa del glicerol por *G. oxydans*.



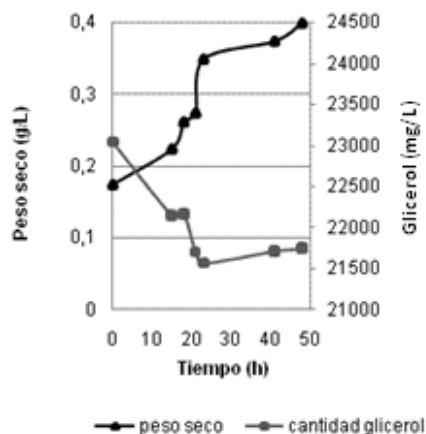
[1]

En la mayoría de microorganismos la vía reductiva del glicerol depende de la coenzima vitamina B₁₂, permitiendo la acción de la glicerol deshidratasa en la conversión del glicerol a 3-hidroxi propionaldehído y luego su transformación en 1,3-propanodiol mediante la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa la cual es dependiente del NADH₂. Por otra parte, algunos microorganismos del género *Clostridium* y *K. pneumoniae* no dependen de la vitamina B₁₂ para producir 1,3-propanodiol por vía reductiva a partir de glicerol [1, 2, 27].

1.6. Microorganismos extraídos del glicerol crudo

En el estudio de microorganismos que pueden transformar el glicerol crudo en otros compuestos, el equipo de microbiología logró aislar tres microorganismos de este producto industrial: *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus circulans* y un consorcio bacteriano, siendo entre estos *Bacillus circulans* el único que mostró una relación directa entre consumo de glicerol crudo y crecimiento celular (Figura 5), tolerando concentraciones hasta de 80g/L de glicerol USP y crudo [28].

Figura 5. Consumo de glicerol por *Bacillus circulans*

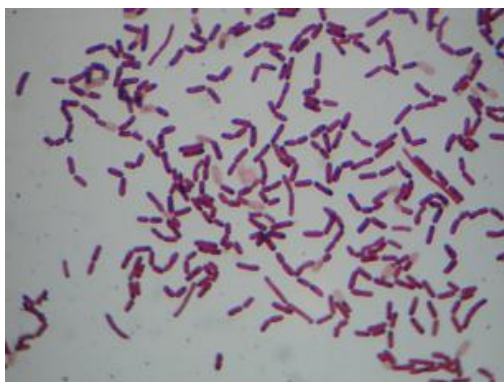


[28]

Bacillus circulans es una bacteria aerobia facultativa de la familia *Bacillaceae*, que se presenta microscópicamente como bacilos móviles gram-positivos, formando cadenas cortas con presencia de endosporas en forma de barra (Figura 6). En placas de agar nutritivo y de sangre, sus colonias presentan forma circular y consistencia cremosa [28, 29].

Varias cepas de *Bacillus circulans* son utilizadas como productoras de enzimas, las cuales encuentran aplicaciones específicas como agentes antifúngicos [30], o generadores de enzimas como las amilasas [31]. En algunos estudios el glicerol se utilizó como fuente de carbono y energía para *B. circulans*, el cual lo biosintetiza en antibióticos como el butirosin [32] o en la elaboración de enzimas que se usan en las industrias farmacéuticas y de alimentos, como la alcalina proteasa y la transglutaminasa, las cuales también están relacionadas con las producciones de detergentes y textiles, respectivamente [33, 34].

Figura 6. Fotografía *Bacillus circulans* 1000x



[29]

1.7. Nutrientes de los microorganismos

Los microorganismos requieren de ciertos componentes para su crecimiento y constitución en cantidades iguales a las encontradas en sus células, con excepción del carbono, el cual algunas veces es necesario en mayores proporciones. Los nutrientes se catalogan como macronutrientes, micronutrientes y trazas. Los macronutrientes son aquellos que están en cantidades mayoritarias como el carbono, el nitrógeno y el fósforo, los cuales representan típicamente porcentajes mayoritarios de 50%, 14% y 3% del peso seco, respectivamente. Estos elementos conforman aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleídos, ácidos orgánicos entre otros. Los microorganismos suelen captarlos en la forma que se encuentran en el ambiente, en el caso del carbono suelen tomarse en forma de carbohidratos, el nitrógeno lo pueden asimilar generalmente como amoniaco, nitratos o urea y N_2 en el caso específico de las bacterias fijadoras de nitrógeno y el fósforo en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos [35, 36].

Los micronutrientes y los componentes en traza se encuentran en menores proporciones y algunos de ellos pueden no ser requeridos en el funcionamiento celular. Los metales pertenecientes a estos grupos, en ciertos casos tienen

funciones en el metabolismo o constituyen algunas de las moléculas que forman parte de los microorganismos (ver tabla 3).

Tabla 4. Función de metales en microorganismos [36].

Metales	Función celular
K	Requerido por diversas enzimas en la síntesis de proteínas
Mg	Funciona como estabilizador de los ribosomas, las membranas celulares y los ácidos nucleicos.
Ca	No es esencial pero ayuda a estabilizar la pared celular y está implicado en la termoresistencia de las endosporas.
Na	Requerido en el crecimiento de microorganismos marinos.
Fe	Fundamental en la respiración celular, forma parte esencial de los citocromos y de las proteínas implicadas en el transporte de electrones.
Co	Se encuentra en la vitamina B ₁₂ transcaboxilasa (Bacterias del ácido propiónico)
Cu	En la respiración, forma parte del citocromo c oxidasa, que está implicada en la fotosíntesis.
Zn	Se encuentra implicado en las enzimas: Anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA- polimerasa y muchas proteínas que se unen al DNA.

Biológicamente los metales actúan como estabilizadores de las proteínas integrales en las paredes celulares y también son cofactores en las proteínas enzimáticas; ya que la funcionalidad de estas depende de su estructura tridimensional, al introducirse un cofactor hay una alteración de uno o varios aminoácidos del sitio activo, llevando a la inactivación de la enzima. Los cofactores también pueden actuar afectando los patrones de plegamientos de las enzimas. Los metales esenciales en la nutrición celular a altas concentraciones también pueden presentar efectos tóxicos como los ocasionados por metales

pesados, los cuales influyen negativamente en la actividad y estructura enzimática [37].

1.8. Efectos ambientales en los microorganismos

Las condiciones ambientales influyen en los procesos biológicos potenciando o controlando las actividades microbianas. La temperatura y el pH son los principales factores ambientales que intervienen en el crecimiento celular [35].

1.8.1 Temperatura

Los microorganismos pueden crecer en un rango de temperaturas específico, en general, aquellos dedicados a degradar sustancias orgánicas son del tipo mesófilo los cuales tienen una temperatura óptima de 30°C, dado que a mayores valores la estabilidad de las enzimas se ve afectada por su desnaturalización y la integridad de su membrana plasmática pierde funcionalidad y estabilidad. A menores temperaturas las enzimas pierden flexibilidad y la membrana plasmática reduce su capacidad de transporte activo. Los microorganismos psicrófilos y los hipertermófilos lograron adaptaciones tales que sus enzimas y membranas plasmáticas no se afectan a las temperaturas extremas en las que evolucionaron [35, 36]. Las fermentaciones como es de esperarse, también se ven afectadas por la temperatura. En el caso de la penicilina, su temperatura óptima de rendimiento es de 20°C difiriendo de la temperatura óptima de producción de biomasa cuyo máximo se presenta a 30°C [38].

1.8.2 pH

La mayoría de las bacterias pueden existir en un intervalo de pH entre 5 y 9 unidades, aunque muestran un pH óptimo cercano a 7. Los hongos prefieren ambientes más ácidos que van de 1 a 3 unidades de pH comportándose como microorganismos acidófilos. Por el contrario, las bacterias de dominio Archaea muestran un carácter de tipo alcalófilo. En cualquiera de los casos los valores

máximos y mínimos de supervivencia de un microorganismo difieren en tres unidades. El nivel de pH puede afectar actividades celulares tales como el transporte activo de la membrana plasmática y el equilibrio de las reacciones catalizadas por enzimas [35, 36].

2. METODOLOGIA

2.1 Recolección de muestras

Cuatro muestras de glicerol crudo (A, B, C1 y C2) fueron obtenidas de plantas nacionales, depositadas en frascos con tapa de seguridad de 1000ml y transportadas en cavas al laboratorio.

2.2 Caracterización fisicoquímica

2.2.1 pH

La medición de pH se llevó a cabo utilizando un pHmetro (Hanna Instruments pH 211) el cual requirió una previa calibración de sus electrodos a dos puntos usando soluciones buffer (Merck CertiPUR) de valores 7.00 ± 0.01 y 4.00 ± 0.01 en la escala. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del manual del pHmetro [39].

Figura 7. pHmetro Hanna Instruments pH 211



Se tomaron 30ml de cada muestra, se introdujo el electrodo durante cinco minutos, (tiempo requerido para la estabilización de su valor de pH) y se realizó la medición.

2.2.2 Densidad

La densidad fue medida utilizando un picnómetro de 5ml limpio y seco. Inicialmente se pesó el picnómetro vacío y luego con muestra de glicerol crudo de cada una de las plantas.

Se utilizó la siguiente ecuación para calcular la densidad:

Ecuación 1. Expresión matemática para calcular la densidad.

$$D = \frac{m - m_p}{5\text{ml}}$$

Donde:

D = densidad de la muestra de glicerol crudo (g/ml).

M = masa del picnómetro con muestra de glicerol crudo (g).

m_p = masa del picnómetro vacío (g).

2.2.3 Humedad

Estas mediciones fueron hechas por analistas en el CENIVAM utilizando un titulador Karl Fischer volumétrico.

2.2.4 Jabones

Esta titulación colorimétrica es una versión modificada del método AOCS Cs 17-79, jabón en aceite [8]. Las soluciones utilizadas en esta determinación se prepararon a partir de reactivos de grado analítico de marca (Mallinckrodt y Merck).

Figura 8. Montaje determinación volumétrica de jabones.



Se disolvieron $\pm 0.25\text{g}$ de glicerol crudo en 50 ml de agua destilada, se adicionaron cuatro gotas de fenolftaleína (1% en etanol) y se tituló con una solución estandarizada de ácido clorhídrico, hasta viraje del indicador desde rosado a incoloro. Este viraje indica la neutralización total del catalizador en la muestra de glicerol crudo. Seguidamente se agregaron cuatro gotas de azul de bromofenol (0.04% en H_2O) y se tituló nuevamente con la solución estandarizada de ácido clorhídrico 0.12N, hasta viraje del indicador desde azul hasta amarillo permanente.

Se utilizó la siguiente ecuación para la cuantificación de jabones en las muestras de glicerol crudo:

Ecuación 2. Expresión matemática para la cuantificación de jabones. Modificada [8].

$$\frac{\text{mg. jabón}}{\text{kg. muestra}} = \frac{B * [\text{HCl}] * 292.31 * 1 \times 10^6}{1000 * W}$$

Donde:

B = volumen de HCl adicionado en la segunda titulación (ml).

W = peso de la muestra de glicerol crudo en gramos (g).

[HCl] = concentración de la solución de ácido clorhídrico estandarizada (Normalidad).

292,31 = peso molecular promedio de las sales de sodio que se encuentran en el glicerol crudo proveniente del biodiesel desde aceite de palma africana. (Esta constante se calculó a partir de las concentraciones porcentuales de los ácidos grasos mayoritarios contenidos en el aceite de palma africana (g/mol) [40]).

El valor de pH de cada muestra fue tenido en cuenta para este análisis ya que las muestras de carácter ácido no requirieron la titulación del catalizador que se usa en la transesterificación.

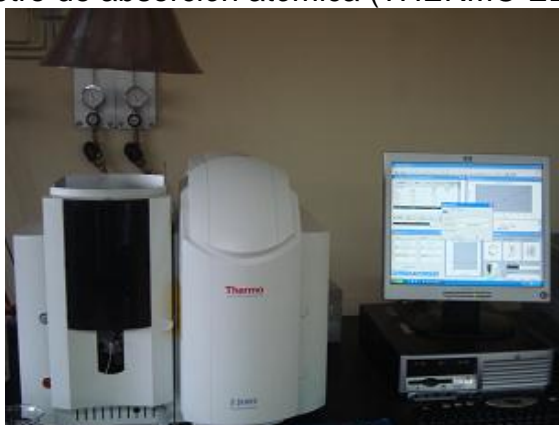
2.3 Caracterización espectrométrica

2.3.1 Metales

Para la determinación de sodio, potasio, calcio y magnesio se utilizaron soluciones patrón de 1000mg/l (Merck CertiPUR), el ácido clorhídrico 37% (Mallinckrodt), el ácido nítrico 65% marca Sigma-Aldrich y el óxido de lantano 99.5% (Merck).

El equipo usado para la lectura de las muestras fue un espectrómetro de absorción atómica, marca THERMO ELECTRON modelo S4.

Figura 9. Espectrómetro de absorción atómica (THERMO ELECTRON modelo S4)



2.3.1.1 Preparación curva de calibración para sodio y potasio

Se prepararon soluciones Stock a partir de patrones de 1000mg/L para sodio y potasio en balones de 50ml cada uno, se adicionó 1 ml de HNO₃ concentrado y se llevaron a aforo con agua desionizada. A partir de dichas soluciones Stock de sodio y potasio, se preparó una curva de 6 puntos con rango desde 0.1 a 1mg/L y una curva de 8 puntos con rango desde 0.1 a 1.7mg/L, respectivamente, en balones de 50ml. Se adicionó 0.5ml de HNO₃ concentrados a cada patrón y se

aforaron con agua desionizada. Como blanco de curva se utilizó una solución al 1% de HNO_3 en agua desionizada en un balón de 50ml.

2.3.1.2 Preparación curva de calibración para calcio y magnesio

Se prepararon soluciones Stock a partir de patrones de 1000mg/L para calcio y magnesio en balones de 50ml cada uno. Se adicionó 5ml de solución de La_2O_3 al 1% y se llevaron a aforo con agua desionizada. Utilizando dichas soluciones, se preparó para el calcio una curva de 6 puntos con rango de 0.05 a 5mg/L y para el magnesio una curva de 10 puntos con rango de 0.002 a 0.5mg/L. Como blanco de curva se preparó una solución al 0.1% de La_2O_3 en agua desionizada en un balón de 50ml.

2.3.1.3 Preparación de las muestras

La lectura de absorbancia para cada elemento mediante absorción atómica implica un tratamiento previo en la muestra que consiste en paso de calcinación seguido por digestión ácida. A continuación se describe cada uno de ellos [41].

2.3.1.3.1 Determinación de cenizas

Se tomaron $\pm 2\text{g}$ de muestra de glicerol crudo, junto con su blanco, y se depositaron en crisoles previamente secos durante 2h a 120°C . Posteriormente las muestras fueron calcinadas a 750°C durante 3h [22], luego se dejaron enfriar en un desecador y finalmente se pesaron.

2.3.1.3.2 Digestión ácida de la muestra

Las cenizas pesadas se digirieron junto con su blanco. La digestión se realizó agregando 5mL de ácido clorhídrico 6N seguida por calentamiento hasta sequedad. Al llegar a ese punto se adicionaron 12mL de ácido nítrico 0.1N al residuo y la mezcla se calentó durante 2 horas.

Finalizada la digestión ácida las soluciones se filtraron utilizando filtro cualitativo. Los filtrados fueron recogidos en balones de 50ml a los cuales se les adicionó 1ml de ácido nítrico concentrado para las mediciones de Na y K, ó 5ml de óxido de lantano al 1% para las mediciones de Mg y Ca [42]. Posteriormente las mezclas se aforaron con agua desionizada y se dispusieron en frascos plásticos oscuros etiquetados.

2.3.1.4 Parámetros Instrumentales utilizados

Las tablas 5 y 6 describen los parámetros espectrofotométricos utilizados en las determinaciones de Na, K, Ca y Mg, para todas las muestras preparadas.

Tabla 5. Parámetros espectrométricos

Parámetros espectrométricos	Na	K	Ca	Mg
Longitud de onda (nm)	589.0	766.5	422.7	285.2
Tiempo de medida (s)	4	4	1.5	4
Modo Medida	Emisión	Emisión	Absorción	Absorción
Tamaño de rendija (nm)	0.2	0.2	0.2	0.2
Numero de remuestras	1	1	1	1
Corriente de lámpara (%)	0	0	100	75

Tabla 6. Parámetros de llama

Parámetros de llama	Na	K	Ca	Mg
Tipo de llama	Aire-acetileno	Aire-acetileno	Aire-acetileno	Aire-acetileno
Flujo de combustible (L/min)	1.1	1.1	0.9	1.1
Altura del mechero (mm)	7.0	7.0	3.0	2.8

2.3.1.5 Determinación de límites de detección y cuantificación

Estos parámetros estadísticos fueron hallados leyendo una serie de blancos por cada metal y utilizando su valor promedio, desviación estándar y las siguientes expresiones matemáticas [43]:

Ecuación 3. Límite de detección

$$LdD = \bar{X} + 3 * SD$$

Ecuación 4. Límite de cuantificación

$$LdQ = \bar{X} + 10 * SD$$

Donde:

LdD = Límite de detección (mg/Kg)

LdQ = Límite de cuantificación (mg/Kg)

\bar{X} = Promedio de los blancos (mg/Kg)

SD = Desviación estándar de los blancos (mg/Kg)

2.3.2 Caracterización cromatografía

Los métodos cromatográficos de este proyecto fueron optimizados por la estudiante de maestría en Química Ángela Vásquez. Cada una de las muestras fue inyectada tres veces. Los reactivos utilizados en esta identificación y cuantificación cromatográfica son de calidad HPLC.

2.3.2.1 Glicerol, metanol y etanol

Cada muestra de glicerol crudo obtenida, fue filtrada al vacío utilizando papel de filtro cualitativo, diluida y homogenizada durante 10 min en baño de ultrasonido; para ser posteriormente pasada por filtros para jeringa OlimPeak de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45µm.

Estas muestras se inyectaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, marca Agilent Technologies serie 1100 acoplado a un detector de índice de refracción Agilent Technologies 1200, utilizando una columna SUPELCOGEL™ C-610H. Las

condiciones de operación fueron las siguientes: Volumen de inyección 25µL, fase móvil H₂SO₄ 6mM; flujo de 0.8ml/min; temperatura de la columna y del detector de 40°C y 45°C, respectivamente. La determinación y cuantificación de las sustancias, se llevó a cabo mediante la técnica de patrón externo, usando materiales de referencia grado analítico con una curva de calibración de 5 puntos.

Figura 10. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, (Agilent Technologies serie 1100) y detector de índice de refracción (Agilent Technologies 1200)



2.3.2.2 Selección del glicerol crudo

La selección del glicerol crudo para la fermentación de *Bacillus circulans*, se realizó en función de la composición general de cada muestra y de su disponibilidad.

2.3.2.3 Determinación de metabolitos

La mayoría de metabolitos extracelulares producidos a partir de glicerol, son moléculas pequeñas altamente polares, por lo tanto un método apropiado para su separación, identificación y cuantificación es la cromatografía líquida de alta eficiencia [18, 21, 25, 44-46].

Utilizando las condiciones evaluadas para el crecimiento de *B. circulans* (caldo de preinóculo: caldo nutritivo, temperatura 37°C, pH 6.5, agitación constante de 200rpm y concentración del glicerol crudo 50g/L elegido), el equipo de microbiología llevó a cabo una fermentación en un medio de sales minerales, realizando muestreos cada 12h hasta las 72h [28].

Posteriormente, muestras tomadas del ensayo de fermentación, fueron centrifugadas y filtradas para su análisis cromatográfico. El método utilizado, es el citado en la caracterización del glicerol, metanol, y etanol puesto que permite cuantificar además de estas sustancias: glucosa, 1,3-PDO, etanol, propanol, 2-propanol, butanol; y los ácidos: cítrico, succínico, láctico, acético y butírico

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES


3.1 Recolección de muestras




Las muestras fueron recolectadas en botellas de 1L y almacenadas en cavas para protegerlas durante su transporte al laboratorio. La muestra A sin ningún pretratamiento, fue obtenida de una planta piloto de producción de biocombustibles, y tomada directamente del tanque de almacenamiento de glicerol crudo proveniente del decantador. Las muestras B, C1 y C2 provienen de plantas industriales. B es una muestra neutralizada y desolventizada, C1 y C2 vienen de una misma planta, C1 fue tomada del decantador que separa el biodiesel del glicerol y C2 es del glicerol que ha sido ya desolventizada, diluida en el agua de lavado y removido ácidos grasos libres. A continuación se exponen los resultados y el análisis respectivo del trabajo desarrollado en el laboratorio.

Figura 11. Toma de muestra de glicerol crudo



Tabla 7. Descripción organoléptica de las muestras de glicerol crudo.

Muestra	Imagen	Descripción organoléptica
A		Muestra oscura de color marrón verdoso, de gran turbidez y consistencia muy espesa, al dejarse reposar tiende a formar fases. Su olor es fuerte y desagradable.

B		Muestra de color ambarino y transparente, de consistencia viscosa, altamente homogénea. Su olor es suave.
C1		Muestra oscura de color acaramelado y transparente, de consistencia viscosa. Esta muestra es homogénea a temperatura ambiente, a menores tiende a formar dos fases. Su olor aunque no es fuerte, es de por si perceptible.
C2		Muestra clara de color ambarino y transparente, de consistencia poco viscosa y de naturaleza homogénea. Su olor es muy suave.

La diferencia en el color de las muestras de glicerol crudo, puede deberse a la presencia de pigmentos u otros componentes alojados en la matriz de la materia prima utilizada para la producción de biodiesel [17].

3.2 Caracterización fisicoquímica

3.2.1 pH

Tabla 8. pH de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio	9,52	5,98	13,13	4,37
DS	0,13	0,04	0,05	0,03
Nº Experimentos	6	9	10	10
pH	9,52 ± 0,14	5,98 ± 0,03	13,13 ± 0,04	4,37 ± 0,03

3.2.2 Densidad

Tabla 9. Densidad de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (g/ml)	0,98	1,23	1,05	1,06
DS	0,062	0,062	0,058	0,001
Nº Experimentos	3	3	3	3
Densidad (g/ml)	0,98 ± 0,11	1,23 ± 0,10	1,05 ± 0,01	1,06 ± 0,01

3.2.3 Humedad

Tabla 10. Humedad de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (%)	2,76	6,64	0,46	38,2
DS	0,02	0,14	0,02	0,03
Nº Experimentos	3	3	3	3
Humedad (%)	2,76±0,03	6,64±0,22	0,46±0,03	38,2±0,04

3.2.4 Jabones

Tabla 11. Concentración de jabones de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio	6.81	2.67	1.44	nd
DS	0.17	0.04	0.12	-
Nº Experimentos	5	5	5	5
Concentración de jabones (mg/Kg)	6.81 ± 0.17	2.67 ± 0.04	1.44 ± 0.12	nd

nd: no detectado

3.2.5 Cenizas

Tabla 12. Porcentaje de cenizas de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio	4,33	4,32	2,54	2,62
DS	0,27	0,07	0,43	0,13
Nº Experimentos	3	5	5	2
Cenizas (% p/p)	4,33±0,67	4,32±0,09	2,54±0,53	2,62±0,31

3.3 Caracterización espectrofotométrica

3.3.1 Metales

A continuación se presentan los datos obtenidos en la determinación de Na, K, Mg, y Ca para las muestras de glicerol crudo.

No se cuantificaron calcio y magnesio en la muestra A, debido a su alto grado de heterogeneidad.

3.3.1.1 Sodio

Tabla 13. Concentración de sodio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (mg/Kg)	2620,85	11162	11829.1	8295.0
Desviación estándar	122.9	418.8	334.280	48.029
Concentración (mg/Kg)	2620,85±276,6	11162±1040.4	11829.1±830.4	8295.0±119.3
Limite de detección (mg/L)	0,41			
Limite de cuantificación (mg/L)	0,59			

Rango de trabajo (mg/L)	0,59 – 1,00
-------------------------	-------------

3.3.1.2 Potasio

Tabla 14. Concentración de potasio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (mg/Kg)	28930	1105,3	484,2	565,38
Desviación estándar	502.4	39.3	85,56	70.0
Concentración (mg/Kg)	28930±1248	1105,3±137,87	484,2±212,55	565,38±173,79
Limite de detección (mg/L)	0,11			
Limite de cuantificación (mg/L)	0,17			
Rango de trabajo (mg/L)	0,17 – 1,70			

3.3.1.3 Magnesio

Tabla 15. Concentración de magnesio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)

Muestra	B	C1	C2
Promedio (mg/Kg)	25.8	83.4	15,49
Desviación estándar	2.01	4.01	3,897

Concentración (mg/Kg)	25.8±4.99	83.4±9.96	15,49±9,68
Limite de detección (mg/L)	0,10		
Limite de cuantificación (mg/L)	0,22		
Rango de trabajo (mg/L)	0,22 – 0,50		

3.3.1.4 Calcio

Tabla 16. Concentración de calcio en muestras de glicerol crudo (mg/kg)

Muestra	B	C1	C2
Promedio (mg/Kg)	259.4	229.9	278.3
Desviación estándar	132.2	14.2	7.4
Concentración (mg/Kg)	259.4±126.6	229.9±35.3	278.3±66.4
Limite de detección (mg/L)	0,07		
Limite de cuantificación (mg/L)	0,14		
Rango de trabajo (mg/L)	0,14 – 5,00		

3.4 Caracterización cromatográfica

A continuación se presenta la cuantificación de glicerol, metanol y etanol en cada una de las muestras de glicerol crudo.

3.4.1 Glicerol, metanol y etanol

Tabla 17. Concentración de glicerol en las muestras de glicerol crudo (% p/p)

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (% p/p)	41,23	85,81	73,49	49,33
Desviación estándar	0,020	0,596	0,443	2,362
Concentración (% p/p)	41,23 ±0,05	85,81 ±1,48	73,49 ±1,10	49,33 ±5,87

Tabla 18. Concentración de metanol en las muestras de glicerol crudo (% p/p)

Muestra	A	B	C1	C2
Promedio (% p/p)	20,79	No detectado	23,61	4,41
Desviación estándar	0,652	-	0,056	0,056
Concentración (% p/p)	20,79 ±1,62	No detectado	23,61 ±0,14	4,41 ± 0,14

No se detectó etanol en ninguna de las muestras de glicerol crudo.

3.5 Discusión de Resultados

Este es el primer trabajo caracterización fisicoquímica de diversos gliceroles provenientes de plantas colombianas productoras de biodiesel.

En las Tabla 19 y 20, se recopilan los resultados de la caracterización.

Tabla 19. Composición general de las muestras de glicerol crudo

Parámetro Físicoquímico	Muestra				
	A	B	C1	C2	
pH	9,52 ± 0,11	5,98 ± 0,02	13,13 ± 0,03	4,37 ± 0,02	
Densidad (g/ml)	0,98 ± 0,11	1,23 ± 0,10	1,05 ± 0,01	1,06 ± 0,01	
Glicerol (% p/p)	41,23 ± 0,05	85,81 ± 1,48	73,49 ± 1,10	49,33 ± 5,87	
Humedad (% p/p)	2,76 ± 0,03	6,64 ± 0,22	0,46 ± 0,03	38,2 ± 0,04	
Cenizas (% p/p)	4,33 ± 0,67	4,32 ± 0,09	2,54 ± 0,53	2,62 ± 0,31	
MONG (% p/p)	Metanol (% p/p)	20,79 ± 1,62	No detectado	23,61 ± 0,14	4,41 ± 0,14
	Jabones (% p/p)	6,81 ± 0,17	2,67 ± 0,04	1,44 ± 0,12	No detectado
	OCO (% p/p)	24,1	0,56	22,08	5,44

OCO: Otros Componentes Orgánicos.

Tabla 20. Composición elemental de las muestras de glicerol crudo

Muestra	A	B	C1	C2
Na	2620,85 ± 276,6	11162 ± 1040,39	11829,1 ± 830,4	8295,0 ± 119,3
K	28930 ± 1247,9	1105,3 ± 137,87	484,2 ± 212,55	565,38 ± 173,79
Mg	-	25,8 ± 5,00	83,4 ± 9,95	15,49 ± 9,68
Ca	-	259,39 ± 126,6	229,85 ± 35,30	278,3 ± 66,4

Las muestras A y C1, presentan un pH alcalino, debido a la alta presencia del catalizador utilizado en la industria del Biodiesel (NaOH ó KOH) y a la formación de jabones durante la transesterificación, ya que a altas temperaturas el catalizador reacciona con los ácidos grasos libres presentes en el aceite de palma, formando cadenas de jabones [16].

Estas muestras, también poseen el mayor contenido en metanol, como consecuencia de no ser sometidas a ningún tratamiento de evaporación. La muestra A, presenta el mayor contenido en jabones, puesto que el aceite de palma que se utiliza en la planta piloto no tiene una refinación previa, por tanto puede tener una mayor cantidad de ácidos grasos libres (AGL) que los aceites usados en las plantas B y C.

La no detección de etanol en las muestras de glicerol crudo, ratifica al metanol como el alcohol utilizado por parte de sus plantas para la producción de biodiesel. En la muestra B la concentración de metanol no fue significativa ya que estuvo por debajo del límite de detección del método.

La muestra B es la que posee una densidad ($1,23 \pm 0,10 \text{ g/cm}^3$) más cercana a la densidad teórica del glicerol (1.261 g/cm^3), ya que su porcentaje de glicerol es el mayor entre las demás muestras analizadas, lo cual indica, que la muestra B está compuesta mayoritariamente de glicerol.

Las cenizas de cada una de las muestras de glicerol crudo caracterizadas, son residuos de catalizador básico utilizado en el proceso de producción de biodiesel y minerales alojados en la matriz del aceite de palma. Concentraciones tanto similares como bajas de cenizas fueron encontradas en las muestras de glicerol crudo.

Los Otros Componentes Orgánicos (OCO) son no cuantificables y hacen parte de la matriz del glicerol crudo así como de la Materia Orgánica No Glicerol (MONG). OCO se calcula realizando un balance de masa. La muestra A exhibe mayor

cantidad de OCO y jabones que las demás, su apariencia y olor ponen en evidencia su elevado porcentaje de MONG, pigmentos y compuestos olfativamente perceptibles.

En la tabla 20, se observa que la muestra A contiene elevados niveles de potasio, resultado congruente con la información aportada por la planta, la cual utiliza hidróxido de potasio como catalizador. En cuanto a las muestras B, C1 y C2, la concentración de sodio predomina sobre los demás elementos determinados, ratificando el uso de metóxido de sodio como catalizador dentro de sus procesos de producción de biodiesel.

Al observar la Tabla 2 y 19, la composición fisicoquímica de los gliceroles crudos encontrados en la literatura oscila notoriamente entre autores, al igual que las muestras analizadas en este trabajo, debido al tipo de materia prima y las condiciones del proceso de producción del biodiesel utilizado en cada planta. En cuanto a las tablas 3 y 20, la composición elemental depende también de las condiciones de cultivo del aceite (suelo y/o clima), incluso si son del mismo tipo de aceite vegetal [47].

El porcentaje de cenizas experimental y el reportado en la literatura son similares, oscilando desde 2,54 a 4,33% y 2,27 a 5,00%, respectivamente, para el caso del aceite residual crudo de Malasia podría suponerse que su proceso de transesterificación utiliza una cantidad considerable de catalizador básico (NaOH, de acuerdo a la Tabla 3). En la composición elemental (Tabla 3) y las muestras B y C1 (Tabla 20), el sodio está en mayor proporción, lo que establece al hidróxido de sodio como el catalizador más común dentro del proceso de producción de biodiesel.

En los demás elementos, se sigue una misma tendencia entre las muestras de la literatura y las analizadas en este trabajo, es decir, hay menores proporciones de

magnesio con respecto a calcio, comportamiento que es mas pronunciado en las muestras caracterizadas.

Al igual que las muestras B y C2, las provenientes de Corea del sur, Tailandia, Polonia y Francia, contienen bajos niveles de metanol, por lo tanto, es probable que hayan sido sometidas a un proceso de evaporación del metanol.

El valor de la humedad difiere considerablemente entre las muestras analizadas; lo cual puede deberse, no solo al carácter higroscópico del catalizador o del glicerol mismo sino al proceso por el cual ha pasado cada glicerol después de la transesterificación.

Tanto los resultados encontrados en la literatura como las muestras analizadas experimentalmente, coinciden en que un valor de pH elevado está asociado a una mayor cantidad de metanol, debido probablemente a que no fueron sometidos a un pretratamiento de evaporación de metanol o reducción de pH mediante titulación.

Se observa que el porcentaje de metanol presenta una baja proporción en las muestras de glicerol crudo analizadas en comparación a las mencionadas en la literatura, esto puede ser causado por mayor proporción de metanol-aceite de palma, como el caso del glicerol crudo obtenido a partir del aceite de girasol, en donde la relación de metanol y materia prima es de 10:1 [15].

3.6 Selección del glicerol crudo

La muestra de glicerol crudo A no es viable como fuente de carbono para *Bacillus circulans*, debido a su alto contenido de metanol, jabones y sales, los cuales actúan como inhibidores en el crecimiento del microorganismo [15, 20, 25, 45].

La muestra C1 aunque no posee elevados niveles de cenizas ni jabones, contiene mayor cantidad de metanol entre las demás muestras, lo cual la hace poco viable como fuente de carbono.

Las muestras B y C2 presentan características similares en cuanto al pH, la densidad y las cantidades de metanol y jabones, lo cual es congruente con el tratamiento recibido, pero la muestra C2 es más atractiva para los procesos fermentativos, ya que al utilizarla no solo se aprovecha el glicerol residual sino que se utilizan las aguas de lavado del biodiesel.

El rango de pH en el cuál *Bacillus circulans* presenta un mejor crecimiento es de 6 a 7.5 [28], por lo tanto fue necesario neutralizar la muestra con una solución de hidróxido de sodio 0.7N, obteniéndose una nueva muestra denominada C3, la cual fue utilizada en los posteriores procesos de fermentación.

En las tablas 21 y 22 se pueden observar la caracterización fisicoquímica, espectroscópica y el contenido de metales en la muestra C3.

Tabla 21. Composición general de la muestras de glicerol crudo C3

C3					
Parámetros		Promedio	Desviación estándar	Nº de experimentos	Concentración (mg/L)
pH		7,08	0,03	10	7,08 ± 0,02
Densidad (g/ml)		1,06	0,004	3	1,06 ± 0,01
Glicerol (% p/p)		49,84	0,024	3	49,84 ± 0,06
Humedad (% p/p)		41.51	0,012	3	41.51 ± 0.03
Cenizas (% p/p)		2,63	0,155	3	2,63 ± 0,39
MONG (% p/p)	Metanol (% p/p)	4.62	0,081	3	4.62 ± 0.20
	Jabones (% p/p)	2.29	0,13	5	2,29 ± 0,13

Tabla 22. Composición elemental de la muestra de glicerol crudo C3

Elemento	Promedio (mg/Kg)	Desviación estándar	Concentración (mg/Kg)
Na	7909,0	274,18	7909,0±681,1
K	335,91	32,87	335,91±85,66
Mg	36,30	4,18	36,30±10,39
Ca	43,66	0,50	43,66±2,86

3.7 Determinación de metabolitos

B. circulans utilizó la muestra de glicerol C3 como única fuente de carbono y energía adaptándose a los contaminantes presentes. El consumo de este sustrato a las 72 h de fermentación fue de 10,76 g/L [28] siendo un valor comparable con lo citado en la literatura con otros microorganismos nativos [18, 48, 49].

Inicialmente se encontraron tres picos que coincidirían con los tiempos de retención del glicerol, etanol y propanol, pudiéndose suponer estos dos últimos como productos metabólicos de *Bacillus circulans*, sin embargo, en un análisis realizado por el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, utilizando cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), se descartó la presencia de etanol, propanol y cualquier sustancia volátil como productos de fermentación.

Por lo tanto, no se detectó la producción de los metabolitos usualmente obtenidos a partir de glicerol (ácidos orgánicos o alcoholes). Análisis por espectroscopia de masas (ESI-MS), detectaron en el sobrenadante la presencia de iones que pueden ser precursores de polihidroxicanoatos (PHA) como el polihidroxibutirato (PHB), polihidroxivalerato (PHV) y el copolímero de estos (PHB-co-PHV).

Dado que especies nativas de *B. circulans* han sido citadas como productoras de PHB, PHV y PHB-co-PHV, el grupo de investigación desarrollo un protocolo

usando cloroformo como solvente para la extracción de este metabolito intracelular en la biomasa producida [28]. Los métodos de caracterización y cuantificación de los posibles PHA no han sido realizados.

4 CONCLUSIONES

La muestra de glicerol C3 demostró ser una fuente de carbono y energía adecuada para la fermentación de *B. circulans*, obteniendo polihidroxialcanoatos.

La calidad del aceite de palma, el control del proceso de transesterificación y el pretratamiento del glicerol crudo se ven reflejados en su composición.

Las técnicas desarrolladas en este trabajo permiten determinar la composición de muestras de glicerol provenientes de la industria del Biodiesel.

5 RECOMENDACION

Es necesario desarrollar un método analítico que permita la caracterización de los PHA obtenidos mediante fermentación de glicerol crudo utilizando *Bacillus circulans*.

BIBLIOGRAFIA

1. SILVA. G da, MACK. M y CONTEIRO. J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: Biotechnology Advances. 2009. vol. 27, p. 30-39.
2. JOHNSON. D y TACONI. K. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. En: InterScience. 2007. p. 338-348.
3. YAZDANI. S y GONZALEZ. R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. En: Current Opinion in Biotechnology. Mayo 2007. vol. 18, p. 213-219.
4. THOMPSON, J y HE, B. Characterization Of Crude Glycerol From Biodiesel Production From Multiple Feedstocks. En: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2006. vol. 22, no. 2 p. 261-265.
5. ONWUDILI. J y WILLIAMS. P. Hydrothermal Reforming Of Bio-Diesel Plant Waste: Products Distribution And Characterization. En: Fuel. Julio, 2009. vol. 89. no. 2, p. 501-509.
6. GALVANI, F.J. Alimentación de bovinos con sub-productos de la industria del biodiesel. Universidad de Buenos Aires. [online] Abril 2008 [citado: 27 noviembre 2010] pagina 11. Disponible en Internet: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/9-8-Trabajo_final_galvani.pdf
7. Disponible en: <http://www.minagricultura.gov.co/02componentes/05biocombustible.aspx>(última consulta 24/010/11)

8. GERPEN, J. Van, Shanks. B y Pruszko. R. "Biodiesel Analytical Methods". Nacional Renewable Energy Laboratory. (online) (<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/36240.pdf>) , Colorado USA. p. 37, 39.
9. NARANJO, J.M. Producción de Polihidroxitirato a partir de Residuos Agroindustriales. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Manizales. 25 de Mayo 2010.
10. BAIRD, C. "Química Ambiental", Editorial Reverté, S.A., 2ª Edición. Capitulo 3, p. 89-103.
11. DUFFEY, A. *Estudio regional sobre economía de los biocombustibles 2010: temas clave para los países de América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile, 2011.
12. Disponible en: <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/nota-web-id-271.htm> (última consulta 24/010/11)
13. ATHALYE, S. GARCIA, R. y WEN, Z. Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Producing Eicosapentaenoic Acid (EPA) by the Fungus *Pythium irregular*. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. vol. 57, p. 2739-2744.
14. POSADA, J.A. y CARDONA, C.A. Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiesel. *Ingeniería*. Universidad de Bogotá. 15 de Junio 2006. vol.14, no.1, p. 9-27.
15. ASAD-UR-REHMAN, *et al.*, Pre-Treatment And Utilization Of Raw Glycerol From Sunflower Oil Biodiesel For Growth And 1,3-Propanediol Production

By *Clostridium butyricum*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2008. vol. 83, p.1072–1080

16. YONG, K *et al.*, Characterization Of Glycerol Residue From A Palm Kernel Oil Methyl Ester Plant. En: Journal of Oil Palm Research. Diciembre, 2001. vol. 13, no. 2, p. 1-6.
17. HANSEN. H, *et al.*, A Chemical Analysis Of Samples Of Crude Glycerol From The Production Of Biodiesel In Australia, And The Effects Of Feeding Crude Glycerol To Growing-Finishing Pigs On Performance, Plasma Metabolites And Meat Quality At Slaughter. En: Animal Production Science. 2009. vol. 49, p. 154–161.
18. MURARKA *et al.*, Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Febrero, 2008. vol. 79, no. 4, p. 1124-1135.
19. PAPANIKOLAOU, S, *et al.*, “Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil”. En: Biomass & Bioenergy. 2008. Vol. 32, p. 60-71.
20. MOON. C, *et al.*, Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. En: Applied Biochemical Biotechnology. 25 de Noviembre, 2009. vol. 161, p. 502-510.
21. RYMOWICZ, W, *et al.*, “Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell

recycle regimes”. En: Applied Microbiology Biotechnology . Abril, 2010. Vol. 87, p. 971–979.

22. MANOSAK. R, *et al.*, Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption. Fuel Processing Technology. Septiembre, 2010. Vol. 92, p. 92-99.
23. GONZÁLEZ-PAJUELO, M. *et al.*, Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. En: Journal of Industrial Microbiology Biotechnology. Septiembre, 2004. vol. 31, p. 442-446.
24. RYMOWICZ, W; RYWÍNSKA, A. y GLADKOWSKI, W. Simultaneous Production Of Citric Acid And Erythritol From Crude Glycerol By *Yarrowia lipolytica* *Wratislavia* K1. En: Chemical Papers. 2008. vol. 62, no.3, p. 239–246.
25. PAPANIKOLAOU, S, *et al.*, *Yarrowia lipolytica* As A Potential Producer Of Citric Acid From Raw Glycerol. En: Journal of Applied Microbiology. 2002. vol. 92, p. 737-744.
26. GRAZIANI, M y FORNASIERO, P. “Renewable Resources and Renewable Energy: A Global Challenge”. Editorial CRC, Taylor & Francis Group, 2007. Online: www.CRCpress.com. Capitulo 3, p. 45.
27. GONZÁLEZ-PAJUELO, M. *et al.*, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. En: Metabolic Engineering. Junio, 2005. vol.7, p. 329-336.

28. PRIETO, D y ROJAS, L. "Evaluación de la influencia de variables fisicoquímicas en el proceso de fermentación de glicerol crudo utilizando un microorganismo nativo". Tesis de pregrado, UIS, Bucaramanga, 2011.
29. RODRIGUEZ, Y. 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, Tesis de Pregrado, UIS, 2010.
30. AONO, R *et al.*, Isolation and Partial Characterization of an 87-Kilodalton 3-1,3-Glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. En: Applied and Environmental Microbiology. Feb. 1992. vol. 52, no. 2, p. 520-524.
31. JOSHI, B.H. Thermostable Alkaline α -Amylase from *Bacillus circulans* PN5: Biochemical Characterization and Production. En: Asian Journal of Biotechnology. 2011. vol. 3, no. 1, p. 58-67.
32. NAM, D y RIU, D. Relationship Between Butirosin Biosynthesis and Sporulation in *Bacillus circulans*. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. May. 1958. vol. 27, no. 5, p. 798-801.
33. VOLKEN, C, *et al.*, Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. En: Process Biochemistry. 2006. vol. 41, p. 1186-1192.
34. JASWAL, R, *et al.*, Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: a statistical approach. En: Indian Journal of Biotechnology. Julio 2008. vol. 7, p. 356-360.

35. GHASSEMI, A. "Handbook of Pollution, Control and Waste Minimization" Editorial Marcel Dekker, Inc., 2002. Capitulo 10, p. 179-180.
36. MADIGAN, M. MARTINKO, J. PARKER, J. "Biología de los microorganismos. Brock", Editorial Pretince Hall. 10º Edición, 2004. Capitulo 5, p. 103-106.
37. WANG, L. HUNG, Y y SHAMMAS, N. "Handbook of Advance Industrial and Hazardous Wastes Treatment" Editorial CRC, Taylor & Francis Group, 2010. Online: www.CRCpress.com. Capitulo 11, p. 409, 410.
38. GADEN, E. JR. *et al.*, Fermentation process kinetics. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. 1959. vol. 1, No. 4, p. 413-429.
39. HANNA INSTRUMENTS. Manual de Instrucciones. pH 210, 211, 212, 213. Medidores de pH/mV/°C de sobremesa, basados en microprocesador. Julio de 1999. Online: http://www.hannaarg.com/productos/Catalogo/PHmetro/Sobremesa/m_pH213.pdf.
40. ARRUBLA, J.P. Transesterificación del Aceite de Palma y Análisis de Triglicéridos por Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura. Tesis de Maestría, UIS, Bucaramanga, 2002.
41. MARTÍNEZ, G y PALACIOS, C. Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao frescos y fermentados mediante espectroscopía de absorción atómica de llama, Tesis de Pregrado, UIS, Bucaramanga, 2010.

42. AOAC Official Method 991.25 "Calcium, magnesium & phosphorus in cheese". Atomic Absorption Spectrometry after dry ashing. First action 1999.
43. MILLER, J y MILLER, J. "Estadística y quimiometría para química analítica". Editorial Prentice Hall. 4ta Edición, 2002. Capítulo 2.
44. MAKRI, A; FAKAS, S Y AGGELIS, G. "Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures" *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, p. 2351-2358.
45. RYWINÍSKA, A *et al.*, "Biosynthesis of Citric Acid from Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-Batch Fermentation". En: *Food Technol. Biotechnol.* 2009. p. 1-6.
46. TACONI K., VENKATARAMANAN K. y JONHSON D. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC^R 6013TM utilizing Biodiesel – derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. En: *Environmental Progress & Sustainable Energy* (2009). vol 28, no.1, p. 101, 102.
47. RAYGADA, R. "Manual técnico para el cultivo de la palma aceitera". Lima. Asociación de Promoción Agraria. Noviembre 2005. ISBN: 9972-2715-0-1.
48. IBRAHIM, M.H.A y STEINBUCHER, A. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. En: *Journal of Applied Microbiology*. Mayo, 2009. vol. 108, p. 214-225.
49. MOHAMMAD, H. A *et al.*, Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch

Fermentation and Simplified Solvent Extraction. En: Applied and Environmental Microbiology. Octubre 2005. vol. 75, no. 19, p. 6222-6231.

ANEXOS

Anexo 1

Valores de distribución t para un 95% de confianza [43]

Número de grados de libertad (n-1)	Valor de t para un intervalo de confianza de 95% (P=0.05)
1	12.71
2	4.30
3	3.18
4	2.78
5	2.57
6	2.45
7	2.36
8	2.31
9	2.26
10	2.23
12	2.18
14	2.14
16	2.12
18	2.10
20	2.09
30	2.04
50	2.01

Anexo 2

Composición de ácidos grasos libres en diversos aceites (% w/w)

Ácidos grasos libres	Aceites							
	IdaGol d	PacGol d	Colza	Canola	Soya	Crambe	WVO	Palm a
Palmítico	2.8	3.1	2.8	4.4	10.7	2.0	18.6	42.90
Esteárico	1.0	1.6	1.0	1.8	4.3	0.9	6.3	4.60
Oleico	24.9	23.9	13.6	60.9	24.9	17.8	40.4	41.35
Linoléico	10.4	21.6	11.8	19.1	51.6	8.1	28.0	9.35
linolenico	9.4	9.9	7.5	9.5	7.3	4.5	1.5	-
Eicósico	10.7	12.1	8.6	1.8	0.2	3.7	-	-
Erúcico	34.3	22.1	47.9	0.8	-	54.2	-	-

Anexo 3

Microorganismos de referencia [1, 27, 29, 46]

Microorganismos			CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	METABOLITO
Familia	Género	Especie		
Enterobacteriaceae	Klebsiella	<i>K. oxytoca</i>	Bacilo Gram negativo no esporulados inmóvil anaerobio facultativo	1,3 –propanodiol Acido láctico
		<i>K. pneumoniae</i>		1,3-propanodiol
	Citrobacter	<i>C. freundii</i>	Bacilo Gram negativo no esporulado Móvil anaerobio Facultativo	1,3- propanodiol
	Escherichia	<i>E. coli</i>	Gram-negativo No esporulado Anaerobio facultativo Patógeno	Etanol
	Enterobacter	<i>E. aerogenes</i>	Gram-negativo Patógeno	Etanol H ₂
	Cloustridium	<i>C. pasteurianum</i>	Bacilos anaerobios esporulado Gram positivo	1,3 - propanodiol
		<i>C. butylicum</i>		
		<i>C. butylicum</i>		
<i>C. acetobutylicum</i>				
Saccharomycea	Saccharomyces	<i>S. cerevisiae</i>	Levadura que se divide por gemación	Etanol
Acetobacteraceae	Gluconobacter	<i>G. oxydans</i>	Gran-negativo Inmóvil aerobio	Dihidroxiacetona
Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>P. oleovorans</i>	Gram-negativo Bacteria metilotrónica	Polihidroxi butirato
		<i>P. corrugata</i>	Gram-negativo patógeno	Polihidroxi alcanoatos
Trichocomaceae	Aspergillum	<i>A. niger</i>	-	Ácido cítrico
Dipodascaceae	Yarrowia	<i>Y. lipolytica</i>	Levadura aerobia que presenta dimorfismo	Ácido cítrico

