

Influencia de los Componentes Minoritarios del Glicerol Crudo sobre la Productividad de
Ácido Láctico Producido por Vía Fermentativa

Jhonny Alexander Ortiz Solano
Cristian Alejandro Bernal Novoa

Trabajo de Grado para Optar al título de Ingeniero Químico

Director

Luis Javier López Giraldo
Ph.D. en Ciencia de Alimentos y Ciencia de Procesos

Codirector

Laura Johana Castellanos Suárez
Ingeniería química

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A Dios por darme a una familia tan bonita y por darme la oportunidad de conocer personas que de alguna u otra manera me han ayudado y me han enseñado tanto.

A mis padres, Yonny y Miriam quienes han sido mi inspiración y mi más grande ejemplo, gracias por tantas alegrías y por estar siempre presentes en cada paso de mi vida. Me siento profundamente agradecido con Dios por haberme dado a los mejores papas del mundo, los cuales con su apoyo incondicional y amor me han permitido alcanzar este gran logro. Ustedes son mi gran orgullo y los amo con todo mi corazón.

A mis hermanitos Ángel y Santiago a quienes aprecio y son mi más grande motivación.

A mis abuelitos Angelica, Félix, Héctor y Concha por esos momentos tan especiales que hicieron de mi la persona más feliz y no me alcanzara la vida para agradecerles por el regalo más grande que me dieron, mis padres.

A mis amigos del alma, Helena y Miguel quienes siempre estuvieron junto a mí, y a los cuales les debo tantos momentos inolvidables. Siempre los llevare en mi corazón.

A la mejor codirectora del mundo, Laura Castellanos, quien me acompañó y guio en todo este proceso, gracias por tu apoyo incondicional, por tus enseñanzas y buenos consejos, y sobre todo gracias por ser una gran amiga y un ser humano maravilloso.

Jhonny Alexander Ortíz Solano

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, por permitir la culminación de este logro.

A mis compañeros Cristian Bernal, Michael y Andrea por su gran ayuda, compañía y amistad.

A mi director de trabajo de grado, doctor Luis Javier López Giraldo por su acompañamiento y recomendaciones en el desarrollo del proyecto.

Al grupo CICTA, Sergio, sr Luis Carlos, Arley, Laura, Lady, Aleja, Cristian Murillo, David y Claudia de quienes me llevo grandes enseñanzas, gracias por tantas risas y momentos compartidos que difícilmente olvidare, y sobre todo gracias por hacerme sentir como en familia.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo General	16
1.2 Objetivos Específicos	16
2. Marco Teórico y Estado del Arte	17
3. Metodología	20
3.1 Caracterización del Glicerol Crudo	20
3.1.1 Propiedades físicas del glicerol.	21
3.1.2 Propiedades químicas del glicerol.	21
3.2 Fermentaciones	22
3.3 Efecto de los componentes minoritarios	24
3.3.1 Efecto de los jabones.	25
3.3.2 Efecto del metanol.	26
3.3.3 Efecto de la fase orgánica (FO).	26
3.3.4 Efecto del KCl y del NaCl.	26
3.4 Cuantificación de biomasa, sustrato y metabolitos.	27
3.5 Análisis estadístico	28
4. Resultados	29
4.1 Caracterización del Glicerol Crudo	29

SÍNTESIS DE Á. LÁCTICO A PARTIR DE GLICEROL CRUDO	8
4.1.1 Propiedades físicas del glicerol.	29
4.1.2 Propiedades químicas del glicerol.	29
4.2 Fermentaciones	34
4.2.1 Fermentación con glicerol USP y CG como fuente de carbono.	34
4.3 Efecto de los componentes minoritarios	39
4.3.1 Efecto de los jabones.	40
4.3.2 Efecto del metanol.	41
4.3.3 Efecto de la fase orgánica (FO).	42
4.3.4 Efecto del KCl y del NaCl.	43
4. Conclusiones	43
5. Recomendaciones	46
Referencias Bibliográficas	47
Apéndices	52

Lista de Figuras

Figura 1.	Diagrama de flujo de la metodología aplicada en la investigación.	20
Figura 2.	Métodos de caracterización fisicoquímicos del CG.	20
Figura 3.	Concentración de sustrato (glicerol) vs tiempo.	35
Figura 4.	Biomasa vs tiempo (Fermentaciones de 500 mL.).	35
Figura 5.	Concentración de ácido láctico vs tiempo.	36
Figura 6.	Perfiles de pH vs tiempo.	37
Figura 7.	Porcentaje de conversión (glicerol) vs tiempo.	37
Figura 8.	Productividad del ácido láctico vs tiempo.	38
Figura 9.	Efecto de los jabones en la productividad global de ácido láctico.	40
Figura 10.	Efecto del metanol en la productividad global de ácido láctico.	41
Figura 11.	Efecto de la fase orgánica en la productividad global de ácido láctico.	42
Figura 12.	Efecto del NaCl y KCl en la productividad global de ácido láctico.	43

Lista de Tablas

Tabla 1.	<i>Concentraciones de jabón adicionado (g/L).</i>	25
Tabla 2.	<i>Concentraciones de metanol adicionado (g/L).</i>	26
Tabla 3.	<i>Concentraciones de FO adicionada (g/L).</i>	26
Tabla 4.	<i>Concentraciones de Cloruro de potasio (KCl) adicionado (g/L).</i>	27
Tabla 5.	<i>Concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) adicionado (g/L).</i>	27
Tabla 6.	<i>Propiedades físicas del glicerol crudo.</i>	29
Tabla 7.	<i>Contenido de glicerol, metanol y fracción orgánica.</i>	30
Tabla 8.	<i>Composición de la fracción orgánica con saponificación.</i>	31
Tabla 9.	<i>Composición de la fracción orgánica sin saponificación.</i>	32
Tabla 10.	<i>Análisis elemental de glicerol crudo.</i>	33
Tabla 11.	<i>Composición de las muestras de glicerol crudo.</i>	33
Tabla 12.	<i>Valores máximos de parámetros de fermentaciones.</i>	35
Tabla 13.	<i>Efecto de las concentraciones en la PAL con respecto al blanco.</i>	40

Lista de Apéndices

Apéndice A. Relación absorbancia vs peso seco	52
Apéndice B. Medio MRS (Agar de Man, Rogosa y Sharpe)	52

Resumen

Título: Influencia de los Componentes Minoritarios del Glicerol Crudo sobre la Productividad de Ácido Láctico Producido por Vía Fermentativa.*

Autores: Jhonny Alexander Ortiz Solano**

Cristian Alejandro Bernal Novoa**

Palabras clave: Glicerol crudo, caracterización, compuestos minoritarios, *Lactobacillus rhamnosus*, fermentación, productividad.

Descripción: En bioprocesos, el glicerol crudo (CG) es una fuente de carbono atractiva para la síntesis de ácido láctico (AL) por vía fermentativa, especialmente utilizando bacterias ácido-lácticas debido a que no requiere ningún pretratamiento, lo que lo convierte en un compuesto de gran interés para su valorización. Pese a su potencial, aún no es claro el efecto que tienen los componentes minoritarios presentes en el CG sobre los procesos fermentativos para la producción de AL. Por lo tanto, en este trabajo se caracterizaron fisicoquímicamente 3 muestras de CG (S1, S2 y S3) provenientes de compañías colombianas productoras de biodiesel, y se seleccionaron el metanol, el jabón, la fase orgánica (FO) y sales (KCl y NaCl) como los componentes minoritarios cuya influencia se evaluó sobre la productividad del AL (PAL) usando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Durante el desarrollo experimental se evidenció que hubo crecimiento de la cepa, asimilación de CG y producción de AL por parte de la bacteria usando S1, S2 y S3, obteniéndose un máximo de PAL de 0.09 ± 0.02 (g)*(L*h)⁻¹ y concentraciones de AL de hasta 2.21 ± 0.00 (g)*(L)⁻¹ a un volumen de 500 ml en un periodo de fermentación de 55 horas a $S_0=10$ g/L, $T=37$ °C, $pH_0=6.5$ y a 200 rpm. Por último, se realizaron fermentaciones elaborando una muestra sintética con glicerol puro (PG) a 10 g/L con y sin adición del componente minoritario a diferentes concentraciones, para comparar y evaluar la influencia de este mediante prueba de Tukey. Para las muestras sintéticas se observó que, las máximas PAL 0.04 ± 0.00 (g)*(L*h)⁻¹ y 0.05 ± 0.00 (g)*(L*h)⁻¹ para concentraciones de jabones de 1 g/L y de metanol de 0.5 g/L, respectivamente. Las sales y la fase orgánica no mostraron tener efecto significativo ($p>0.05$).

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingenierías Química.
Director: Luis Javier López Giraldo, Ph.D en Ciencia de Alimentos y Ciencia de Procesos.

ABSTRACT

Title: Influence of the Minority Components of Crude Glycerol on the Production of Lactic Acid Produced by Fermentative Route.*

Authors: Jhonny Alexander Ortiz Solano**

Cristian Alejandro Bernal Novoa**

Keywords: Crude glycerol, characterization, minority compounds, *Lactobacillus rhamnosus*, fermentation, productivity.

Description: In bioprocesses, crude glycerol (CG) is an attractive carbon source for the synthesis of lactic acid (AL) by fermentation, especially when using lactic acid bacteria because it does not require any pretreatment, which makes it a compound of great interest for its valorization. Despite its potential, the effect of the minority components present in the CG in the fermentation processes for the production of AL, are not yet clear. Therefore, in this work, 3 samples of CG (S1, S2 and S3) from Colombian biodiesel producing companies were physicochemically characterized. The influence of minor components selected, such as methanol, soap, organic phase (FO) and salts (KCl and NaCl) was evaluated on the productivity of AL (PAL) using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. During the experimental development, it was evident that there was bacteria growth, an assimilation of GC and production of AL with the samples S1, S2 and S3. These samples obtained a maximum PAL of $0.09 \pm 0.02 \text{ (g)*(L*h)}^{-1}$ and had AL concentrations of up to $2.21 \pm 0.00 \text{ (g)*(L)}^{-1}$ at a volume of 500 ml in a fermentation period of 55 hours at $S_0=10 \text{ g/L}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $pH_0=6.5$ y a 200 rpm. Finally, fermentations were carried out by preparing a synthetic sample with pure glycerol (PG) at 10 g/L with and without the addition of the minor component at different concentrations to compare and evaluate the influence of this by Tukey test. For the synthetic samples, it was observed that the maximum PAL for soap concentrations of 1 g/L was $0.04 \pm 0.00 \text{ (g)*(L*h)}^{-1}$, whereas, $0.05 \pm 0.00 \text{ (g)*(L*h)}^{-1}$ was the maximum PAL of adding 0.5 g/L of methanol. The salts and the organic phase showed no significant effect ($p > 0.05$).

* Project degree

** Physical-chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School.
Director: Luis Javier López Giraldo, Ph.D in food and processing science.

Introducción

El glicerol crudo – CG por sus siglas en inglés- es el principal subproducto de la producción de biodiesel por transesterificación de lípidos y generalmente, equivale al 10% del biodiesel total producido (Yang, Hanna, & Sun, 2012). Actualmente existe un interés global por la producción de biodiesel y, en consecuencia, la necesidad de formular alternativas de gestión sostenible de sus subproductos. Sin embargo, el CG que se produce no es lo suficientemente puro para usarse directamente en aplicaciones tradicionales, lo que supone un problema debido a las grandes cantidades generadas, haciendo difícil su disposición final. Los principales componentes del CG en wt% son el glicerol (47.42%) y el agua (45.42%); y además, presenta un contenido de impurezas o componentes minoritarios tales como jabones (1.34%), metanol (3.57%), cenizas (2.85%) y sales (5.00%) (Moreno Yañez, 2015)(Elisa et al., 2019).

Una de las alternativas más atractivas para usar el CG es la producción de ácido láctico (AL) por vía fermentativa, utilizando bacterias ácido-lácticas; las cuales pueden sintetizar el CG sin ningún proceso de purificación y convertirlo en AL, producto con mayor valor agregado debido a su versatilidad de aplicaciones. El AL es un producto industrial de gran importancia y es empleado en industrias farmacéuticas, cosméticas, de alimentos y recientemente en la industria de los biopolímeros como precursor del ácido poli láctico (PLA). A nivel mundial, la demanda de AL va en aumento y se espera un crecimiento anual de más del 18% para el año 2022 (Market Research Engine, 2018). En general, el AL puede ser obtenido por vía fermentativa a partir de sustratos como melaza, lactosuero, materiales amiláceos y lignocelulósicos, almidones, hidrolizados de yuca, licor de maíz y azúcares (García, Arrázola, & Durango, 2010).

La purificación del CG da como resultado un glicerol con condiciones aptas para ser utilizado como materia prima en la industria farmacéutica y cosmética. No obstante, las empresas productoras de biodiesel optan por vender el CG sin ningún tratamiento adicional, ya que actualmente el proceso de purificación es muy costoso (Atadashi, Aroua, & Aziz, 2011; Chol, Dhabhai, Dalai, & Reaney, 2018). En el área de bioprocesos, el CG es un subproducto de gran interés, ya que puede constituirse como una fuente de carbono para la síntesis de diferentes bioproductos, tales como biopolímeros, hidrógeno, diferentes ácidos como el cítrico y el AL, etc.; lo que, sumado a su abundancia y a su bajo costo, hacen del CG un compuesto con gran potencial de valor agregado (Posada Duque & Cardona Alzate, 2010).

Para la aplicación del CG como sustrato por vía fermentativa, se han estudiado las capacidades de varios microorganismos, entre ellos la *Escherichia coli* que tiene la capacidad de fermentar el CG anaeróbicamente produciendo etanol e hidrógeno (Ceballos Munuera & Álvaro, 2015). Por otro lado, se han usado hongos filamentosos del género *Rhizopus* que producen AL a partir de glucosa o almidón, y las bacterias ácido lácticas (BAL) en especial las del género *Lactobacillus* que se han estudiado ampliamente para la producción de AL a partir de diferentes sustratos como materiales celulósicos, amiláceos, lactosuero, la melaza y licor de maíz, entre otros (García et al., 2010).

Pese a los estudios mencionados, no se ha determinado el efecto que tienen las impurezas o componentes minoritarios contenidos en el CG sobre los procesos de producción de AL por vía fermentativa. En consecuencia, el objeto de este proyecto será analizar la influencia de los compuestos minoritarios del CG en la producción de AL por vía fermentativa con la cepa *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la influencia de los componentes minoritarios del glicerol crudo en la obtención de ácido láctico por vía fermentativa empleando el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469*.

1.2 Objetivos Específicos

Caracterizar fisicoquímicamente tres muestras de glicerol crudo provenientes de la industria colombiana para la determinación de los compuestos principales y minoritarios.

Determinar la variabilidad de los compuestos minoritarios del glicerol crudo proveniente de tres plantas de biodiesel colombianas, mediante su caracterización fisicoquímica.

Evaluar la influencia de los compuestos identificados como potenciales sustratos en el proceso de producción fermentativa del ácido láctico.

2. Marco Teórico y Estado del Arte

Una de las etapas más importantes en la producción de biodiesel es la transesterificación. En ésta, los triglicéridos reaccionan con un alcohol, comúnmente metanol, en presencia de un catalizador, formando biodiesel como producto y glicerol como subproducto. El glicerol es un compuesto viscoso e incoloro, de densidad mayor que el agua que se puede aislar de la mezcla de biodiesel por procesos de decantación, aprovechando su alta densidad, obteniéndose en promedio un 10% en peso de la mezcla inicial (Yang et al., 2012). A su vez este subproducto contiene una concentración de glicerol entre el 40% y el 88% en peso, y cantidades variables de otros componentes como metanol, jabones y sales (Posada Duque & Cardona Alzate, 2010; Yang et al., 2012).

La biotransformación del glicerol llevada a cabo por métodos de fermentación microbiana permite obtener productos como el propanodiol, diferentes ácidos como el cítrico y AL, además de lípidos y polihidroxialcanoatos (PHA). Estos bioprocesos tienen la ventaja de menor inversión de tiempo y dinero, además de reducir el impacto ambiental que pueden causar los productos de desecho en las transformaciones químicas (Diaz Ruiz & Prada Palomo, 2012). Un claro ejemplo de este tipo de fermentación y en el cual se enfoca el presente trabajo de investigación, es la conversión del CG en AL por acción de las bacterias ácido-lácticas (BAL), específicamente el género *Lactobacillus sp.* El género *Lactobacillus* se encarga de producir la enzima lactasa, la cual convierte el azúcar lactosa en AL; esta propiedad ha sido aprovechada para la conversión del glicerol en AL, usando como fuente de carbono el CG.

En el año 2011, en la Universidad Industrial de Santander –UIS- Gómez y Cancino (Gómez & Cancino, 2011), aislaron la bacteria *Bacillus Circulans* del CG, y posteriormente empleando

este microorganismo y CG como única fuente de carbono y energía, se logró obtener una mezcla de compuestos en la que se detectó la presencia de iones que pueden ser precursores de polihidroxicanoatos (PHA) como el polihidroxibutirato (PHB), polihidroxicvalerato (PHV) y el copolímero de éstos; sin embargo, los autores declararon que es necesario mayores esfuerzos para caracterizar y cuantificar los posibles PHA.

Posteriormente, en el 2012 en la UIS Prada-Palomo y colaboradores realizaron una investigación acerca de la producción de AL a partir de CG, en este trabajo, usaron un consorcio bacteriano nativo y lo compararon con la cepa de interés del presente trabajo, *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469 (Prada-Palomo, Romero-Vanegas, Díaz-Ruíz, Molina-Velasco, & Guzmán-Luna, 2012). La capacidad de fermentación de las bacterias se evaluó a través de estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) y el proceso de fermentación se llevó a cabo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas durante 24 horas. Para este estudio, el consorcio nativo obtuvo mayor productividad volumétrica de AL que la ATCC 7469, en el caso del consorcio nativo a las 9 horas se obtuvo una productividad de 1.28 g/L*h, en contraste la cepa de referencia alcanzó una productividad de 0.83 g/L*h a las 6 horas de fermentación.

En el 2013, en la UIS, Lizcano y Gamboa realizaron un estudio cinético de la transformación del glicerol a AL utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en condiciones axénicas. En esta investigación se obtuvieron conversiones de CG a AL cercanas al 94.5%, mayores a las de glicerol puro – PG por sus siglas en inglés -, del 64% aproximadamente. Estos autores identificaron la necesidad de realizar estudios posteriores que expliquen la influencia de los componentes minoritarios presentes en el CG, sobre el mecanismo de transformación de la bacteria hacia los metabolitos de interés obtenidos (Gamboa & Lizcano, 2013), investigación que

se llevará a cabo mediante el presente trabajo, bajo las mismas condiciones de fermentación. En el mismo año, Sarma et al. realizaron un estudio en el que evaluaron el efecto de los componentes minoritarios del CG en la producción de hidrógeno gaseoso (Sarma et al., 2013), seleccionando como compuestos representativos el metanol, jabones y cloruro de sodio; los dos primeros mostraron un efecto inhibitorio sobre la cantidad de producto, en cambio se observó un efecto positivo con respecto al cloruro de sodio (NaCl) ya que este compuesto mantiene el balance osmótico del sistema lo que mejora la productividad de hidrógeno.

Luego, en el 2018 Sumitha, Mathelin, & Sivanandham realizaron un estudio sobre los efectos de los nutrientes mayoritarios (fuente de carbono y nitrógeno) y minoritarios del medio (sulfato de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y acetato de sodio) en la producción de AL usando CG empleando *Lactobacillus casei*. Después de realizar fermentaciones en medio líquido enriquecido, se concluyó que 15 g/L de CG semipurificado, 2 g/L NH_4SO_4 , 0.03 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1 g/L de acetato de sodio, fueron las concentraciones óptimas para la producción de AL (Sumitha, Christy Mathelin, & Sivanandham, 2018) con concentraciones de AL entre 1.5 g/L hasta un máximo de 2.85 g/L. Este trabajo concluye que es muy importante la optimización de las concentraciones de los compuestos (mayoritarios y minoritarios) del medio, así como la búsqueda de fuentes de nitrógeno de bajo costo.

En consecuencia, es esencial el estudio de la influencia de los componentes minoritarios del CG proveniente de plantas colombianas, en la productividad volumétrica, debido a que pueden tener un impacto positivo o negativo en la producción del AL.

3. Metodología

La metodología desarrollada en el presente trabajo de investigación consta de tres secciones; la caracterización de la muestra inicial, fermentación y la cuantificación de biomasa y metabolitos, tal como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología aplicada en el presente trabajo de investigación.

3.1 Caracterización del Glicerol Crudo

La caracterización del CG se realizó por diferentes métodos fisicoquímicos estandarizados bajo diferentes normas, cada método es descrito en el diagrama de la figura 2.

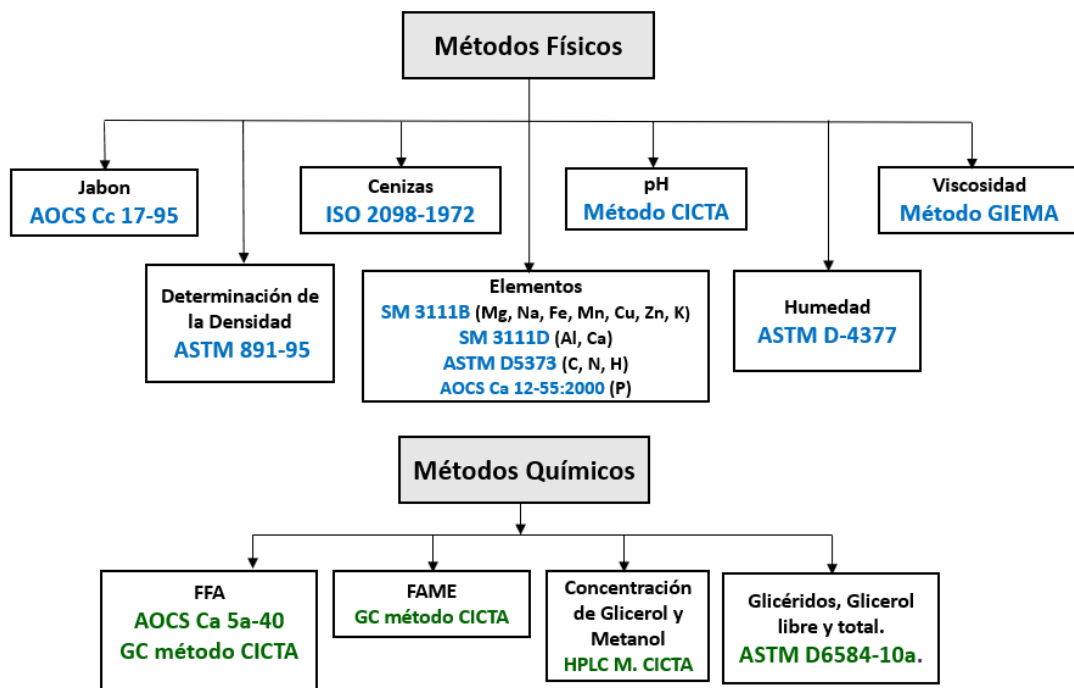


Figura 2. Métodos de caracterización fisicoquímicos del CG.

3.1.1 Propiedades físicas del glicerol. La densidad del CG se determinó bajo la norma ASTM 891-95 (2004) usando un picnómetro calibrado a temperatura ambiente. La viscosidad se obtuvo usando un reómetro (MCR 302 Anton Paar), mediante una curva de flujo de sesenta y cinco puntos con variación de velocidad de deformación a temperatura ambiente (25 ± 0.5 °C). Para el pH de la solución se disolvieron las muestras de glicerol (1.00 ± 0.1 g) en 50 mL de agua desionizada, luego se determinó el pH usando un pH-metro digital (SCHOTT Instruments Handylab pH11) a temperatura ambiente (23 ± 0.5 °C). El contenido de ceniza, se determinó bajo norma ISO 2098-1972, en horno a alta temperatura (Pal & Chaurasia, 2016). El contenido de jabón se estableció siguiendo la metodología de AOCS Cc 17-95 y ASTM D 4662-08 (Hu, Luo, Wan, & Li, 2012) y el contenido de humedad se realizó mediante titulación volumétrica de Karl-Fischer, empleando un titulador automático (Mettler Toledo T50) y balanza analítica (Mettler Toledo AB204) con referencia al método oficial ASTM D 4377 (Hu et al., 2012).

3.1.2 Propiedades químicas del glicerol. Se determinaron monoglicéridos totales (MONG), diglicéridos totales, triglicéridos totales y glicerina libre y total en ésteres metílicos (FAME) por el método ASTM D 6584 mediante cromatografía de gases Agilent Technologies 7890^a con la columna HP-88. El análisis elemental se realizó por absorción atómica (Agilent SpectrAA 240 S) método SM 3111B para magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), manganesio (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn) y potasio (K), y el método SM 3111 D para el aluminio (Al) y el calcio (Ca). Por otro lado, el carbono (C), nitrógeno (N), e hidrógeno (H) se determinaron por el método ASTM D 5373 por combustión (LECO CHN 2000 Analyser) y el fósforo (P) por el método de la AOCS Ca 12-55:2000 modificado CICTA por espectrofotometría (Thermo Spectronic Genesys 20)

A continuación, se realizó el fraccionamiento del CG con éter de petróleo por el método AOCS G 3-53 y se obtuvieron dos fases: acuosa y orgánica, cada una de éstas fue caracterizada. El contenido de glicerol libre y metanol se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia – HPLC con la columna COREGEL 107H (Thermo Dionex ultimate 3000) tomando en cuenta la metodología descrita por Gamboa y Lizcano (Gamboa & Lizcano, 2013; Hu et al., 2012). La determinación volumétrica de los ácidos grasos libres (FFA) se realizó de acuerdo al método Oficial AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 2017). El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó mediante cromatografía de gases Agilent Technologies 7890^a con la columna HP-88 por metodología CICTA (Nanda, Yuan, & Qin, 2014) y el análisis de glicéridos se hizo de acuerdo con el procedimiento recomendado por ASTM método estándar D6584-10^a (ASTM, 2017).

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA y Tukey entre las tres muestras de CG con cada uno de los parámetros caracterizados. De esta manera, se identificó si las muestras eran estadísticamente diferentes mediante los resultados de componentes minoritarios de las mismas.

3.2 Fermentaciones

En general, las fermentaciones se desarrollaron en un medio agar Man, Rogosa y Sharpe – MRS (Apéndice B) y MRS modificado; en último caso, la fuente de carbono es PG grado USP y CG de las tres muestras provenientes de industrias colombianas. Todas las fermentaciones se desarrollaron por triplicado, con volumen de fermentación total (V_f) de 500 mL y concentración inicial de sustrato (S_o) de 10 g/L (Gamboa & Lizcano, 2013), seleccionada a partir de trabajos anteriores como una concentración adecuada para la síntesis de ácido láctico sin presentar

inhibición por sustrato. Así mismo, las condiciones de fermentación se mantuvieron a temperatura de 37°C, agitación constante a 200 rpm y pH inicial (pH₀) de 6.5 para todos los casos, dado que se ha demostrado que son las variables óptimas de fermentación [21]. El tiempo de seguimiento de las fermentaciones fue de 50 horas en promedio.

A continuación, se realizó activación de una colonia en tubo falcón con 5 mL de MRS por 12 horas a 37 °C y a 200 rpm. Posteriormente, antes de realizar el inóculo en el medio de fermentación, se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Luego, se cambió el sobrenadante por MRS modificado y se aplicó vórtex (Gamboa & Lizcano, 2013). Para terminar, se inocularon los 5 mL en un volumen de 45 mL de MRS modificado y se fermentó entre 2 a 3 horas a las condiciones anteriormente mencionadas en este apartado. Lo anterior, redujo los tiempos de fermentación, y aseguró que la bacteria se encontrara en fase de crecimiento exponencial, de acuerdo con los valores de densidad óptica - D.O. Finalmente, se obtuvo un inóculo 10% v/v para la fermentación de 500 mL de MRS modificado para las tres muestras de CG.

El propósito de estas fermentaciones fue seleccionar la muestra de CG con la cual se obtuvieran los mejores resultados de fermentación en términos de tiempo, cambio de pH, fases de crecimiento bacteriano, concentración de biomasa, conversión de CG y glicerol USP, concentración y productividad volumétrica de AL. Además, la información obtenida permitió realizar una comparación del comportamiento fermentativo y cómo difieren las muestras entre sí debido a la diferencia en concentraciones de los componentes minoritarios de cada una y la ausencia de los mismos en el caso del PG USP.

3.3 Efecto de los componentes minoritarios

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

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

Todas las fermentaciones se desarrollaron por triplicado, con volumen de fermentación total (V_f) de 25 mL, ensayos destructivos y concentración inicial de sustrato (S_0) de 10 g/L (Gamboa & Lizcano, 2013), seleccionada a partir de trabajos anteriores como una concentración adecuada para la síntesis de ácido láctico sin presentar inhibición por sustrato. Igual que en el caso anterior, las condiciones de fermentación se mantuvieron a temperatura de 37°C, agitación constante a 200 rpm y pH inicial (pH_0) de 6.5 para todos los casos, dado que se ha demostrado que son las variables óptimas de fermentación (Gamboa & Lizcano, 2013; Sumitha et al., 2018). El tiempo de seguimiento de las fermentaciones fue de 12 horas en promedio. Se realizó toma de

muestra inicial y final para el seguimiento de la fermentación y el cálculo de productividad volumétrica global.

3.3.1 Efecto de los jabones. Los jabones que se encuentran en el CG son producto de la saponificación de los FFA del aceite que se emplea como materia prima. La reacción de saponificación compite con la transesterificación, por tanto, no es un compuesto minoritario deseable en el producto final. Sin embargo, es un problema común de la industria, y por tanto es deseable determinar su influencia en los límites para la utilización del CG en bioprocesos para generación de productos de valor agregado

La fermentación se llevó a cabo en un volumen de fermentación de 25 mL de medio MRS modificado en un Erlenmeyer de 250 mL. El jabón empleado en el presente trabajo se obtuvo de la muestra S2 de CG, debido a que contiene mayor FO. La síntesis se realizó de acuerdo al método descrito por Sarma et al (Sarma et al., 2013). En resumen, una muestra de 10 g CG se disolvió en 100 mL de agua destilada, la solución se mezcló con 100 mL de solución de NaOH-etanol 50 g / L. La mezcla se trasvasó en Erlenmeyer y se mantuvo en un baño de agua (90°C) con agitación (50 rpm) durante 1 hora. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se añadió un volumen igual de agua destilada y el jabón se precipitó usando NaCl (10% p/v). El jabón se separó de la solución por centrifugación (5000 g durante 20 minutos) y se dejó en el horno durante 2 horas antes de su aplicación. Se adicionaron las siguientes concentraciones de jabón:

Tabla 1.

Concentraciones de jabón adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0.03	0.5	1

3.3.2 Efecto del metanol. La fermentación se llevó a cabo en un volumen de fermentación de 25 mL de medio MRS modificado en un Erlenmeyer de 250 mL. El metanol empleado fue de tipo análisis MERCK EMSURE®. Se adicionaron las siguientes concentraciones de metanol:

Tabla 2.

Concentraciones de metanol adicionado (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0.5	1	2

3.3.3 Efecto de la fase orgánica (FO). La fermentación se llevó a cabo en un volumen de fermentación de 25 mL de medio MRS modificado en un Erlenmeyer de 250 mL. La FO empleada para este análisis fue obtenida previamente por el fraccionamiento del CG de la muestra S2 con éter de petróleo, como se describe en la sección 4.1.2. Se adicionaron las siguientes concentraciones:

Tabla 3.

Concentraciones de FO adicionada (g/L).

Bajo	Medio	Alto
0.04	0.1	0.2

3.3.4 Efecto del KCl y del NaCl. La fermentación se llevó a cabo en un volumen de fermentación de 25 mL de medio MRS modificado en un Erlenmeyer de 250 mL. Los reactivos empleados para este análisis (KCl y del NaCl) fueron obtenidos de reactivos de grado analítico MERCK EMSURE®. Se adicionaron las siguientes concentraciones de Cloruro de potasio (KCl):

Tabla 4.

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

Bajo	Medio	Alto
0.05	0.5	1

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

Tabla 5.

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

Bajo	Medio	Alto
0.5	1	1.5

3.4 Cuantificación de biomasa, sustrato y metabolitos.

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

Para las fermentaciones de Vf de 500 mL, la cuantificación de biomasa se realizó por dos métodos diferentes. En el primero, se realizó un seguimiento por D.O. en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO), a una longitud de onda de 540 nm. Luego, para la determinación del peso seco, se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugó (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R) a 5000 rpm 4°C por 15 minutos; finalmente el precipitado se secó a 60 °C en horno hasta peso constante por 24 horas. Así mismo, se construyó la relación

entre la absorbancia y el peso seco (Apéndice A) que permitió determinar la cantidad de biomasa en cada caso.

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

Para las fermentaciones de Vf de 25 mL, la cuantificación de biomasa se realizó únicamente por seguimiento de D.O en un espectrofotómetro de microplacas usando las condiciones descritas anteriormente. Así mismo, la cuantificación de metabolitos (AL) y sustrato (CG y glicerol USP) se determinó mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficacia – HPLC en las mismas condiciones de operación anteriores. Para este caso en particular, se realizaron sólo dos muestreos: uno inicial y otro final (Gamboa & Lizcano, 2013).

3.5 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando Statistica (TIBCO versión 13.5.0.17). Para la determinación de diferencias significativas entre los parámetros a estudiar y las medias de los experimentos, se realizaron pruebas de significancia de one-way ANOVA y Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

4. Resultados

4.1 Caracterización del Glicerol Crudo

4.1.1 Propiedades físicas del glicerol. La densidad de las tres muestras de CG varió de 1.24 a 1.26 g/cm³ mostrando un resultado similar al glicerol USP (1.26 g/cm³) (tabla 6). Entonces, se infiere que a pesar de que las muestras de CG tienen compuestos minoritarios en composiciones diferentes, éstos no tienen una influencia significativa sobre la densidad. En lo que respecta al pH de las muestras S1 y S2 obtuvieron un valor cercano al pH del glicerol USP de 5; mientras que el pH de la muestra S3 fue mayor, debido probablemente a la presencia de residuos de catalizador alcalino (NaOH o KOH), proveniente del proceso de producción de biodiesel. La viscosidad medida presenta valores de 164.16 a 362.31 mPa.s, ésta difiere en un rango del 64% con respecto al PG, como consecuencia de los diferentes compuestos minoritarios que poseen las muestras, especialmente al contenido de agua, ausente en el PG.

Tabla 6.

Propiedades físicas del glicerol crudo.

Muestra	Densidad (g/cm ³)	pH	Viscosidad (mPa.s)
Glicerol Puro	1.26 ± 0.00	5.00 ± 0.02	452.26 ± 1.38
S1	1.27 ± 0.00	5.41 ± 0.01	362.31 ± 0.14
S2	1.26 ± 0.00	6.08 ± 0.04	164.16 ± 0.45
S3	1.24 ± 0.00	8.77 ± 0.05	223.56 ± 6.21

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

4.1.2 Propiedades químicas del glicerol. El porcentaje de la fracción orgánica contenida en las muestras de CG varió desde 0.38% a 2.01% (tabla 7). El contenido de metanol en las tres muestras estuvo en el rango de 0.21% a 0.52%, una composición muy baja en todas las muestras

colombianas, teniendo en cuenta que es un 98% menos que lo reportado para muestras internacionales provenientes de industrias del aceite de soja, mezclas de diferentes aceites vegetales, entre otros (Hu et al., 2012; Moreno Yañez, 2015), pero corresponde a valores cercano a reportados para otros CG colombianos (Mellow & Banana, 2016; Moreno Yañez, 2015; Yañez Díaz, 2013). Lo anterior, podría indicar que los procesos de purificación de las industrias de biodiesel del presente estudio emplean tecnologías para la separación del metanol con resultados similares. En cuanto al contenido de glicerol total, se puede observar en la tabla 7 que fue en promedio un 0.5% mayor al glicerol libre; esto se debe a que en la saponificación los glicéridos presentes en el CG que no habían reaccionado, se convierten en glicerol (Hu et al., 2012).

Tabla 7.

Contenido de glicerol, metanol y fracción orgánica.

	Sin saponificación		Con saponificación	
	glicerol libre (wt %)	fracción orgánica (wt %)	glicerol total (wt %)	metanol (wt %)
S1	63.33 ± 0.84	0.48 ± 0.00	63.60 ± 0.66	0.52 ± 0.08
S2	69.90 ± 0.40	2.01 ± 0.01	70.19 ± 0.68	0.25 ± 0.07
S3	70.80 ± 1.26	0.38 ± 0.01	71.20 ± 0.27	0.21 ± 0.01

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

El análisis de los perfiles de ácidos grasos de los FFA de la fracción orgánica (tabla 8), muestran un alto contenido de ácido palmítico (44.69% - 46.09%), oleico (37.7% - 39.20%) y linoleico (9.02% - 9.76%) en las tres muestras de CG analizadas. Lo anterior, concuerda con la información suministrada por las industrias, donde las muestras empleadas provienen en su mayoría del aceite de palma.

Tabla 8.

Composición de la fracción orgánica con saponificación.

Ácidos Grasos (FA)	S1	S2	S3
Mirístico (wt %)	1.54 ± 0.00	1.00 ± 0.02	1.04 ± 0,33
Palmítico (wt %)	46.03 ± 0.08	46.09 ± 0.16	44.69 ± 0,12
Estearico (wt %)	4.05 ± 0.06	4.47 ± 0.15	4.69 ± 0,46
Oleico (wt %)	37.7 ± 0.12	39.18 ± 0.04	39.20 ± 0,70
Linoléico (wt %)	9.76 ± 0.03	9.02 ± 0.02	9.40 ± 0,27
Otros (wt %)	0.92 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.97 ± 0,35

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

Los FFA contenidos en las fracciones orgánicas de las tres muestras de CG varían de 40.79% a 76.83%. En la tabla 9 se puede observar que la muestra S3 contiene un 23.93% de glicéridos, superando a S1 y a S2 en un 50% y 40% respectivamente. En contraste, S3 tiene un menor contenido de FFA, lo que puede relacionarse en mejor calidad del biodiesel, e implícitamente del aceite empleado en su producción. En este sentido, se debe recordar que en la reacción de esterificación de los FFA se busca disminuir el valor de acidez con el fin de evitar la formación de jabón y emulsiones que puedan llegar a afectar el rendimiento de la transesterificación para la obtención del biodiesel.

Finalmente, en cuanto al análisis de FAMES se muestra un alto contenido de ácido palmítico (4.29% a 15.88%) y oleico (3.5% a 14.32%) en todos los casos, valores que están en concordancia con las materias primas empleadas y relacionados con los análisis anteriormente descritos.

Tabla 9.

Composición de la fracción orgánica sin saponificación.

Compuestos Fracción Orgánica		S1	S2	S3
FFA (wt%)		58.95 ± 2.19	76.83 ± 0.58	40.79 ± 0.51
Gliceridos (wt%)	mono-	4.81 ± 0.26	3.42 ± 0.02	6.27 ± 0.06
	di-	7.13 ± 0.18	10.86 ± 0.03	17.66 ± 0.27
FAMES (wt%)	Mirístico	0.28 ± 0.01	0.09 ± 0.08	0.40 ± 0.1
	Palmítico	12.28 ± 0.39	4.29 ± 2.08	15.88 ± 3.2
	Esteárico	1.31 ± 0.02	0.44 ± 0.33	1.57 ± 0.3
	Oleico	12.08 ± 0.24	3.5 ± 0.53	14.32 ± 1.4
	Linoléico	2.83 ± 0.16	0.49 ± 2.34	2.77 ± 2.1
	Otros	0.33 ± 0.02	0.08 ± 0.18	0.33 ± 0.01

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

El contenido de carbono en las muestras de CG analizadas (tabla 10) varía de 33.42% a 34.75%, éstos valores se obtienen por la presencia mayoritaria de compuestos minoritarios como jabones, FAMES y glicéridos. Además, estos resultados confirman que el CG es una fuente de carbono para las bacterias y que es un subproducto de valor agregado con potencial para ser un sustrato viable en las fermentaciones. Así mismo, el nitrógeno se presentó en un rango del 0.22% a 0.26%, lo que muestra la baja variabilidad de éste en las muestras y se infiere que, en contraste con el carbono, se necesitarían fuentes nitrogenadas adicionales para los requerimientos de crecimiento y mantenimiento de las bacterias durante el bioproceso.

Así mismo, en la muestra S1 se observa un alto contenido de potasio (390.73 ppm) y en la muestra S2 un alto contenido de sodio (1479.86 ppm); esto puede atribuirse al uso de catalizadores basados en K - Na, durante el proceso de producción de biodiesel y los residuos del mismo en los subproductos del proceso.

Tabla 10.

Análisis elemental de glicerol crudo.

Elementos	S1	S2	S3
C (wt%)	34.75 ± 0.26 ^A	34.63 ± 0.22 ^A	33.42 ± 0.06 ^B
N (wt%)	0.26 ± 0.03 ^A	0.22 ± 0.02 ^A	0.22 ± 0.00 ^A
H (wt%)	8.24 ± 0.02 ^B	8.49 ± 0.02 ^A	8.48 ± 0.03 ^A
Na (ppm)	1090.07 ± 10.59 ^A	1479.86 ± 126.89 ^B	934.28 ± 6.61 ^A
K (ppm)	390.73 ± 7.17 ^B	46.37 ± 0.00 ^A	41.42 ± 1.63 ^A
P (ppm)	68.08 ± 8.17 ^B	92.62 ± 2.04 ^B	31.16 ± 0.93 ^B
Ca (ppm)	26.8 ± 0.30 ^B	10.91 ± 0.76 ^B	3.64 ± 0.07 ^B
Mg (ppm)	10.42 ± 0.25 ^B	0.32 ± 0.01 ^A	0.63 ± 0.01 ^A
Fe (ppm)	7.08 ± 0.05 ^B	1.81 ± 0.01 ^B	1.26 ± 0.01 ^B
Cu (ppm)	0.70 ± 0.00 ^B	0.06 ± 0.01 ^B	0.03 ± 0.01 ^B
Al (ppm)	56.21 ± 0.59 ^B	0.68 ± 0.01 ^B	3.80 ± 0.06 ^B
Zn (ppm)	2.22 ± 0.00 ^B	< LC ^B	0.05 ± 0.00 ^B

Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar. El supra índice ^A indica que la concentración de los elementos caracterizados no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de CG y el índice ^B indica la presencia de diferencias significativas entre sí.

En la tabla 11 se puede observar la composición de cada una de las muestras representadas en seis componentes: glicerol libre, agua, cenizas, fase orgánica (glicéridos, FFAs y FAMES), jabón y metanol.

Tabla 11.

Composición de las muestras de glicerol crudo.

Compuesto	S1	S2	S3
Glicerol libre (wt%)	63.33 ± 0.84 ^B	69.85 ± 0.40 ^A	70.79 ± 1.26 ^A
Agua (wt%)	9.56 ± 0.04 ^A	9.63 ± 0.22 ^A	11.27 ± 0.04 ^B
Cenizas (wt%)	4.49 ± 0.06 ^B	5.20 ± 0.01 ^B	4.37 ± 0.00 ^B
FAMES, Gliceridos & FFAs (wt%)	0.48 ± 0.00 ^B	2.01 ± 0.01 ^B	0.38 ± 0.01 ^B
Metanol (wt%)	0.40 ± 0.08 ^B	0.15 ± 0.06 ^A	0.12 ± 0.02 ^A
Jabón (wt%)	0.30 ± 0.05 ^A	0.58 ± 0.07 ^B	0.20 ± 0.08 ^A

Datos expresados como las medias de dos replicas ± desviación estándar. El supra índice ^A indica que la concentración de los elementos caracterizados no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de CG y el índice ^B indica la presencia de diferencias significativas entre sí.

El glicerol libre y el agua en las tres muestras de CG componen en promedio el $78\% \pm 4.76$ (wt%) de la masa total. Por otra parte, se presentan bajas cantidades de metanol, jabón y FO en las tres muestras. La muestra S3 contiene el mayor contenido de glicerol crudo (70.79%) y de agua (11.27%).

4.2 Fermentaciones

4.2.1 Fermentación con glicerol USP y CG como fuente de carbono. En las cuatro fermentaciones realizadas, se pudo apreciar una adaptación positiva por parte de la bacteria respecto a la asimilación del CG como fuente de carbono principal, dado que se aprecia crecimiento bacteriano, consumo de las fuentes de carbono (CG y del PG USP) y producción de AL. En efecto, en la figura 4 se puede observar una tendencia típica de una curva de crecimiento bacteriano. En la primera parte, se tiene una fase de latencia de aproximadamente 2 horas y en seguida, una fase exponencial de 50 horas para todas las fermentaciones. Con respecto a trabajos anteriores (Diaz Ruiz & Prada Palomo, 2012; Gamboa & Lizcano, 2013), se obtuvo una fase exponencial larga, la causa probablemente es, que a diferencia de éstos, en el presente trabajo de investigación no se realizó ningún tipo de adaptación del microorganismo para evitar su modificación metabólica y asegurar la misma cepa en todos los experimentos.

En la tabla 12 se presentan los valores máximos para cada una de las fermentaciones en relación con la concentración de AL, biomasa y productividad volumétrica durante el tiempo del experimento.

Tabla 12.

Valores máximos de parámetros de fermentaciones.

	AL (g/L)	Biomasa (g/L)	P AL (t=6) (g*L*h ⁻¹)	%Conversion Glicerol
S1	1.78 ± 0.15 (t=49h)	1.84 ± 0.02	0.06 ± 0.01	100 ± 1.21 (t=49h)
S2	2.20 ± 0.09 (t=55h)	1.83 ± 0.02	0.05 ± 0.00	93.01 ± 0.98 (t=49h)
S3	2.21 ± 0.00 (t=55h)	1.79 ± 0.04	0.09 ± 0.02	96.24 ± 1.75 (t=55h)
PG USP	2.56 ± 0.16 (t=51h)	2.04 ± 0.05	0.1 ± 0.02	89.41 ± 1.14 (t=51h)

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

Desde el inicio de la fermentación hasta la hora 50, se presentó un aumento en la concentración de AL (figura 5) llegando a los valores máximos al final del tiempo de seguimiento del experimento. Después de este tiempo, la producción de AL se detuvo debido al agotamiento de CG (figura 3) que era la fuente de carbono principal. En el caso del PG, la concentración de AL siguió en un aumento gradual, dado que no se presentó agotamiento total de éste quedando aproximadamente el 10% por consumir.

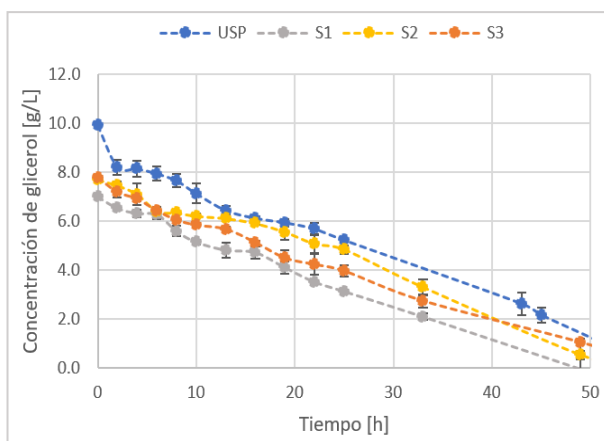


Figura 3. Concentración de sustrato (glicerol) vs tiempo. So=10 g/L, T=37°C, pHo=6.5 a 200 rpm.

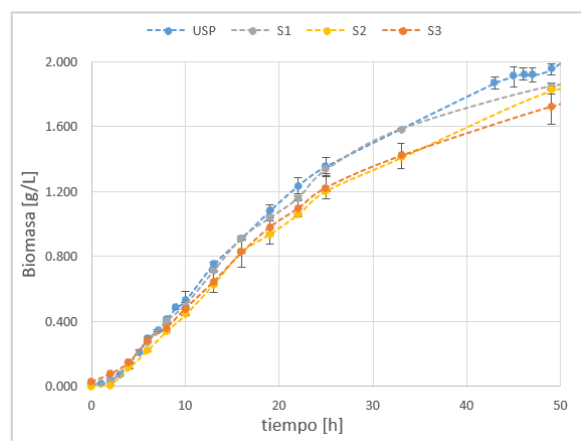


Figura 4. Biomasa vs tiempo. So=10 g/L, T=37°C, pHo=6.5 a 200 rpm.

De igual manera, en la figura 5 se puede apreciar que las concentraciones de AL de la muestra S3, durante 45 horas de fase exponencial, son las mayores comparadas con las de S1 y S2, con valores cercanos a las de la muestra de PG USP. Sin embargo, después de la hora 50 la disponibilidad de CG en las muestras S1, S2 y S3 disminuye por agotamiento y las concentraciones de AL experimentan el mismo comportamiento. Entonces, se plantea la posibilidad de que el metabolismo de la bacteria puede adaptarse y consumir el AL producido frente a la ausencia del sustrato principal.

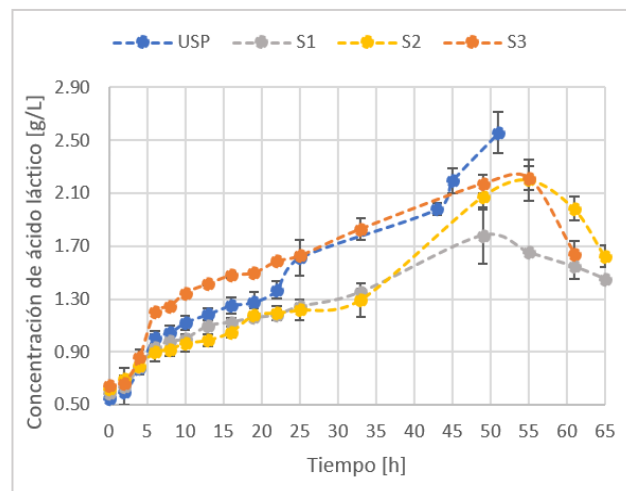


Figura 5. Concentración de ácido láctico vs tiempo.
So=10 g/L, T=37°C, pHo=6.5 a 200 rpm.

En la figura 6 se observa que en todas las fermentaciones hubo una disminución continua de pH durante todo el proceso, desde el $\text{pH}_0 = 6.5 \pm 0.00$ hasta valores promedio finales de 4.70 ± 0.00 a 4.53 ± 0.00 , confirmando la producción continua del AL. Al respecto, *de Lima* et al concluyeron que cuando el medio de fermentación alcanza un pH de 4, la producción de AL se detiene, (de Lima, Coelho, Da Silva, Alvarez, & Contiero, 2010) debido a que la naturaleza ácida del caldo inhibe el crecimiento microbiano.

Sin embargo, en el presente estudio, no se presentó inhibición por pH en ninguno de los experimentos y la fermentación y la producción de AL continuo hasta el agotamiento total del CG.

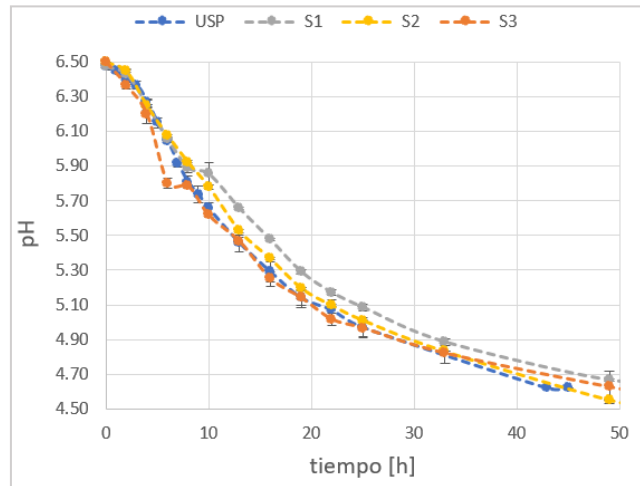


Figura 6. Perfiles de pH vs tiempo. $S_0=10$ g/L, $T=37^\circ\text{C}$, $pH_0=6.5$ a 200 rpm.

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

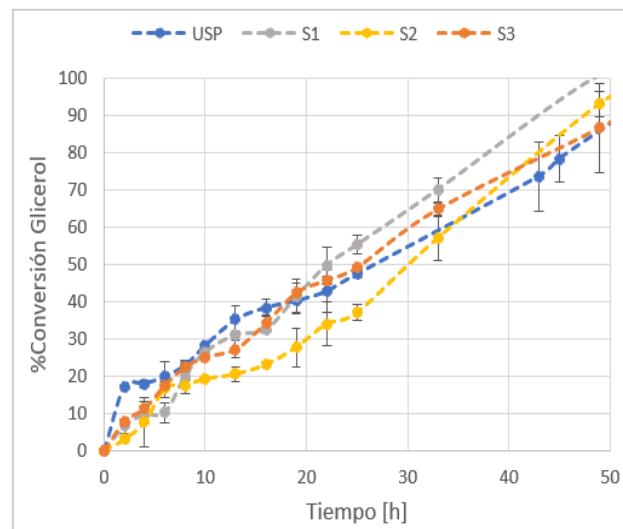


Figura 7. Porcentaje de conversión (glicerol) vs tiempo. $S_0=10$ g/L, $T=37^\circ\text{C}$, $pH_0=6.5$ a 200 rpm.

En la figura 7 se observa una conversión alta para todos los casos. Por ejemplo, en las muestras de PG USP, S2 y S3 fue de $89.41\% \pm 2.65$, $93.01\% \pm 3.42$ y $86.5\% \pm 1.48$ respectivamente. De hecho, en el caso de la muestra S1 el CG se consumió en su totalidad equivalente a una conversión del $100\% \pm 0.01$.

Este fenómeno pudo presentarse por dos razones principalmente, la primera es que la muestra S1 contiene el menor porcentaje de PG de todas, por tanto, es más fácil de metabolizar por la bacteria en menor tiempo. La segunda, es que dicha muestra también es la segunda en contenido de otros compuestos minoritarios diferentes al agua. Por esa razón, se puede suponer una influencia positiva por estas impurezas en cuanto al consumo de la fuente de carbono y la combinación de los factores descritos. No obstante, esta muestra es la que sintetiza menor concentración de AL.

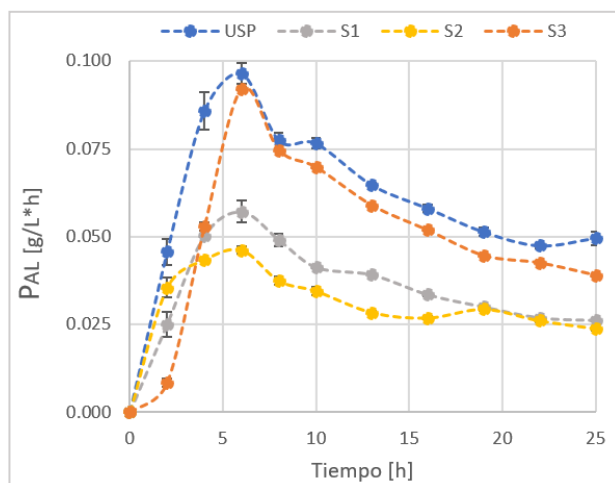


Figura 8. Productividad del ácido láctico vs tiempo.

$S_o=10$ g/L, $T=37^\circ\text{C}$, $p\text{H}_o=6.5$ a 200 rpm.

Con respecto a la productividad volumétrica, en la figura 8 se muestra una curva típica de velocidad de producción de AL, y de ésta se concluye que, para todas las muestras a las 6 horas de fermentación, es donde se produce la productividad máxima. Por una parte, la muestra S3

describe una tendencia muy similar PG USP y mayores a las muestras S1 y S2 en un 61% y 100%.

4.3 Efecto de los componentes minoritarios

La selección de los componentes minoritarios cuyo efecto se evaluó en el presente trabajo, se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, fueron excluidos los componentes mayoritarios, el glicerol y agua, debido a que no son objeto del presente estudio. En segundo lugar, se seleccionaron los compuestos minoritarios caracterizados restantes: fase orgánica (FAMEs, Glicéridos y FFA), metanol y jabones. Por último, las cenizas no fueron seleccionadas directamente, dado que, diversos estudios han concluido que éstas son producto del exceso de catalizadores principalmente K y Na los cuales son empleados durante el proceso de transesterificación del biodiesel (Ormaz, 2010). Generalmente, los catalizadores son adicionados como NaOH y KOH, están compuestos de sodio y potasio en base alcohólica; y en efecto, en el análisis elemental el Na fue 35.72%, 52.83% y 54.04% % y el K 12.79%, 1.66%, 2.40% en S1, S2 y S3 respectivamente. Por esto, se eligieron los compuestos NaCl y KCl para evaluar su influencia en la productividad, debido a que son las principales sales inorgánicas generadas en el proceso (Adnan, Suhaimi, Abd-Aziz, Hassan, & Phang, 2014; Datta, Lin, & Snyder, 2014).

En la tabla 13 se observa la influencia de cada uno los componentes minoritarios evaluados sobre la productividad global del AL. En cada uno de los casos se determinó si la influencia fue significativa o no, y su efecto sobre la PAL, empleando una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Así, los signos positivos representan la influencia significativa de los componentes reflejada en aumento de PAL; mientras que, los signos negativos representan que no existe una influencia

significativa en la fermentación con respecto al experimento desarrollado con PG USP, que se tomó como blanco.

Tabla 13.

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

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

4.3.1 Efecto de los jabones. La máxima productividad global de AL (0.04 ± 0.00 (g)*(L*h)-1) se obtuvo cuando la concentración de jabones en el medio de fermentación fue de 1 g/L. La productividad global a esta concentración es mayor y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) en comparación con los medios con menor concentración.

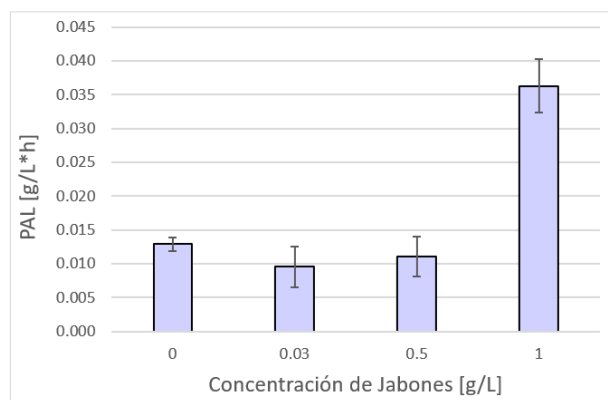


Figura 9. Efecto de los jabones en la productividad global de ácido láctico.

En la investigación realizada por Sarma (2014), se estudió el efecto inhibitorio de los jabones presentes en el CG sobre las bacterias, y se encontró que contrario a lo esperado, la remoción de más del 7% de este compuesto tenía efectos negativos sobre la productividad. Lo anterior, se

debe a que, al parecer, el jabón es utilizado por la bacteria como un cosustrato, y al remover este compuesto, proporcionalmente disminuye la relación C-N del medio y causaría la disminución de producción del metabolito (Sarma, Brar, Le Bihan, Buelna, & Soccol, 2014). Entonces, este fenómeno mejoró la metabolización del CG por parte de la bacteria en el medio y por lo tanto la productividad del AL fue 2.81 veces mayor con respecto al PG.

4.3.2 Efecto del metanol. La máxima productividad global de AL $0.05 \pm 0.00 \text{ (g)*(L*h)}^{-1}$ se obtuvo a una concentración de 0.5 g/L, lo que es 1.73 veces mayor en comparación a los resultados obtenidos en el medio de PG (sin metanol), y su efecto fue estadísticamente diferente con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$).

Según la investigación de Venkataramanan (2011) empleando una cepa *Clostridium*, se descubrió que el metanol a bajas concentraciones no tiene efectos negativos en la producción de metabolitos. De hecho, a concentraciones altas, de 5 g/L que equivaldría al 20% de glicerol crudo, el efecto sobre el crecimiento y metabolismo de la bacteria fue mínimo; entonces, los resultados obtenidos en el presente trabajo están en armonía con dichas conclusiones, debido a que no se observó ningún efecto negativo en cuanto a la productividad del AL (Samul, Leja, & Grajek, 2014).

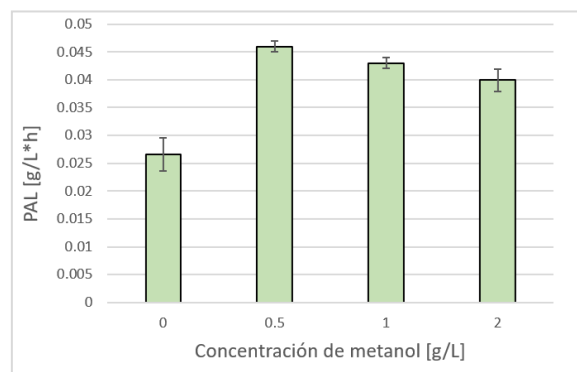


Figura 10. Efecto del metanol en la productividad global de ácido láctico.

4.3.3 Efecto de la fase orgánica (FO). Los valores de PAL en todas las concentraciones menores a 0.2 g/L de FO evaluadas, no evidencian efectos o diferencias significativas. En la investigación de Venkataramanan (2011) se demuestra que los ácidos grasos afectan directamente la utilización del CG como fuente de carbono, dependiendo principalmente de su grado de insaturación: a mayor insaturación, más negativos son para la fermentación. Por ejemplo, el ácido graso más perjudicial es el linoleico y el caso contrario, son los ácidos oleico y esteárico (Venkataramanan et al., 2012). La FO que se extrajo de la muestra S2 de CG, y que fue empleada para realizar los experimentos, está compuesta en un 90.74% de ácidos saturados (ácido palmítico, oleico, esteárico y mirístico) y 9.02% de ácidos insaturados (linoleico) como se observa en la tabla 8.

En este caso, los valores de PAL no se afectaron significativamente, obteniendo un máximo de 1.06 veces más AL que la muestra de PG. Además, otra causa de este comportamiento es que se evaluaron concentraciones pequeñas, seleccionadas de acuerdo a la caracterización obtenida de las muestras de CG.

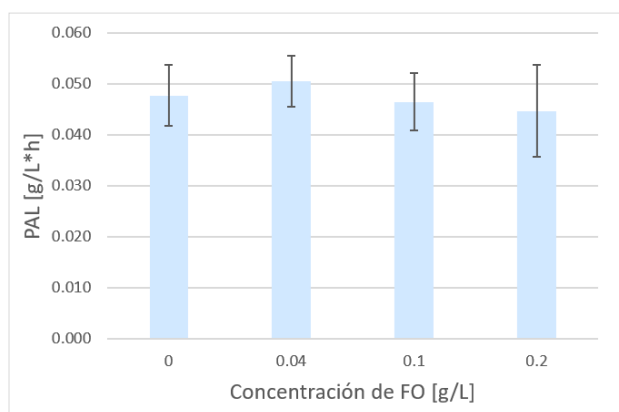


Figura 11. Efecto de la fase orgánica en la productividad global de ácido láctico.

4.3.4 Efecto del KCl y del NaCl. En general, se obtuvieron valores muy cercanos de PAL para todas las fermentaciones, tanto para el NaCl como para el KCl, en un rango entre 0.039 y 0.046 g/L*h. En efecto, Venkataramanan (2011) concluyó que no hay efectos negativos sobre el crecimiento y metabolismo de la bacteria en CG con porcentajes de hasta 10% (wt%) de sales en el medio de fermentación, empleando *Clostridium* (Venkataramanan et al., 2012).

Algunos estudios sugieren que contenidos de sal mayores a 10 g/L pueden llegar a ser tóxicos para algunos microorganismos; aun así, bacterias como las *E. coli* SS1 fueron capaces de tolerar altos contenidos de sal (15 g/L) sin reducir la síntesis de producto (Adnan et al., 2014). Sin embargo, en esta investigación las mayores concentraciones de sales evaluadas fueron de 1.5 g/L y 1 g/L de Na y K respectivamente, y los resultados ANOVA indicaron que los efectos de la concentración de sal sobre la PAL no fueron significativos.

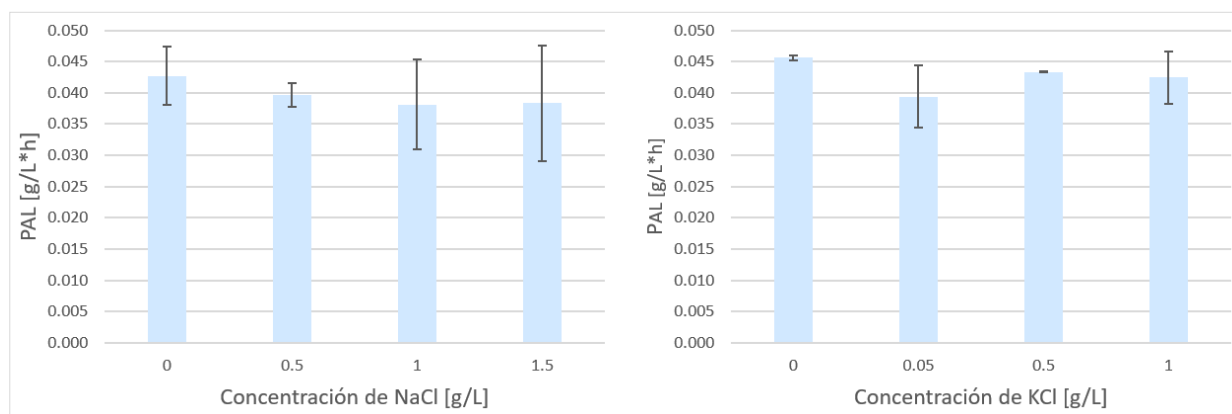


Figura 12. Efecto del NaCl y KCl en la productividad global de ácido láctico.

4. Conclusiones

Las muestras de CG colombiano se caracterizaron usando los siguientes parámetros. En primer lugar, una densidad promedio de 1.26 ± 0.01 g/cm³; las muestras S1 y S2 mostraron valores de pH cercanos al del PG de 5.41 ± 0.01 y 6.08 ± 0.04 respectivamente; mientras que la muestra S3

mostró un resultado de 8.77 ± 0.05 , probablemente por trazas de catalizadores básicos usados para el proceso de transterificación. Por otro lado, la viscosidad presenta valores de 164.16 ± 0.45 a 362.31 ± 0.14 mPa.s, ésta difiere en un rango del 64% con respecto al PG. Así mismo, en la caracterización de las muestras se consideraron los siguientes componentes: glicerol libre, agua, cenizas, fase orgánica (glicéridos, FFAs y FAMES), jabón y metanol; se evidenció que en promedio el $78\% \pm 4.76$ (wt%) corresponde al glicerol libre y al agua.

En cuanto al análisis elemental, todos los CG evaluados fueron estadísticamente iguales para el nitrógeno con un nivel de confianza del 95%; mientras que las mayores diferencias se encontraron para los contenidos de cenizas, P, Ca, Fe, Cu, Al, y Zn. Estas diferencias pueden explicarse por la variabilidad en los parámetros de los procesos de transesterificación que emplean cada una de las industrias colombianas de biodiesel, así como los métodos de extracción del biodiesel.

Con respecto a las fermentaciones desarrolladas, se obtuvieron concentraciones máximas en estado estacionario de AL de 1.78 ± 0.15 g/L, 2.20 ± 0.09 g/L, 2.21 ± 0.00 g/L y 2.56 ± 0.16 g/L y conversiones de $100\% \pm 0.01$, $93.01\% \pm 3.42$, $86.5\% \pm 1.48$ y $89.41\% \pm 2.65$ para las muestras S1, S2, S3 y PG USP, respectivamente. El comportamiento del PG y la muestra S3 fueron las que presentaron menos diferencias significativas y mejor desempeño. Por ejemplo, después de 25 horas de fermentación se alcanzaron concentraciones de AL fueron de 1.61 ± 0.14 g/L y 1.63 ± 0.02 g/L, respectivamente. Este comportamiento puede explicarse por el alto contenido de glicerol (70.79 ± 1.26 %) y al bajo contenido de metanol (0.12 ± 0.02 %) encontrado en S3. De igual forma, las máximas PAL en todas las muestras de CG se presentaron a la hora 6.

Además, tanto la producción de AL como el crecimiento de la bacteria se detuvieron por agotamiento del sustrato y no por las condiciones del proceso, ya que a la hora 50 el pH del

medio sigue siendo idóneo. Por otra parte, se observó que después del consumo total del glicerol, la concentración de AL disminuyó, probablemente porque la bacteria estaría asimilando AL y sintetizándolo en otros productos.

Respecto a los componentes minoritarios, la mayor PAL ($0.04 \pm 0.00 \text{ (g)} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) se obtuvo a concentraciones de jabón de 1g/L, una de las razones de este comportamiento es que el jabón podría actuar como cosustrato de la bacteria haciendo que la disponibilidad de glicerol en el medio y la PAL mejoren. En cuanto al metanol, no se evidenciaron efectos negativos en la PAL como se mostraba en otros estudios, probablemente debido a las bajas concentraciones evaluadas. De igual manera, no se evidenciaron efectos significativos ($p > 0.05$) en cuanto al impacto de las sales (NaCl como para el KCl) y a la FO.

5. Recomendaciones

Se recomienda realizar una adaptación del microorganismo, con el fin de reducir el tiempo de fermentación y mejorar la PAL frente a concentraciones de CG mayores.

Se recomienda realizar estudios sobre la posible asimilación del AL por parte de la cepa utilizada, especialmente frente fenómenos de agotamiento de la fuente principal de fuente de carbono y largos tiempos de fermentación.

Se recomienda evaluar el efecto de los componentes minoritarios en rangos de concentración mayores, especialmente a la influencia del jabón sobre la PAL, ya que esto permitiría validar el uso de este compuesto como un cosustrato en la fermentación. Así mismo, sustentaría la viabilidad de empelar el CG sin ningún tipo de pretratamiento para la síntesis de AL.

Referencias Bibliográficas

- Adnan, N. A. A., Suhaimi, S. N., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., & Phang, L. Y. (2014). Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>
- AOCS. (2017). AOCS Official Method Ca 5a-40. Retrieved June 30, 2019, from <https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEBusiness/Default.aspx?TabID=251&productId=111480>
- ASTM. (2017). ASTM D6584 - Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography. <https://doi.org/10.1520/D6584-13E01>
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., & Aziz, A. A. (2011). Biodiesel separation and purification: A review. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.07.019>
- Ceballos Munuera, Á., & Álvaro. (2015). *Mutagénesis dirigida en E. coli para la mejora genética en la producción de biocombustibles*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10498/17633>
- Chol, C. G., Dhabhai, R., Dalai, A. K., & Reaney, M. (2018). Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses. *Fuel Processing Technology*, 178(May), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.05.023>
- Datta, S., Lin, Y. J., & Snyder, S. W. (2014). 5 - *Current and emerging separations technologies in biorefining***The Publishers wish to acknowledge that this chapter is reproduced with

the permission of Argonne National Laboratory, operated by UChicago Argonne, LLC, for the US Department of Energy und (K. B. T.-A. in B. Waldron, Ed.).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857097385.1.112>

de Lima, C. J. B., Coelho, L. F., Da Silva, G. P., Alvarez, G. L. M., & Contiero, J. (2010). L(+)

Lactic acid production by new *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2(3), 64–69. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000025>

Diaz Ruiz, P. M., & Prada Palomo, Y. (2012). Estudio comparativo de las transformaciones del glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel en ácido láctico por una cepa nativa de *lactobacillus* sp y *lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Elisa, C., Oro, D., Bonato, M., Oliveira, J. V., Vinícius, M., Luis, M., & Marcos, R. (2019). Journal of Environmental Chemical Engineering A new approach for salts removal from crude glycerin coming from industrial biodiesel production unit. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102883. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102883>

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

Gamboa, J., & Lizcano, V. (2013). *Estudio de la fermentación del glicerol crudo para la obtención de ácido láctico empleando lactobacillus rhamnosus ATCC 7469: propuesta preliminar de un modelo cinético*. Universidad Industrial de Santander.

Garcia, C. A., Arrázola, G. S., & Durango, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica.

- Gómez, J. R., & Cancino, J. F. (2011). Caracterización de los productos obtenidos a partir de la fermentación de glicerol crudo con microorganismos nativos. *Universidad Industrial de Santander*, (July).
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., & Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921. <https://doi.org/10.1021/jf3008629>
- Market Research Engine. (2018). Lactic Acid Market is Projected to Reach US\$ 4 Billion by 2022 - MarketWatch. Retrieved June 13, 2019, from <https://www.marketwatch.com/press-release/lactic-acid-market-is-projected-to-reach-us-4-billion-by-2022-2018-06-17>
- Mellow & Banana. (2016). Importex - Glicerinas. Retrieved from <https://www.importex.com.co/es/productos/glicerinas-2/>
- Moreno Yañez, P. A. (2015). *Estudio de la producción de Polihidroxibutirato (PHB) por bacillus sp. utilizando glicerol de la industria de la industria del biodiesel como fuente de carbono*. 3(2), 54–67.
- Nanda, M., Yuan, Z., & Qin, W. (2014). Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and product characterization. *Austin Journal of ...*
- Ormaz, J. (2010). *Aprovechamiento energético del glicerol como combustible de segunda generación*. 32–45.
- Pal, P., & Chaurasia, S. P. (2016). Characterization of Crude and Purified Glycerol from Biodiesel Production and Purification Techniques. *Vth International Symposium on "Fusion of Science & Technology*, 393–397.
- Posada Duque, J. A., & Cardona Alzate, C. A. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiesel. *Ingeniería y Universidad*.

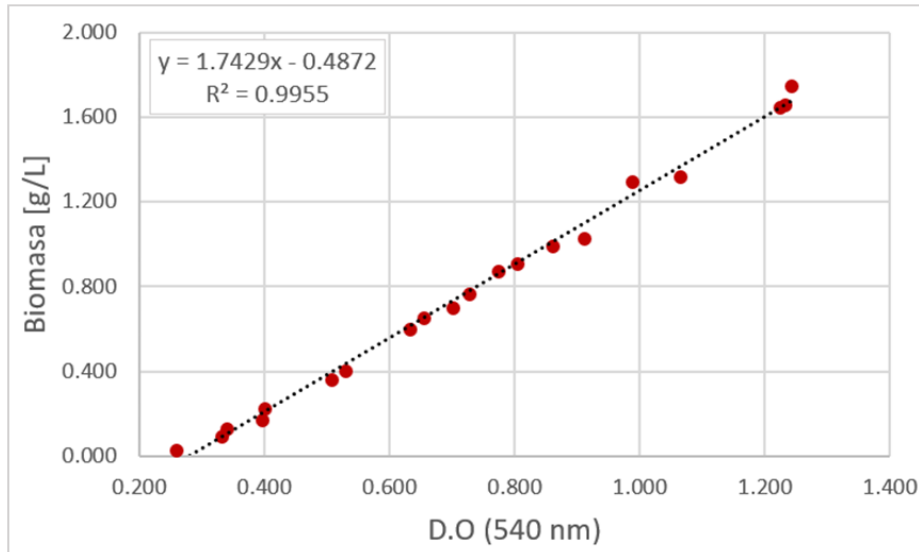
- Prada-Palomo, Y., Romero-Vanegas, M., Díaz-Ruíz, P., Molina-Velasco, D., & Guzmán-Luna, C. (2012). Lactic Acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*.
- Samul, D., Leja, K., & Grajek, W. (2014). Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Annals of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0767-x>
- Sarma, S. J., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Soccol, C. R. (2014). Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol - A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.042>
- Sarma, S. J., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Verma, M. (2013). Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.007>
- Sumitha, V., Christy Mathelin, R., & Sivanandham, M. (2018). Effect of major and minor nutrients on lactic acid production using biodiesel waste-derived crude glycerol as a carbon source by *Lactobacillus casei* NCIM 2125. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 40(11), 1322–1331. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1475519>
- Venkataramanan, K. P., Boatman, J. J., Kurniawan, Y., Taconi, K. A., Bothun, G. D., & Scholz, C. (2012). Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1325–1335. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3766-5>
- Yañez Díaz, C. J. (2013). *Extracción y caracterización de polihidroxitirato producido a partir*

de Bacillus megaterium ATCC 14581 utilizando glicerol residuo de la industria de biodiesel como fuente de carbono. Universidad Industrial de Santander.

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

Apéndices

Apéndice A. Relación absorbancia vs peso seco



Apéndice B. Medio MRS (Agar de Man, Rogosa y Sharpe)

Sustancia	Sólido [g/L]	Líquido [g/L]
di-amonio hidrógeno citrato	2	2
Extracto de carne	8	8
Extracto de levadura	4	4
Glucosa	10	10
Magnesio Sulfato (7)	0.2	0.2
Manganeso II Sulfato (1)	0.05	0.05
Peptona bacteriológica	10	10
di-Potasio Hidrógeno fosfato (3)	2	2
Acetato de sodio (3)	5	5
Tween 80	1	1
Agar	10	0

Fuente: PANREAC, 2012.