

**Universidad de Matanzas**  
**Facultad de Ciencias Técnicas**  
**Departamento de Química e Ingeniería Química**



# **Trabajo de Diploma**

**Título:** “Evaluación técnica de dos métodos de ruptura de células de levadura *Rhodotorula sp.* para la obtención de lípidos.

**Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico**

**Autor:** Yuliet Rojas Elizalde

**Tutor:** M.Sc Arley Pérez Rojas

**Matanzas, Cuba**

**Junio 2016**

## **Declaración de autoría:**

Yo, Yuliet Rojas Elizalde, declaro ser el único autor de este trabajo de diploma y lo pongo a disposición de la Universidad de Matanzas, para hacer uso del mismo con el objetivo y finalidad que se estime conveniente siempre que se respete la procedencia del mismo, quedando prohibida la reproducción total o parcial de este documento.

---

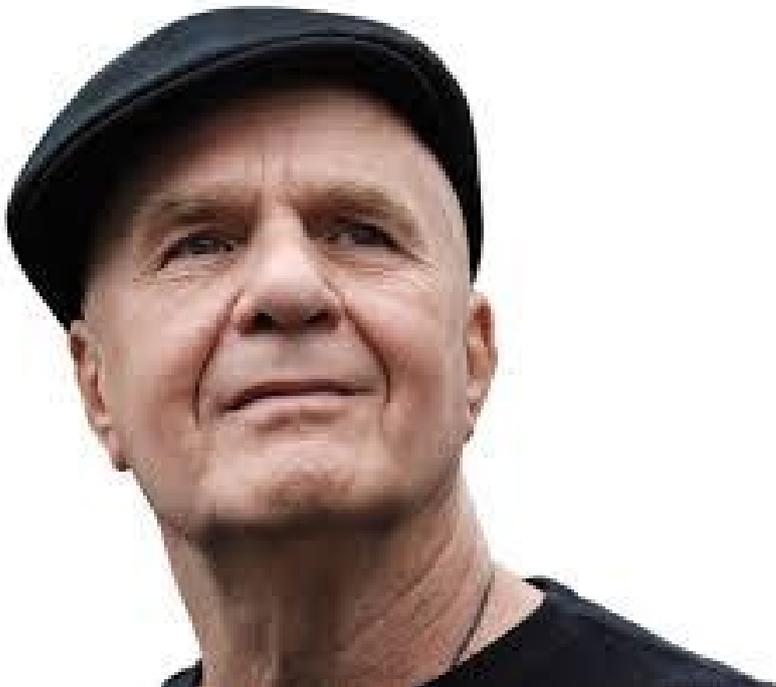
Yuliet Rojas Elizalde



PENSAMIENTO:

*“Tus milagros están dentro del trabajo que realizas. Vete allí y crea la magia que buscas en la vida”*

*Wayne W. Dyer*



## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi mamá por ser la luz que me hace seguir siempre adelante para no defraudarla.

A la memoria de mis abuelos, por sentir siempre, que a pesar de no estar aquí desde hace tiempo, están conmigo día a día.

A mi papá, que a pesar de no ser el mejor orador de alguna forma siempre se hizo sentir.

A mi hermano, por tener siempre algo gracioso, para desaparecer por ratos mis preocupaciones.

A mi tutor y mis amigos leales, por su apoyo y comprensión.

## **Agradecimientos:**

A mi mamá, mi heroína, por su apoyo incondicional en todas mis decisiones y todos mis sueños, por guiar mis pasos desde el día en que nací y hasta el día de hoy, por confiar ciegamente en mí y ser lo que más importante en mi vida.

A mi papá y a mi hermano por estar siempre para mí y brindarme de una forma u otra todo el cariño que me han dado.

A mi tutor Arley Pérez Rojas, por ofrecerse a tutorear mi tesis, por la ayuda incondicional, sus conocimientos y experiencia brindada, por brindarme su amistad, por las horas dedicadas, incluso, sacrificando las de descanso y en ocasiones hasta de sueño, por ayudarme a cumplir un objetivo propuesto, obtener mi título de Ing. Químico.

A la profesora Marlene y el profesor Héctor, de la Facultad de Agronomía, por todo el conocimiento y la ayuda brindada.

A la profesora Irina Pedroso por toda la cooperación en la confección de esta investigación.

Al Ing. José Luis LaucERICA, por su amistad brindada, por sacarme siempre una sonrisa cuando más lo necesitaba.

Es difícil vencer 5 años en una carrera sin tener nada que agradecerle a los profesores, por ese motivo agradezco a todos aquellos que a lo largo de estos años de estudio, de una forma u otra influyeron en mi formación como profesional y como persona.

A Rodney González Alderete, por todo el apoyo dado para poder haber llegado hasta aquí y por ser un amigo incondicional.

A los técnicos de laboratorio por toda la ayuda para que se concluyera con éxitos esta investigación.

A mis compañeros de clases por su amistad.

A todos, muchas gracias...

## Resumen.

El potencial que poseen algunas cepas de levaduras para producir lípidos ha llamado la atención de los investigadores en los últimos años. La producción de biodiesel a partir de levaduras pudiera ser económico se optimizan algunas variables para su producción. En este estudio se comparó dos métodos de ruptura de células de levadura *Rhodotorula sp.* para obtener lípidos. Un método químico caracterizado por la hidrólisis de los componentes de la pared celular y un método físico, a través de la exposición a ondas ultrasónicas, el método químico mostró ser más eficiente en la ruptura celular al recuperarse 4,4 g/L de lípidos a una concentración de HCl 4Mol/L, mientras que el ultrasonido 3,45 g/L de lípidos con un tiempo de exposición de 20 min. Los parámetros cinéticos de la levadura *Rhodotorula sp* obtenidos de la fermentación en el reactor fueron, producción de biomasa 16,20 g/L  $Y_{x/s} = 30,1\%$ ,  $C_s$  de 99,38 % y  $\mu_{m\acute{a}x} = 0,31h^{-1}$ . Se realizó el escalado del reactor según el criterio P/V de 0,5L a 100L.

**Abstrac.**

The potential to have some yeast strains to produce lipids has attracted the attention of researchers in recent years. Biodiesel production from yeast could be economical if some variables are optimized for production. In this study, two methods of cell disruption *Rhodotorula sp*, for lipids was compared. A chemical method, characterized by the hydrolysis of the components of the cell wall and a physical method, by exposure to ultrasonic waves. The chemical method proved more efficient cell disruption to recover 4,4 g/L lipid at a concentration of HCl 4Mol/L, while ultrasound 3,45g/L lipid with an exposure time of 20 min. The kinetic parameters of *Rhodotorula sp*, were obtained from fermentation in the reactor, biomass production 16,20 g / L growth yield efficient  $Y_x / s = 30,1\%$ ,  $S_c = 99,38\%$  and  $\mu_{\max} = 0,31h^{-1}$ . Biomass production was scale up from a reactor of 05L to a 100L taken to the reference P/V criteria.

## Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1: Análisis Bibliográfico.....	3
1.1. Biodiesel –Definición.....	3
1.2. Propiedades del biodiesel.....	3
1.3. Materias primas para la producción de biodiesel.....	4
1.4. Ventajas y desventajas del biodiesel.....	5
1.5. Producción de biodiesel a partir de levaduras.....	7
1.5.1. Definición de levaduras.....	7
1.5.2. Levaduras más utilizadas en la producción de biodiesel.....	7
1.5.3. El potencial del biodiesel a partir de levaduras.....	7
1.5.4. Contenido de lípidos en las levaduras.....	9
1.6. Proceso de producción de biodiesel a partir de microorganismos.....	11
1.6.1. Producción de biomasa.....	11
1.6.2. La extracción de la fase lipídica consta con dos pasos.....	15
1.7. Escalamiento de fermentaciones.....	21
1.7.1. Condiciones y criterios de escalamiento.....	22
1.8. El Reactor Biológico. ....	23
1.8.1. Materiales de construcción.....	23
1.8.2. Vida útil del equipo. ....	23
Capítulo 2: Materiales y métodos.....	27
2.1. Procedimiento para la primera fermentación (erlenmeyer).....	27
2.1.1. Preparación de los medios de fermentación.....	27
2.1.2. Esterilización del medio de cultivo.....	27
2.1.3. Preparación del inóculo.....	27
2.1.4. Inoculación del erlenmeyer para la fermentación.....	28
2.1.5. Proceso de fermentación. ....	28

2.1.6. Determinación de la cinética de crecimiento de la <i>Rhodotorula sp.</i> ----	28
2.1.7. Métodos de ruptura de célula para la extracción de lípidos.-----	31
2.2. Procedimiento para la fermentación en el biorreactor.-----	32
2.2.1. Preparación y esterilización de los medios de fermentación.-----	32
2.2.2. Preparación del inóculo.-----	32
2.2.3. Inoculación del fermentador.-----	33.
2.2.4. Proceso de fermentación.-----	33
2.2.5. Determinación de la cinética de crecimiento de la <i>Rhodotorula sp.</i> en fermentador.-----	33
2.2.6. Métodos de ruptura de célula para la extracción de lípidos para el fermentador.-----	34
2.3. Análisis estadístico.-----	34
2.4. Diseño del fermentador-----	34
2.4.1. Tiempos de fermentación.-----	34
2.4.2. Dimensionamiento del fermentador.-----	36
2.4.3. La potencia consumida para la agitación.-----	36
2.4.4. Balance de calor.-----	37
2.4.5. Cantidad de agua de calentamiento.-----	38
2.4.6. Materiales de Construcción.-----	38
Capítulo 3. Resultados y discusión.-----	40
3.1. Determinación de la cinética de fermentación de la levadura a nivel de Erlenmeyer.-----	40
3.2. Proceso de extracción de lípidos.-----	42
3.3. Resultados de los parámetros cinéticos en el fermentador.-----	45
3.4. Proceso de extracción de lípidos para el reactor.-----	48

3.5. Análisis estadístico.	50
3.6. Escalado.	55
3.6.1. Tiempos de fermentación.	55
3.6.2. Dimensionamiento del fermentador.	56
3.6.3. Velocidad de agitación y potencia consumida por el agitador.	56
3.6.4. Balance de calor.	57
3.6.5. Cantidad de agua de calentamiento.	59
3.6.6. Materiales de construcción.	59
Conclusiones.	60
Recomendaciones.	61
Bibliografía.	62
Anexos	

## Introducción.

Biodiésel está constituido por ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos derivados de fuentes renovables de lípidos, estos combustibles resultan ser buenas alternativas para el uso de los combustibles fósiles, ya que se obtienen a partir de fuentes renovables, son biodegradables y no tóxicos. El alto costo de biodiésel, es el principal obstáculo para su comercialización, el uso de aceites de desechos y otras materias primas baratas puede reducir el coste del proceso. El aceite microbiano tiene potencial para su aplicación en la producción de biodiésel, ya que presenta una gran similitud en la estructura y la composición de ácidos grasos. Entre las principales ventajas que poseen los lípidos microbianos se pueden señalar que son producidos por microorganismos de ciclo de vida corto, se requiere menos mano de obra, menos afectación ambiental y más fácil el escalado de sus procesos (Rosa, 2008; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Atabani *et al.*, 2013; Mejía Cano *et al.*, 2013; Morioka *et al.*, 2014).

La glucosa es el sustrato más común que se utiliza en el proceso de producción de lípidos, porque la mayoría de los microorganismos oleaginosos son capaces de asimilar glucosa para producir aceite unicelular. También resulta ser el sustrato más adecuado para su producción y la mejor elección para la evaluar de la producción de lípidos en microorganismos oleaginosos. La acumulación de lípidos en los microorganismos oleaginosos se produce con inanición de sus células de nitrógeno u otros nutrientes tales como zinc, hierro, fósforo y magnesio (Rosa, 2008; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Atabani *et al.*, 2013; Mejía Cano *et al.*, 2013; Morioka *et al.*, 2014).

En respuesta de la célula, al agotamiento de un nutriente clave tal como nitrógeno, esta entra en una fase en la que el exceso de carbono convertido en lípidos es almacenado. Si las células vuelven a una situación en la que el nitrógeno está disponible, las reservas lípidos podrían movilizarse y convertirse en sustratos celulares.

Algunas cepas de levaduras oleaginosas, tales como *Rhodosporidium sp.*, *Rhodotorula sp.*, pueden acumular lípidos intracelulares hasta alcanzar niveles superiores a un 70% de su biomasa en condiciones de limitación de nutrientes.

También se informó que la producción de lípidos por levaduras oleaginosas tiene muchas ventajas debido a su alta tasa de crecimiento, alto contenido de aceite y la semejanza de su fracción triglicéridica con las plantas oleaginosas.

El costo de la producción de lípidos actualmente es relativamente alto y, por lo tanto, es prudente buscar fuentes de carbono de bajo costo, que sean en materia nutricional lo suficiente ricos como para soportar el crecimiento del microorganismo, y así la producción de lípidos.

No caben dudas, que las levaduras oleaginosas son ricas en triglicéridos, es decir aceite que es la materia prima del biodiésel. Si se logra producir suficiente biomasa, se puede entonces extraer el aceite contenido en ella.

Sin embargo la extracción de aceite de las levaduras es hoy, el eje entorno a cual giran todas las investigaciones ya que es una de las etapas más costosas en el proceso de producción global del biodiésel. Esta etapa puede determinar la sostenibilidad económica de la obtención. Existen diferentes procesos para extraer los lípidos de las de las células en los cuales se identifica como paso crítico la ruptura de las cubiertas celulares (pared celular y membrana citoplasmática).

**Problema:** Cómo determinar qué método de ruptura de células es más eficiente para la obtención de lípidos de levaduras oleaginosas.

**Hipótesis:** Si se evalúan los métodos de ruptura de las células entonces se podrá determinar cuál de ellos es más eficiente para la obtención de lípidos.

**Objetivo General:** Comparar dos métodos de ruptura de células de levadura *Rhodotorula sp* para la obtención de lípidos.

**Objetivos específicos:**

Determinar la cinética de crecimiento de *Rhodotorula sp*.

Determinar la productividad de lípidos de *Rhodotorula sp*. bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

Escalar la producción de biomasa de *Rhodotorula sp*. desde un reactor de 0,5L a uno de 100L.

## Capítulo 1: Análisis Bibliográfico.

### 1.1. Biodiésel –Definición.

La organización ASTM (American Society for Testing and Material Standard) define el biodiésel como un éster monoalquílico de ácidos grasos de cadena larga derivado de recursos renovables (aceites vegetales o grasas animales), además plantea que su proceso de obtención se basa en la transesterificación catalítica de esas grasas en presencia de un alcohol de cadena corta (Tovar *et al.*, 2013; Beltrán, 2011).

Demirbas, (2009) define el biodiésel con su nombre, del Griego, “bio”, vida + “Diesel” de Rudolf Diesel inventor del motor, y hace referencia a un combustible equivalente al diésel convencional, fabricado a partir de fuentes biológicas.

### 1.2. Propiedades del biodiésel.

#### Propiedades físico-químicas.

Las propiedades del biodiésel son, en algunos aspectos, similares a las del diésel del petróleo, por eso los motores no necesitan ninguna modificación para poder utilizarlo.

En la Tabla 1.1, se hace una comparación entre las propiedades de un diésel y de un biodiésel. Como se observa, algunas son muy parecidas, pero otras difieren bastante.

**Tabla 1.1: Comparación del diésel y del biodiésel para algunos parámetros.**

Propiedad	Unidad	Diesel UNE-EN 590	Biodiésel
Viscosidad (40°C)	Mm <sup>2</sup> /s	2,00 - 4,50	3,50 - 5,00
Punto de ignición	°C	>55	>110
Número de cetano		>46	>51
Poder calorífico	MJ/dm <sup>3</sup>	35,6	32,9
Grado de eficiencia	%	38,2	40,7

Fuente: (Monthieu, 2010).

Como se aprecia en la tabla, el punto de ignición del biodiésel es superior al del diésel, por lo que le garantiza un manejo mucho más seguro en la manipulación y almacenaje. El número de cetano del biodiésel tiende a ser más alto, este es una medida de la calidad de ignición de un combustible, influye en las emisiones de humo y en la calidad de la combustión. Con un mayor número de cetano hay un mejor arranque en frío, un menor ruido y mayor vida útil del motor y menores emisiones.

### 1.3. Materias primas

Los aceites más comunes para la producción de biodiésel son:

**Tabla 1.2: Algunas de las principales materias primas para la elaboración de biodiésel.**

Tipo de aceite	Fuente
<b>Aceites vegetales convencionales</b>	Aceite de girasol Aceite de soja Aceite de coco Aceite de palma
<b>Aceites vegetales alternativos</b>	Aceite de <i>Brassica carinata</i> Aceite de <i>Camelia sativa</i> Aceite de <i>Jatropha curcas</i>
<b>Aceites de semillas modificadas genéticamente</b>	Aceite de girasol de alto oleico
<b>Grasas animales</b>	Sebo de vaca Grasa de pollo
<b>Aceites de otras fuentes</b>	Aceite de producciones microbianas

**Fuente:** Maldonado 2013.

Desafortunadamente, el biodiésel a partir de semillas, aceite de cocina usado y grasa animal, no satisface ni la mínima fracción de la demanda de combustible.

Si se compara la producción de aceites vegetales, con el cultivo de los microorganismos oleaginosos, se puede extraer varias ventajas tales como: no suelen afectarse con frecuencia por las adversidades ambientales, pueden acumular lípidos en lapsos de tiempos relativamente cortos y pueden crecer en una gran variedad de substratos e incluso en material de bajo costo, como son los residuos provenientes de la agricultura y de la industria en forma general (Xue *et al.*, 2006; Angerbauer *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2015).

Los aceites extraídos de microorganismos (bacterias, hongos, microalgas y levaduras) se consideran como un prometedor potencial como materia prima para la producción de biodiésel, debido a su composición similar al de los ácidos grasos de aceites vegetales.(Li *et al.*, 2007).

#### **1.4. Ventajas y desventajas del biodiésel.**

Como ya se ha expresado, las propiedades del biodiésel son similares a las del combustible convencional, no obstante difieren en algunas, que precisamente se puede destacar como ventajas y se relacionan a continuación: (Körbitz, 1999; Agarwal and Das, 2001; Chun-Hai *et al.*, 2010).

La autora considera necesario comenzar a analizar las ventajas a partir de la tesis de que el biodiésel es un carburante ecológico y de ahí se suponen los beneficios ambientales.

- Es un combustible que no daña el medioambiente.
- Se produce a partir de materias primas renovables.
- No contiene prácticamente nada de azufre. Evita las emisiones de SO<sub>x</sub> (lluvia ácida o efecto invernadero).
- Mejora la combustión, al reducir claramente emisiones de hollín (hasta casi un 55% desaparece el humo negro y olor desagradable).
- Produce, durante su combustión menor cantidad de CO<sub>2</sub> que el que las plantas absorben para su crecimiento (ciclo cerrado de CO<sub>2</sub>).
- No contiene ni benceno, ni otras sustancias aromáticas cancerígenas (Hidrocarburos aromáticos policíclicos).
- Es fácilmente biodegradable, y en caso de derrame y/o accidente, no pone en peligro, ni el suelo ni las aguas subterráneas.

- No es una mercancía peligrosa (el punto de inflamación se encuentra por encima de 110° C).
- Posee un alto poder lubricante, protege el motor y reduce su desgaste así como sus gastos de mantenimiento.
- Es el único combustible no contaminante alternativo a los motores de gasóleo convencional.

### **Desventajas**

- A bajas temperaturas puede empezar a solidificar y formar cristales, que pueden obstruir los conductos del combustible y presentar problemas de arranque.
- Por sus propiedades solventes, puede ablandar y degradar ciertos materiales, tales como el caucho natural y la espuma de poliuretano. Es por esto que puede ser necesario cambiar algunas mangueras y retenes del motor antes de usar biodiésel en él, especialmente con vehículos antiguos (Rossi *et al*, 2011; Beltrán, 2011; Enshaeieh *et al.*, 2012).
- Sus costos aún pueden ser más elevados que los del diésel de petróleo. Esto depende básicamente de la fuente de aceite utilizada en su elaboración.
- Aumentan ligeramente las emisiones de NO<sub>x</sub>.
- Dilución del aceite del motor, lo que implica un aumento de la frecuencia de cambio del mismo.
- La explotación de plantaciones como la palma, para la producción de aceite (utilizadas para hacer biodiésel), puede causar la deforestación de parques y bosques, y así la destrucción del hábitat de especies que son colocadas en peligro.
- Su producción a partir de aceites vegetales comestibles, requiere del uso de enormes extensiones de terreno fértil, situación que podría llevar a crisis.

## **1.5. Producción de biodiésel a partir de levaduras.**

### **1.5.1. Definición de levaduras.**

Las levaduras son microorganismos unicelulares con variadas formas morfológicas (esféricas, ovoidales, cilíndricas o alargadas), presentan metabolismo energético fermentativo, se reproducen de forma asexual por esporas asexuales, bipartición y gemación, su pH óptimo de crecimiento es ácido, de 5,5 aproximadamente, son mesófilas o sea su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y 40°C, el crecimiento poblacional es rápido y su nutrición es quimioheterótrofa, es decir, que obtiene la energía y el carbono de la materia orgánica. (Enshaeieh *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2011; Sabirova *et al.*, 2011; Tai and Stephanopoulos, 2013).

Las levaduras oleaginosas, son aquellas que pueden acumular lípidos intracelularmente al ser cultivadas en diversos residuos agroindustriales o diferentes fuentes carbonadas, además se han reportado diferentes perfiles de ácidos grasos, los cuales dependen del sustrato, de las condiciones de cultivo y del genotipo microbiano (Krate *et al.*, 2012; Leiva-Candia *et al.*, 2014; Santamauro *et al.*, 2014; Knothe *et al.*, 2015).

### **1.5.2. Levaduras más utilizadas en la producción de biodiésel.**

Existen diferentes especies de levaduras que se destacan por su utilización en la producción de lípidos, dentro de estas se mencionan principalmente a *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporom pullulan* y *Yarrowia lipolytica* (Li-Xia *et al.*, 2009; Loera-Quezada and Olguin, 2010; Qiao *et al.*, 2015 ), las cuales se han cultivado exitosamente y producido lípidos a través de diversas fuentes de carbono, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, glicerol, además de distintos desechos de la agricultura y la industria.

### **1.5.3. El potencial del biodiésel a partir de levaduras**

Según Monthieu (2010) para poder remplazar todo el combustible consumido en el transporte en los Estados Unidos con biodiésel se requiere de 0,53 mil millones de m<sup>3</sup> del combustible anual.

Como se conoce, las cosechas de aceite, los residuos de grasa de la cocción o grasa animal, no pueden satisfacer la cantidad necesaria de aceites para producir el biodiésel para consumir solo en transporte y las extensiones de suelo necesario, para el cultivo de las fuentes de biodiésel se imposibilitan.

En la tabla siguiente, se muestran el área de cultivo necesaria y el rendimiento obtenido para algunos de los cultivos utilizados en la producción de biodiésel.

**Tabla 1.3. Comparación en rendimiento de fuentes de biodiésel.**

<b>Cultivo</b>	<b>Rendimiento Aproximado (L/ha)</b>	<b>Área de cultivo Requerida (Millones de ha)</b>
<b>Maíz</b>	<b>172</b>	<b>1 540</b>
<b>Soya</b>	<b>446</b>	<b>594</b>
<b>Canola</b>	<b>1 190</b>	<b>223</b>
<b>Coco</b>	<b>2 689</b>	<b>99</b>
<b>Aceite de Palma</b>	<b>5 950</b>	<b>45</b>
<b>Microorganismo A<sup>a</sup></b>	<b>136 900</b>	<b>2</b>
<b>Microorganismo B<sup>b</sup></b>	<b>58 700</b>	<b>4.5</b>

Fuente: (Reyna, 2012)

a: Microorganismo que acumula 70% de lípidos respecto a su biomasa (Basado en datos obtenidos de biorreactores).

b: Microorganismo que acumula 30% de lípidos respecto a su biomasa (Basado en extrapolaciones de datos obtenidos de biorreactores).

Entre los microorganismos heterótrofos, las levaduras poseen ventajas en términos de su crecimiento rápido y alto contenido de aceite. Además, la optimización y la mejora de las capacidades de las levaduras, de utilizar fuentes de carbono baratas para la acumulación de aceite, son muy importantes para la producción de biodiésel en el futuro.

Los aceites microbianos podrían convertirse en una de las materias primas potenciales, para la producción de biodiésel en el futuro ya que poseen ventajas importantes como son: es una fuente renovable, la tasa de crecimiento es rápida y no utilizan tierra para su cultivo (Maldonado, 2013).

#### 1.5.4. Contenido de lípidos en las levaduras.

Las levaduras presentan un alto contenido de lípidos, la gran capacidad de las mismas de aumentar su tamaño poblacional a una elevada velocidad, junto con su alto contenido de lípidos hace a las levaduras una fuente ideal para la producción de biodiésel.

Ejemplos del alto contenido de lípidos de las levaduras es la *Rhodotorula glutinis*, puede presentar 60,69% de aceite en su biomasa en peso seco y una composición química muy parecida al aceite vegetal (Dai *et al.*, 2007). Otro ejemplo interesante es la levadura marina *Yarrowia lipolytica* que también posee un alto contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (22–31%) similares a los contenidos en los aceites vegetales utilizados para la producción de biodiésel (Katre *et al.*, 2012).

Mientras que Sankh *et al.* (2013), informa del aislamiento de la levadura *Pichia kudriavzevii* MTCC 5493, que es capaz de acumular en su biomasa 19% de lípidos en peso seco, con una composición química muy similar a la del aceite vegetal.

De igual manera Li *et al.* (2007) muestran que *Rhodosporidium toruloides* presenta una alta acumulación de lípidos (67,5%) bajo condiciones de agitación en comparación de su crecimiento bajo condiciones estacionarias (48,0%), sin embargo en esta condición la biomasa generada fue mayor (151,5 g L<sup>-1</sup>). Otro estudio reporta la utilización de siete cepas de *Rhodosporidium toruloides* a escala laboratorio, de las cuales *R. toruloides* 21167 es la que tuvo mayor cantidad de lípidos (63,2% en peso seco) y una producción de biomasa de 18,5 g m<sup>-3</sup> (Wang *et al.*, 2012).

Con respecto a los residuos agroindustriales, donde pueden crecer las levaduras, para reducir los costos de producción, Ryu *et al.* (2013) cultivaron a *Cryptococcus curvatus* en residuos de la industria cervecera y encontraron un contenido de lípidos de 37.7% en peso seco.

Otro ejemplo de ello es el trabajo de Zhu *et al.* (2008) quienes crecen a la levadura *Trichosporon fermentans* en melazas y reportan una acumulación de lípidos del 50.8% en peso seco y una producción de biomasa del 19.4 g L<sup>-1</sup>. De igual forma se usa el glicerol como materia prima para el crecimiento de

levaduras, tal es el caso de *C. curvatus* que tuvo una acumulación de lípidos del 48% en peso y una producción de biomasa de 69 g L<sup>-1</sup> al hacerse crecer en esta sustancia (Thiru *et al.*, 2011).

El aceite rico en lípidos contenido en las levaduras, puede ser considerado como una fuente alternativa para la producción de biodiésel, por lo que es una solución muy prometedora y sostenible, ya que, no depende de terrenos de cultivo, del medio ambiente o de cuestiones sociales (Thiru *et al.*, 2011).

En la tabla siguiente se muestran algunas de las cepas de levaduras oleaginosas, la fuente de carbono utilizada para cada una en los respectivos estudios y sus porcentajes de acumulación de lípidos con respecto al peso seco de su biomasa.

**Tabla 1.4: Porcentaje de lípidos de diferentes levaduras según el sustrato utilizado.**

Levadura	Sustrato utilizado	% de lípidos	Referencia
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Hidrolizado de tapioca	52,9	Enshaeieh <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glucosa	40,0	Saenge <i>et al.</i> (2011)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Etanol	54	Zhao <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glucosa	48	Li <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glucosa	53	Thiru <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus echinulata</i>	Glucosa	46	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus isabellina</i>	Glucosa	44,6	Fakas <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptococcus isabellina</i>	Xilosa	65,5	Fakas <i>et al.</i> (2009)

Fuente: (Reyna, 2012).

## **1.6. Proceso de producción de biodiésel a partir de microorganismos.**

El proceso usualmente empleado para la obtención de biodiésel, consiste en una extracción y posterior reacción de la fracción lipídica con metanol, en las condiciones adecuadas (Xue *et al.*, 2006). Dicho proceso consta de las siguientes etapas:

Producción de la biomasa.

Extracción de la fase lipídica.

Reacción de obtención de biodiésel.

### **1.6.1. Producción de biomasa.**

#### **Biomasa-Definición.**

Se acepta el término biomasa para denominar al grupo de productos energéticos y de materias primas originados a partir de la materia orgánica, formada por vía biológica (Seye, 2003).

En la actualidad, el término biomasa incluye toda materia orgánica de origen vegetal o animal e incluso los materiales procedentes de su transformación natural o artificial (carbón vegetal, desechos orgánicos y otros residuos agropecuarios) que pueden ser utilizados como combustible.

#### **Medios de cultivo:**

Para el crecimiento adecuado de los microorganismos, estos requieren de una fuente de energía y de fuentes de materia, en la industria, para la mayoría de las fermentaciones se utiliza una misma fuente de energía y de materia (glucosa), pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular, en las proporciones requeridas por la composición interna del organismo (Madigan *et al.*, 2015; Quintero, 1981).

#### **Condiciones de cultivo para levaduras productoras de aceite:**

La variación de la acumulación de aceites en los microorganismos está relacionada directamente con las condiciones de cultivo, la relación carbono (C) / nitrógeno (N), los recursos de nitrógeno, temperatura, pH, oxígeno y

concentración de sales inorgánicas deben ser estrictamente las necesarias para el crecimiento microbiano según la especie.

Generalmente, mientras más componentes de nitrógeno existan en el medio, las células contendrán menor cantidad de aceite. Según estudios realizados, se informa que cuando la relación C/N se incrementó, desde un 25 a 70, el contenido de aceite aumentó, de 18% a 46%. Además se dice que las diferentes fuentes de nitrógeno, orgánicas e inorgánicas pueden ser utilizadas para el cultivo de levaduras, pero ambas fuentes tienen influencia en la acumulación de aceites (Chi *et al.*, 2011; Sabirova *et al.*, 2011; Fontanille *et al.*, 2012; Koutinas *et al.*, 2014; Tanimura *et al.*, 2014).

### **Proceso de fermentación.**

Las industrias de procesos bioquímicos se encargan del aprovechamiento, bajo condiciones controladas, de materiales biológicos tales como microorganismos, tejidos celular animal, productos microbianos y enzimas. Los procesos asociados con la producción de microorganismo y de algunos productos específicos son importantes comercialmente (Quintero, 1981).

Para que una fermentación se realice, son necesarios los siguientes requisitos: tener un microorganismo de características idóneas para el proceso o producto de interés, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga los nutrientes esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y por último, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación (Najafpour, 2015; Shuler and Kargi, 2002; Quintero, 1981).

Un proceso de fermentación típico es esencialmente, un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos, que componen el medio de cultivo, son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo aumenta su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se modifica y se forman productos nuevos a consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos de crecimiento y formación de producto, tienen lugar en el proceso simultáneamente o no según los casos (Shuler and Kargi, 2002).

### **Cinética del crecimiento de biomasa.**

Una fermentación aeróbica tipo batch o discontinua puede ser considerada como un sistema cerrado. En el tiempo inicial el medio de cultivo estéril dentro del fermentador se inocula con microorganismos y la incubación se da bajo condiciones fisiológicas óptimas. En el transcurso de toda la fermentación, solo se adiciona oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante, y un ácido o base para el control del pH, con el fin de garantizar las condiciones óptimas de operación, que permitan obtener una alta concentración celular. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa, y la concentración del metabolito cambia constantemente como resultado del metabolismo celular. En el transcurso de la fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo (anexo 1) fase lag. , fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Sánchez, 2003; Doran, 1995).

Fase Lag o de adaptación: también llamada fase de latencia. Cuando las células son transferidas de un medio a otro, no hay inicialmente un incremento en el número de células. Durante esta fase, los microorganismos se toman un tiempo para adaptarse a su nuevo ambiente fisicoquímico y en ocasiones se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales (Sánchez, 2003). La duración de esta fase puede variar, depende del crecimiento de las células en el inóculo, el cual debe tener una edad tal, que la mayor parte de las células que contiene deben encontrarse en fase exponencial y metabólicamente activas (Barrera, 2004). Es recomendable utilizar inóculos entre aproximadamente 5 y 10% del volumen total del reactor con el fin de reducir el tiempo de latencia (Soto, 2004).

Fase Exponencial o log: Al finalizar la fase lag, las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. En este punto, las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas, a velocidad máxima. El crecimiento de las células se puede describir cuantitativamente, como la duplicación del número de células o biomasa por unidad de tiempo. A través de esta fase, las células alteran el medio constantemente, al utilizar los sustratos y excretar los productos metabolizados. El crecimiento permanece constante

durante esta fase. La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato, mientras exista sustrato en el medio, y se correlaciona con la velocidad de crecimiento específico  $\mu$  y la concentración de células  $x$  [células/ mL] según la ecuación 1.1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu x \quad \text{Ec.1.1}$$

La velocidad de crecimiento específico  $\mu$ , es generalmente una función de tres parámetros: la concentración del sustrato limitante  $S$ , la tasa de crecimiento máxima  $\mu_{\text{máx}}$ , y la constante específica de sustrato  $K_s$ , en cuya concentración se obtiene la mitad de la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu = 0.5 \mu_{\text{máx}}$ ).

Esta relación puede ser expresada por medio de la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ec.1.2}$$

La velocidad máxima de crecimiento específico  $\mu_{\text{máx}}$  es de considerable importancia a nivel industrial, debido a que es en este punto donde se obtiene el valor máximo de  $\mu$  a niveles de saturación de sustrato, y relaciona la dependencia de los microorganismos con las condiciones del fermentador, donde a medida que aumenta la densidad de población, decrece la concentración del sustrato, limitante del crecimiento y causa un descenso de  $\mu$ .

Fase estacionaria: ocurre cuando se agota una sustancia nutritiva y el sustrato se ha metabolizado, se han formado sustancias tóxicas o ha ocurrido un cambio de condiciones como pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto. El crecimiento celular desciende lentamente o para completamente y en el caso en el que aun pueda ocurrir crecimiento, este se contrarresta por la rapidez de muerte o lisis celular. La biomasa incrementa sólo gradualmente o permanece constante durante la fase estacionaria, aunque la composición de las células puede cambiar (Sánchez, 2003).

Fase de muerte: también llamada fase de decaimiento. En esta fase la reserva de energía de las células se ha acabado, debido a condiciones de inanición o como consecuencia del metabolismo de mantenimiento de algunas células. El

tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del microorganismo y el proceso utilizado. (Sánchez, 2003)

### **1.6.2. La extracción de la fase lipídica consta con dos pasos.**

- Ruptura de la célula

- Extracción de los lípidos

Los lípidos son un conjunto muy heterogéneo de moléculas orgánicas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno, y en menor medida, oxígeno, aunque también pueden contener azufre, nitrógeno y fósforo. Su principal característica es la hidrofobicidad, por tanto, estas moléculas sólo se disuelven en disolventes orgánicos. Los lípidos son una mezcla natural de los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, colesterolos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, esfingolípidos, y glucolípidos (Najafpour, 2015; Quines *et al*, 2015).

Los disolventes empleados para su extracción deben demostrar una alta solubilidad para todos ellos, y deben ser lo suficientemente polares como para eliminar los lípidos de su asociación con las membranas celulares y lipoproteínas. Los disolventes neutros como el n-hexano o el éter son capaces de extraer los lípidos libres, puesto que rompen las interacciones hidrófobas que los unen a otros compuestos. Sin embargo, son necesarios disolventes más polares como metanol o cloroformo para romper los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas que unen los lípidos complejos al resto de los componentes (Morales *et al.*, 2008; Najafpour, 2007; Souza *et al.* 2013; Cisneros and Rito, 2005).

### **Métodos de ruptura de células.**

Existen diferentes métodos a los que se pueden someter los microorganismos con el fin de penetrar en su estructura, Martearena *et al.* (2009) utilizan varios de ellos con el fin de obtener sus rendimientos y compararlos, esos resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.5: Estudio de métodos de ruptura de células (medio bajo nitrógeno). Extracción de lípidos en Soxhlet con cloroformo: metanol (2:1), 11 horas.**

Método de ruptura de células	% Lípidos
Agitación en Vortex (con perlas de vidrio, 1 hs)	12
Ultrasonido (1 hs)	7
Congelación, -20°C (24 hs)	7
Reflujo con HCL 1,1 N (10 min)	21
Sin ruptura	4

Fuente: (Martearena *et al.*, 2009).

Prieto (2009), coincide en la utilización un baño de ultrasonidos y la exposición de los microorganismos la realiza durante 5 minutos.

Monthieu (2010), refiere a varios procedimientos para la ruptura de células, además de coincidir en la utilización de ultrasonidos considerándolo uno de los métodos más eficientes también refiere otros como la deshidratación y la ruptura por hidrólisis enzimática.

### **Los métodos de disrupción o ruptura celular se clasifican en:**

**Métodos mecánicos:** Se basan en fuerzas de corte (*shear stress*) que deforman las células hasta el rompimiento de sus cubiertas. Dentro de ellos se encuentran:

- Homogenizadores de alta presión: Se aplica una elevada presión a una suspensión de células forzándolas a través de una válvula, se somete a las células a un alto estrés de corte que ocasiona que se rompan las membranas.
- Homogenizadores Microfluidizadores: (microfluidizer homogenizer) En los microfluidizadores, el líquido se divide en dos o más corrientes que se bombean a elevadas presiones (en algunos equipos más de 270 MPa) y grandes velocidades, unas contra otras en un ángulo de 180° para ocasionar la caída repentinamente la presión tras chocar ambas corrientes.

- Bead mills (molinos de esferas): Básicamente consiste en un agitador de discos montado sobre un motor central que gira en una cámara central, la cual es cargada con esferas de vidrio, metal u otro material.
- Ultrasonidos:

Los ultrasonidos u ondas de sonido con frecuencias son aquellas mayores a las que pueden ser detectadas por el oído humano. El ultrasonido maneja ondas con frecuencias entre 16KHz y 20MHz, las cuales al ser aplicadas pueden llegar hasta 5MHz en gases o hasta 500MHz en líquidos y sólidos (Thebellmeade, 2016).

El ultrasonido es una tecnología emergente que recientemente ha sido estudiada para propósitos de inactivación microbiana y enzimática, es objeto de investigación por sus amplias aplicaciones entre las que se encuentran, el control de calidad en la industria de alimentos, la evaluación de textura, composición y viscosidad de alimentos (Lee, 2004), para el desarrollo de técnicas de análisis no invasivas y para determinar el nivel de homogenización de glóbulos de grasa en leche (Souza *et al.*2013; Garcia *et al.*2009; Medeiros *et al.*, 2008), entre otras aplicaciones.

Por su capacidad para destruir paredes y membranas biológicas, es considerado como una tecnología promisoría tanto para la destrucción de microorganismos a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la esterilización, como para acompañar otras tecnologías de proceso como lo son la extracción, las altas presiones, la pasteurización, entre otras (Delgado, 2015).

Según los rangos de frecuencias utilizados, el ultrasonido tiene dos posibles clasificaciones: ultrasonido de baja intensidad y ultrasonido de alta intensidad. Las aplicaciones del ultrasonido se dividen según sea la potencia de la onda ultrasónica, por ejemplo, las de baja potencia, menores de 1 W/cm<sup>2</sup> con frecuencias mayores que 100 kHz son utilizadas para el sondeo de materiales y diagnóstico médico. Y las de alta potencia, mayores que 1 W/cm<sup>2</sup> con frecuencias menores que 100 kHz son utilizadas para desintegración celular y homogenización.

El mecanismo de acción del ultrasonido de alta intensidad es utilizado para la inactivación de microorganismos, ya que cuando el ultrasonido es aplicado con suficiente intensidad, éste tiene el potencial de causar muerte celular, debido a los fenómenos de cavitación, el calentamiento localizado, la formación de radicales libres y el aumento de la temperatura y la presión, entre otros (Medeiros *et al.*, 2008; Ginés, 2014; Delgado, 2015).

La transferencia del ultrasonido al medio líquido se puede realizar de dos formas:

Por transferencia directa: el elemento o punta que transmite las ondas de presión se introduce directamente en el medio líquido.

Por transferencia indirecta: lo que se hace es disponer el fluido a tratar dentro de un tubo, por lo tanto la onda de presión tendrá que atravesar la pared del mismo.

La transferencia directa genera amplitudes de oscilación de la onda mucho mayores que en la transferencia indirecta, por esta razón es mucho más utilizado.

**Métodos no mecánicos:** Rompen las cubiertas celulares y se inicia la lisis celular, a través de medios químicos, físicos o enzimáticos (Thebellmeade, 2016).

Dentro de estos tipos de métodos podemos clasificar tres sub-clases principales:

- a) Métodos químicos.
- b) Métodos físicos.
- c) Métodos enzimáticos.

Métodos químicos.

- Tratamiento con solventes orgánicos (cloroformo, tolueno): Los solventes orgánicos permeabilizan las membranas celulares y disuelven componentes hidrofóbicos de la pared, como los fosfolípidos de la membrana interna en bacterias Gram (-).
- Agentes Caotrópicos (urea, clohidrato de guanidina): Interfieren con los enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals),

desorganizan la estructura del agua haciéndola menos hidrofílica, por lo que debilitan las interacciones soluto-soluto.

- Tratamiento con álcalis (hidróxido de sodio e hipoclorito): Se produce la saponificación de los lípidos de las membranas. Es una técnica muy severa pero efectiva y de bajo costo, siempre y cuando el producto de interés sea resistente a la degradación a pH elevados.
- Tratamiento con ácidos. Se produce hidrólisis de los polisacáridos de la Pared celular y la membrana citoplasmática.

#### Métodos físicos

- Congelamiento/descongelamiento: Los cristales de hielo que se forman y crecen durante el congelamiento, rompen mecánicamente la integridad del interior de la membrana celular, haciéndola más permeable.
- Descompresión: Es un proceso por el cual las células se mezclan con un gas presurizado por un tiempo específico. El gas entra en las células y luego al liberar la presión aplicada el mismo se expande por lo que causan la disrupción.
- Termólisis: Es un proceso bastante común a gran escala. Las células son llevadas a mayores temperaturas con el fin de romper o debilitar la membrana externa.

#### Métodos enzimáticos

- Disrupción Enzimática: La lisis enzimática es un método muy preciso, pero que requiere de una comprensión precisa de la estructura de las paredes celulares que se desean destruir.

- 

#### Métodos de extracción

Para la extracción de lípidos existen diferentes métodos, se destacan entre ellos:

##### **Extracción con solventes.**

La mezcla de disolventes Metanol/Cloroformo fue reconocida por Folch *et al.* (1957). Este método fue adaptado por Bligh y Dyer (1959), y se ha convertido en el método de referencia para la determinación de lípidos totales hasta la

actualidad; sin embargo ha estado sujeto a modificaciones para aumentar su precisión ( Maldonado, 2013).

Martearena *et al* (2009), extrajeron los lípidos de levaduras oleaginosas mediante la utilización de un equipo Soxhlet, con distintos solventes (Tabla 6), a distintos tiempos y determinaron el porcentaje de lípidos totales con respecto a la biomasa seca. Al estudiar el tiempo de extracción en un período de 1 a 11 h, se concluyó que el tiempo óptimo es de 4 h.

**Tabla 1.6: Variación de solvente para la extracción de lípidos a partir de biomasa (medio bajo nitrógeno, reflujo con HCl 1,1 N, 10 min.), en Soxhlet, 11 horas.**

Solvente	% Lípidos
Cloroformo : metanol (2:1)	21
Hexano	62
Diclorometano	15

Fuente: (Martearena, *et al.* 2009).

De los resultados de la tabla se concluye que el solvente más eficiente en la extracción de lípidos es el hexano.

Vélez (2014), utiliza para la extracción de lípidos en hongos filamentosos dos mezcla de solventes con resultados satisfactorios para su investigación, estas mezclas fueron las reconocidas por Folch *et al.* (1957) y adaptadas por Bligh y Dyer (1959), o sea Cloroformo: metanol (2:1) y hexano:isopropanol, por lo que coincide con lo expuesto por Gao-Qiang *et al.*(2010) y Limtong *et al.*(2010) que coincide en la utilización de esa mezcla de solventes en este último caso utilizado para la extracción en levaduras.

### **Extracción mecánica.**

Otro método para la extracción de lípidos en células es la extracción mecánica del aceite de biomasa desecada. Cuando las células están secas retienen el aceite, que puede ser extraído con una prensa de aceite. Muchas empresas de aceite vegetal utilizan una combinación mecánica y solventes químicos para la extracción del aceite en este caso lo solventes referenciados para esta situación son el ciclohexano y mezcla de benceno y éter. La prensa extrae el aceite mecánicamente mediante fricción lo que da lugar a una generación de

calor. El aceite producido se desliza por las superficies metálicas. El rendimiento depende de la presión que se ejerza (Monthieu, 2010),

### **1.7. Escalamiento de fermentaciones.**

Escalamiento significa un cambio en la escala de volumen de proceso. Este cambio generalmente viene acompañado de dificultades debido a que muchos de los parámetros de proceso se encuentran directamente relacionados con el tamaño y geometría del reactor. El objetivo principal es cambiar la escala de una reacción biológica, se aumenta o disminuye el volumen de trabajo, sin que se reduzca su productividad (Parra, 2004).

Por lo general el escalamiento consta de tres etapas. A nivel de laboratorio se opera en frascos agitados (~ 500 mL) o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control, se mejoran las cepas de producción y se ajustan las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (temperatura, pH y composición del medio de cultivo). En la planta piloto (5-500 L) se selecciona un parámetro de escalamiento y se estudian efectos de aireación, agitación, temperatura y control de pH. En los fermentadores de producción (5 000 - 400 000 L) se validan los resultados obtenidos en la planta piloto y se debe operar mediante un calendario fijo (Jiménez y Rojas, 2003).

Para entender el proceso de escalamiento se deben tener en cuenta todos los fenómenos que ocurren en el biorreactor como la cinética de las reacciones, termodinámica y los fenómenos de transferencia de masa, calor y fluidos (Jiménez y Rojas, 2003). En el caso en el que se tienen los equipos y se pretende trasladar las condiciones de operación de uno a otro (revoluciones por minuto, cantidad de aire por minuto, potencia por unidad de volumen), lo importante es establecer relaciones entre las variables que aseguren la similitud en el medio ambiente al cambiar de escala. Desde el punto de vista de diseño se debe tratar de delinear las variables físicas (geometría, número de impulsores, etc.) del fermentador y procurar que se mantengan las mismas condiciones de mezclado, agitación y aireación, aunque esta no es una tarea fácil debido a las limitaciones dimensionales y económicas que restringen los procedimientos de escalamiento (Quintero, 1981).

La metodología del cambio de escala se fundamenta en la selección de una estrategia con el propósito de predecir el comportamiento de las variables no controladas y su consecuencia sobre el diseño global del proceso.

Dentro de estas metodologías se encuentran los métodos fundamentales (ecuaciones de microbalances de transferencia de momento, masa y calor), semifundamentales (ecuaciones simplificadas de transporte), análisis de régimen (análisis de proceso para encontrar las etapas limitantes), análisis dimensional (basada en analogías de las ecuaciones generadas de los balances de momento, masa y calor) y reglas empíricas (de acuerdo con la experiencia se fijan condiciones que son factores limitantes del proceso). En biotecnología es común el uso de las reglas empíricas, que consiste en mantener constante el valor de un parámetro de operación en ambas escalas. El parámetro de operación se elige de acuerdo a cada microorganismo, sus necesidades y las limitaciones que se presentan en la fermentación y el valor en el cual se debe mantener constante se selecciona cuando el valor de la variable de respuesta se vuelve independiente de este o presenta un máximo (Jiménez and Rojas, 2003).

El escalamiento, puede verse perturbado por las condiciones que afectan el crecimiento de los microorganismos y la formación de productos en un proceso bioquímico (temperatura, presión, pH, velocidad de agitación y concentración de nutrientes) Las variables más críticas son la temperatura y la concentración de oxígeno porque al incrementar el volumen se hace más difícil la transferencia de calor y la transferencia de masa, por lo que son necesarios sistemas más eficientes de calentamiento, agitación y aireación (Asenjo ,1995; Shuler and Kargi, 2002).

#### **1.7.1. Condiciones y criterios de escalamiento.**

Existen diversos criterios de escalamiento, que se encuentran directamente vinculados con las variables que afectan de manera importante el sistema de producción. Entre estos se encuentran: número de Reynolds, tiempo de mezcla, velocidad en la punta del impulsor, potencia por unidad de volumen ( $P/V$ ), coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $K_{ga}$ ) y similitud geométrica del reactor, entre otros. Sin embargo, según Quintero (1981), el

número de Reynolds y el tiempo de mezclado no son buenos criterios de escalamiento. En el primer caso porque  $P/V$  es demasiado pequeño y no aseguraría una buena translación, y en el segundo se requiere un consumo de potencia muy alto por lo que generan altos costos de operación.

En cualquiera de estos casos, se deben tener en cuenta tres aspectos determinantes en la realización del escalamiento (Acuña 2015):

- Identificar el parámetro ambiental que resulta principalmente afectado por la aireación y agitación.
- Identificar una variable de proceso que afecte la anterior variable.
- Calcular el valor de la variable de proceso que al utilizarse en gran escala permita obtener las mismas condiciones ambientales que en pequeña escala.

Dentro de los parámetros ambientales que pueden ser afectados por la aireación y agitación se encuentran la disponibilidad de los nutrientes, el pH, la temperatura, los esfuerzos cortantes, la concentración de  $O_2$  disuelto y la producción de espuma. Sin embargo, se ha encontrado que los más importantes parámetros ambientales que se ven afectados por la agitación y aireación en la mayor parte de la fermentación son la concentración de oxígeno y los esfuerzos cortantes (Acuña 2015).

### **1.8. El Reactor Biológico.**

La función principal de un reactor biológico es la de proporcionar un ambiente controlado para el crecimiento de microorganismos, con el fin de obtener un producto deseado. Algunas de las consideraciones básicas en el proceso de diseño, dimensionamiento y construcción de un reactor biológico son las siguientes (Acuña 2015):

- El cuerpo del reactor debe estar habilitado para ser operado de manera aséptica durante cierto periodo de tiempo, debe ser confiable a largo plazo y cumplir con los requerimientos de contención, para evitar la

contaminación del medio de cultivo con agentes externos y evitar el escape de células viables fuera del reactor (Acuña 2015):

- Debe suministrarse una agitación y aireación adecuadas de acuerdo con los requerimientos metabólicos de los microorganismos, sin que el mezclado llegue a hacerles daño (Barrera, 2004).
- El consumo de potencia se debe mantener en los niveles mínimos posibles, para disminuir los costos energéticos (Barrera, 2004).
- Se debe contar con sistemas de control de temperatura, pH, entre otros; para garantizar un ambiente óptimo para el crecimiento de los microorganismos.
- Se requiere un sistema de muestreo del medio; para monitorear el desarrollo de la fermentación.
- Las pérdidas por evaporación no pueden ser excesivas.
- El reactor se debe diseñar para que requiera la mínima cantidad de intervención durante su operación, obtención de productos, limpieza y mantenimiento, para evitar contaminación (Barrera, 2004).
- El cuerpo del reactor debe tener una superficie interna libre de rugosidades; para evitar la acumulación de células o medio de cultivo que puedan generar contaminación.

El reactor debe tener una geometría similar a todos los recipientes de mayor y menor tamaño en la planta piloto o en la planta para facilitar su escalamiento. Los materiales utilizados deben ser económicos y resistentes a las condiciones de operación como altas temperaturas, presiones y agitación, entre otras. Debe contarse con todos los servicios industriales requeridos como agua, vapor, aire y energía eléctrica, transferencia de calor y la esterilización (calentamiento sobre 120 °C) (Asenjo, 1995)

El fermentador, es un recipiente sometido a presión externa ya que sus paredes externas están en contacto con el agua de refrigeración, calefacción o vapor saturado para esterilización. La chaqueta por el contrario, estará sometida a estos fluidos internamente por lo cual se utilizan criterios de diseño de presión interna.

La transferencia de calor está relacionada directamente con el área de la superficie de contacto, el gradiente de temperatura del medio y el material de construcción. El enfriamiento o calentamiento se lleva a cabo con fluidos como vapor, agua caliente o fría, o soluciones de etilenglicol, los cuales son transportados en circuitos. El área de superficie de contacto y la caída de presión en el sistema deben ser optimizadas para cada tanque y fluidos específicos (Asenjo, 1995).

El mezclado es una de las operaciones más importantes en los bioprocesos, pues crea un ambiente óptimo para la fermentación, provee a la célula acceso a todo el sustrato, e incluye el oxígeno en cultivos aerobios y promueve la transferencia de calor desde o hacia el líquido (Doran, 1999).

El mezclado generalmente se lleva a cabo en tanques agitados, los cuales son de forma cilíndrica y con las esquinas redondeadas o anguladas para eliminar zonas de estancado. El mezclado es realizado por impelentes generalmente ubicados en el centro del tanque con respecto al diámetro de la tapa y a una altura igual al diámetro del tanque, según las relaciones estándares existentes. La selección del impelente depende de varios factores, en especial de la viscosidad del líquido y la sensibilidad del sistema al estrés de corte. Para fluidos de viscosidades bajas a medias se recomienda utilizar impelentes tipo propeller o disco de hoja plana; de estos dos, el impelente usado con mayor frecuencia en la industria es el disco de 6 hojas planas conocido también como turbina Rushton (Doran, 1999). En general este tipo de agitadores por poseer las hojas planas en un ángulo de 90°, genera un patrón de flujo radial desde el impelente hasta la pared del tanque donde se divide en dos corrientes, una que fluye hacia arriba y otra hacia el fondo del tanque.

Una parte importante del fermentador es el sistema de aireación, pues cuando se trata con un microorganismo aerobio, se debe asegurar que la aireación sea adecuada. Para esto se utilizan dos instalaciones separadas: un difusor y un impulsor. El difusor es un instrumento con una serie de agujeros en un aro de metal o una boquilla, a través de los cuales se puede hacer pasar hasta el fermentador aire esterilizado por filtración a gran presión. El aire entra en el

fermentador en forma de diminutas burbujas, a través de las cuales el oxígeno pasa por difusión al líquido (Madigan *et al.*, 2015).

#### **1.8.1. Materiales de construcción.**

En bioprocesos, el acero inoxidable 316L es generalmente el material más utilizado para la construcción de biorreactores. Esta elección se basa en criterios como la compatibilidad con una amplia gama de microorganismos, la alta resistencia a la corrosión, ya que el uso de productos ácidos con alto contenido de cloruro, compuestos de limpieza y el vapor puro pueden causar una corrosión considerable de los equipos. El acero inoxidable es resistente a la corrosión debido a una microscópica capa fina de óxido de cromo (Asenjo, 1995).

#### **1.8.2. Vida útil del equipo.**

Tanto la superficie externa del tanque que está expuesta al medio ambiente como la interna que está en contacto con el producto deben tener un acabado de superficie definido que permita un lavado higiénico y fácil. La calidad y suavidad de la superficie tratada mecánicamente está definida por la medida aritmética de la rugosidad (Ra). Calidades de Ra de aproximadamente 0.6  $\mu\text{m}$  (acabado espejo) es el mínimo generalmente aceptado y aprobado en biotecnología (Asenjo, 1995).

## **Capítulo 2: Materiales y métodos.**

### **2.1. Procedimiento para la primera fermentación (erlenmeyer).**

#### **2.1.1. Preparación de los medios de fermentación**

Para realizar la fermentación es necesario preparar medio para inóculo y medio limitado de nitrógeno, en las cantidades de 25mL y 225mL en erlenmeyer de 250mL y 500mL respectivamente.

Medio para inóculo contiene: 50 g/L de glucosa, 15g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona. El pH deberá ser ajustado a 5.5.

Medio limitado de nitrógeno contiene: 50 g/L de glucosa, 8 g/L de extracto de levadura, 3g/L de peptona. El pH deberá ser ajustado a 5.5.

Para pesar las cantidades necesarias para la preparación de los medios se utiliza una balanza técnica digital modelo Sartorius BS2202S.

Para ajustar los pH se utilizada un PH metro Model PHSJ-3F

#### **2.1.2. Esterilización del medio de cultivo.**

Los medios deben ser esterilizados, para ello se utiliza la autoclave vertical: LDZX-50 KAS, a una temperatura de 121<sup>0</sup>C y una presión de 0.1 MPa por un tiempo de 15min, con el fin de garantizar que se trabaje asépticamente.

#### **2.1.3. Preparación del inóculo.**

El medio para inóculo, previamente preparado y esterilizado, se inocula con 5 mL de un medio de enriquecimiento con la cepa de *Rhodotorula sp* (Anexo 2), el inóculo se incuba durante 8 horas a 37<sup>0</sup>C y agitación constante de 260 rpm por medio de una zaranda orbital.

Incubadora: DHG-914GA Model. Electro-thermal; constant-temperature air blowing dry box.

Zaranda orbital: HDL apparatus, de fabricación china.

#### **2.1.4. Inoculación para la fermentación.**

El inóculo previamente preparado, se transfiere para el erlenmeyer con medio limitado de nitrógeno, con todas las precauciones necesarias para evitar contaminaciones de cualquier tipo.

#### **2.1.5. Proceso de fermentación.**

Una vez que ha sido inoculado el medio se coloca en la incubadora con agitación a 260 rpm y temperatura de 37<sup>0</sup>C. Durante el proceso se toman muestras y se le realizan determinaciones de peso seco de biomasa y consumo de sustrato con el fin de seguir el comportamiento microbiano en el transcurso del tiempo. La fermentación (Anexo 3), se da por terminada cuando el peso de biomasa seca se mantiene constante y el contenido de sustrato se ha agotado.

Incubadora: DHG-914GA Model. Electro-thermal; constant-temperature air blowing dry box.

Zaranda orbital: HDL apparatus, de fabricación china.

#### **2.1.6. Determinación de la cinética de crecimiento de *Rhodotorula sp.***

En todo proceso que se lleve a cabo cualquier reacción del tipo biológico, se hace indispensable el conocimiento de todos los parámetros cinéticos del microorganismo presente en la reacción, dichos parámetros son: el comportamiento en la formación de biomasa, el consumo de sustrato, el rendimiento de biomasa y la velocidad específica de crecimiento.

Para la determinación de la cinética se toma asépticamente muestras de 5 mL cada una hora hasta llegar hasta las 24 horas. Las muestras se colocaron en tubos falcon previamente pesados y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, para separar la biomasa del sobrenadante, según metodología planteada por Serna *et al.*, (2013).

### **Determinación de biomasa.**

La biomasa separada por la centrifugación fue lavada y resuspendida en 10 ml de agua destilada y centrifugada nuevamente. Este procedimiento se realiza 2 veces y luego de eliminar los restos de agua, la muestra se pasa a secar en estufa a 26<sup>0</sup>C hasta peso constante. La cantidad de biomasa para ese tiempo se determina por gravimetría, o sea, por diferencia de peso.

Balanza Analítica: Sartorius BS124S.

Centrífuga: Heal Force. Neofuge 15R de fabricación china.

Estufa: DHG-914GA Model. Electro-thermal; constant-temperature air blowing dry box

### **Determinación del consumo de sustrato.**

Para la determinación de la cantidad de sustrato en el medio, en el tiempo se utiliza el sobrenadante de la primera centrifugación de cada punto, se realiza el método DNS el cual determina la presencia de grupos carbonilos libres (C=O) de los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción. Un mol de azúcar reaccionará con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, y da lugar a una relación estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Esta reacción es colorimétrica: el ácido 3,5-dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición del ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro-marrón, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de azúcares reductores, y así muestra de forma indirecta la actividad de los microorganismos.

Equipos utilizados:

Baño de María. HBE basic IKA-WERKE.

Espectrofotómetro: Ray Leígh UV-2601

Para la determinación del consumo de sustrato total se utiliza la siguiente ecuación:

$$C_s = \frac{(S_0 - S)}{S_0} * 100 \quad \text{Ec.2.1}$$

### **Cálculo del rendimiento**

Ya se ha visto que son los rendimientos en biomasa y en producto respectivamente. Son parámetros de importancia fundamental dentro de la microbiología industrial, pues dan una medida de la eficiencia del proceso de producción. De este modo en un proceso destinado a la producción de biomasa, el objetivo será maximizar  $Y_{x/s}$ . En esta investigación el producto deseado está asociado a al incremento de la biomasa pues forman parte de la estructuras membranosas del microorganismo. Para tal caso los valores de rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) se calculan a partir de la siguiente ecuación:

$$Y(x/s) = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Ec.2.2}$$

### **Curvas de crecimiento.**

A partir de los datos experimentales se obtienen las curvas de cantidad de biomasa y consumo de sustrato, ambas con respecto al tiempo, con el fin de determinar la velocidad con que crece *Rhodotorula sp.*, y el tiempo en el que se encuentra en cada fase de crecimiento.

El crecimiento microbiano se estudia y modela según la ecuación de Monod para un sistema discontinuo (Amato, 1992; Fogler, 2001; Quintero R, 1993). La ecuación de Monod, relaciona la velocidad máxima de crecimiento con la concentración del sustrato limitante, la que se expresa como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ec.2.3}$$

El valor  $\mu_{\max}$  y la constante de afinidad por el sustrato ( $K_s$ ) se obtiene por el método del recíproco, a partir de la gráfica de  $1/\mu$  contra  $1/S$ , aplicado a los datos experimentales obtenidos. Debido a que el valor de  $K_s$  está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato,

cuando  $S \gg K_s$ , es despreciable, por lo general  $K_s$ , tiene valores muy bajos, por tanto, concentraciones relativamente bajas de  $S$  son suficientes para hacer que  $\mu = \mu_{\max}$  (Madigan *et al.*, 2015).

Los valores de  $\mu$  se determinan mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(X_t - X_0)}{t} \quad \text{Ec.2.4}$$

### **2.1.7. Métodos de ruptura de célula para la extracción de lípidos**

Con el fin de evaluar los métodos de ruptura se utilizan dos de ellos, reflujo con ácido clorhídrico (HCl) y ultrasonidos.

El ensayo con ultrasonidos se realiza en un equipo de ondas sónicas, marca Selecta de 50 kHz y 500 W de potencia, durante 10 min, 15min y 20 min de exposición.

El ensayo con ácido clorhídrico se realiza con concentraciones de ácido de 2, 4 y 6 mol/L.

La extracción se lleva a cabo por el método propuesto por Bligh y Dyer (1959) modificado para extracción de ácidos grasos

El método que a continuación se describe es una modificación del procedimiento de extracción de Bligh y Dyer.

Se miden 50 mL de muestra y luego se le agregaron 75 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) y se mantuvo en agitación durante 3 horas.

Después de transcurrido este tiempo se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm.

Posteriormente la muestra fue pasada a un matraz de 100 ml para eliminar los solventes en el rotoevaporador y el contenido de lípidos se determinó gravimétricamente.

Rotoevaporador: IKA RV 05 basic, con baño: HBE basic IKA-WERKE.

Agitador magnético: IKA mag-squid (Ocean)

Balanza Analítica: Sartorius BS124S.

### **Determinación de parámetros de eficiencia en la extracción.**

Los parámetros de mayor importancia en la determinación de la eficiencia en el proceso de extracción de lípidos son: la productividad de lípidos ( $P_L$ ) y el

rendimiento de lípidos ( $Y_{L/s}$ ), estos brindan una idea precisa de la cantidad de lípidos obtenidos a partir de la cantidad de biomasa y la cantidad de sustrato respectivamente, por lo que es imprescindible su determinación para poder realizar una comparación entre dos o más métodos en que se varíen, el tipo de ruptura o el solvente utilizado. Para la realización de esta investigación, la comparación se realiza entre dos métodos de ruptura aunque se utiliza el mismo solvente. Los parámetros de eficiencia antes mencionados se pueden determinar mediante las ecuaciones siguientes:

$$P_L = \frac{g \text{ de lípidos}}{g \text{ de biomasa}} \cdot 100 \quad \text{Ec.2.5}$$

$$Y_{L/s} = \frac{\text{gramos de lípidos}}{\text{gramos de sustrato}} \cdot 100 \quad \text{Ec.2.6}$$

## **2.2. Procedimiento para la fermentación en el biorreactor.**

### **2.2.1. Preparación y esterilización de los medios de fermentación.**

Los medios utilizados para la fermentación en el biorreactor se preparan de igual forma que los de fermentación en erlenmeyer, además deben ser esterilizados en autoclave ya que el reactor también debe trabajar asépticamente. Para el caso del biorreactor las cantidades de medio a preparar son 200mL de inóculo y 450mL de medio limitado de nitrógeno.

### **2.2.2. Preparación del inóculo.**

El medio para inóculo, previamente preparado y esterilizado, se inocula con 5 mL del producto de fermentaciones y se pasa a una incubadora con agitación a una temperatura de 37°C y 260 rpm durante aproximadamente 9 horas, ya que en la fermentación anterior la fase exponencial se observa entre la 7 horas y las 15 horas; se escoge las 9 horas con el fin de garantizar que el microorganismo se encuentre en su máxima velocidad de crecimiento. Para corroborar que el crecimiento microbiano se encontraba en fase exponencial, del inóculo preparado se toman muestras de 50ml para determinar peso seco y poder establecer la concentración inicial de la biomasa.

### **2.2.3. Inoculación del fermentador.**

El inóculo previamente preparado, se inocula al fermentador que contiene medio limitado de nitrógeno a través de la vía prevista, se toman las precauciones necesarias para evitar contaminaciones de cualquier tipo, la cantidad de inóculo agregada al reactor es el 10% del volumen del este.

### **2.2.4. Proceso de fermentación.**

Una vez que ha sido inoculado el fermentador se mantiene con una agitación a 260 rpm y temperatura de 37°C (Anexo 4). Al igual que en los ensayos en erlenmeyer, durante la fermentación se toman muestras con el fin de determinar, peso seco de biomasa y consumo de sustrato, para establecer el comportamiento microbiano en el transcurso del tiempo. La fermentación se da por terminada cuando el peso de biomasa seca se mantiene constante y el contenido de sustrato se ha agotado.

### **2.2.5. Determinación de la cinética de crecimiento de *Rhodotorula sp*, en fermentador.**

De la misma forma en que se procede, para determinar la cinética de reacción en los ensayos en erlenmeyer, son determinados para el fermentador.

### **Determinación de biomasa y consumo de sustrato.**

Para la determinación de la biomasa y cantidad de sustrato se procede de igual forma que en los ensayos en erlenmeyer y el cálculo del consumo de sustrato se realiza mediante la ecuación 2.1.

### **Curvas de crecimiento.**

A partir de los datos experimentales que se obtienen en el fermentador se obtienen los gráficos que dan cuenta de la evolución de la cantidad de biomasa y consumo de sustrato con respecto al tiempo con el fin de determinar los parámetros cinéticos de *Rhodotorula sp*.

## **Cálculo del rendimiento.**

El cálculo del rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) para el fermentador se realiza mediante la ecuación 2.2.

### **2.2.6. Métodos de ruptura de célula para la extracción de lípidos para el fermentador.**

La biomasa obtenida en el fermentador fue procesada con los mismos métodos de ruptura y extracción, bajo condiciones y proporciones idénticas con el fin de evaluar los resultados obtenidos en el ensayo en erlenmeyer y las determinaciones de los rendimientos se calculan por las ecuaciones 2.5 y 2.6.

### **2.3. Análisis estadístico:**

Para obtener el modelo matemático que correlaciona las variables; producción de biomasa y consumo de sustrato con el tiempo, se realiza un análisis de regresión simple con ayuda del paquete STATGRAPHICS, versión 5.1.

### **2.4. Diseño del fermentador.**

#### **2.4.1. Tiempos de fermentación.**

En el diseño del fermentador son utilizadas las modelaciones matemáticas y las técnicas de escalado industrial. La primera parte de la investigación se realiza experimentalmente a nivel de banco, en un biorreactor de 0.5 L de capacidad, dotado de los elementos necesarios para el posterior escalado a otro de 100 L. En el mismo y a través de la modelación matemáticas se le determina el tiempo de fermentación del microorganismo en el medio de cultivo.

Según el balance de biomasa se llega a:

$$FX_0 = FX + \frac{dX}{dt} \cdot V - r_x \cdot V \quad \text{Ec.2.7}$$

Si se ajusta esta ecuación a un reactor discontinuo donde no existen flujos de entrada ni de salida entonces  $FX_0 = FX = 0$  y se considera que no hay muerte celular.

$$\cancel{rX_0} = \cancel{rX} + \frac{dX}{dt} \cdot V - r_x \cdot V \quad \text{Ec.2.8}$$

Como el volumen no varía la ecuación de balance para el crecimiento microbiano será:

$$r_x \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V \quad \text{Ec.2.9}$$

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad \text{Ec.2.10}$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{dt} = \int_0^t dt \quad \text{Ec.2.11}$$

expresada en velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

$$t = \int_{X_0}^X \frac{dX}{r_x} \quad \text{Ec.2.12}$$

queda para una biorreacción en que cumpla con Monod:

$$r_x = \frac{\mu_{\max} S \cdot X}{K_S + S} \quad \text{Ec.2.13}$$

se expresa de la forma siguiente

$$t = \int_{X_0}^X \frac{K_S + S}{\mu_{\max} X \cdot S} \cdot dX \quad \text{Ec.2.14}$$

Ya establecido el tiempo fermentación y las relaciones de magnitudes en el reactor modelo o banco, se busca los criterios de escalado más apropiado para el caso de estudio.

En el sistema se mantiene el principio de semejanza entre el modelo y el prototipo, pero en procesos biológicos es necesario además un criterio de escalado, que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo, y este criterio sería el régimen de cambio entre ambas escalas.

Para este caso, el criterio de escaldado que marca el régimen de cambio es el de potencia consumida por el agitador entre unidad de volumen del cultivo (Pg/V), donde para que sea llevado a efecto en la práctica existe la relación (Najafpour, 2007):

$$N_2 = N_1 \left( \frac{D_{t1}}{D_{t2}} \right)^{2/3} \quad \text{Ec.2.15}$$

Para el completamiento del diseño de un fermentador prototipo se debe estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Al conocer los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento para mantener 37°C en el medio de cultivo.

#### **2.4.2. Dimensionamiento del fermentador.**

Para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calculan con una relación de altura - diámetro (H:D) y (D<sub>i</sub>:D) según metodología planteada por (Annicchiárico. C. D, 2011).

#### **2.4.3. La potencia consumida para la agitación.**

Las relaciones de escalado son significativamente simples al escalar con semejanza geométrica y el régimen de flujo del reactor de menor escala es completamente turbulento. El número de Reynolds para biorreactores agitados mecánicamente se define por la ecuación:

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu_m} \quad \text{Ec.2.16}$$

El régimen de transición de laminar a turbulento ocurre cuando  $Re \approx 100$  y el régimen turbulento ocurre cuando  $Re \approx 1\,000$ . La mayoría de los reactores agitados a escala industrial operan en régimen turbulento completamente desarrollado.

Para el cálculo de la potencia se emplea la ecuación siguiente:

$$P = n \cdot N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D_i^5 \quad \text{Ec.2.17}$$

Para realizar el cálculo de la potencia por la ecuación anterior se necesita determinar el número de potencia ( $N_p$ ), y se determina mediante la relación entre el número de potencia y el número de Reynolds (Anexo 5). El resultado obtenido por la ecuación está referido a la potencia cuando no existe aireación por lo que debe ser corregida ya que la mayoría de los procesos fermentativos discontinuos necesitan de un sistema de agitación.

Para estimar la potencia en un sistema aireado se utiliza la correlación siguiente:

$$\frac{P_g}{P} = 0.35 + \frac{0.65}{1+(16.67 \cdot N_A)} \quad \text{Ec.2.18}$$

En la ecuación se hace uso de un módulo adimensional llamado número de aireación ( $N_a$ ). Este módulo se define como el cociente entre la velocidad superficial del gas y la velocidad tangencial en el extremo del impulsor. El valor de  $N_a$  indica el grado de dispersión de las burbujas alrededor del impulsor.

Para determinar el número de aireación, se emplea la relación entre el número de potencia ( $N_p$ ) y  $N_a$ , que se obtiene mediante la existencia de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador (Anexo 6).

Para hallar la potencia consumida por el agitador del fermentador de 150 L se emplea la relación de  $P_g/V$  con respecto al fermentador de 0.5 L, donde se tiene:

$$P_{g2} = \frac{P_{g1}}{V_1} \cdot V_2 \quad \text{Ec.2.19}$$

#### **2.4.4. Balance de calor.**

Los calores involucrados en el proceso de fermentación son:

$$Q_{acum} = Q_{gen} + Q_{ag} + Q_{air} - Q_{sen} - Q_{int} + Q_{evap} \quad \text{Ec.2.20}$$

#### **Calor disipado por el agitador.**

Energía que disipa el agitador, se formula como la energía específica que suministra el agitador, para una velocidad de giro dada:

$$Q_{agit} = \frac{P_g}{V} \quad \text{Ec.2.21}$$

#### **Calor intercambiado con la chaqueta.**

Por medio de un balance de calor en el sistema de proceso fluido térmico en la chaqueta se llega a la siguiente expresión.

$$Q_{int} = U \cdot A \cdot \Delta T_{medio} \quad \text{Ec.2.22}$$

### Calor sensible.

La temperatura del medio (fermentador), debe permanecer constante en 37°C. El calor para alcanzar la temperatura deseada se expresa en la ecuación:

$$Q_{sen} = m \cdot C_p \cdot (\Delta T) \quad \text{Ec.2.23}$$

### Calor por aireación.

El calor se puede obtener mediante la siguiente ecuación:

$$Q_{air} = \left(\frac{G_m}{V}\right) \cdot R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{P_i}{P_0}\right) \quad \text{Ec.2.24}$$

### Calor por evaporación.

El calor por evaporación está dado por la expresión siguiente:

$$Q_{evap} = \frac{m \cdot \lambda}{V} \quad \text{Ec.2.25}$$

### 2.4.5. Cantidad de agua de calentamiento.

En un balance de calor se puede obtener la masa de agua mediante la ecuación siguiente:

$$Q_{int} = m_{(agua)} \cdot C_{p(agua)} \cdot \Delta T \quad \text{Ec.2.26}$$

al despejar la masa:

$$m_{agua} = \frac{Q_{int}}{C_{p(agua)} \cdot \Delta T} \quad \text{Ec.2.27}$$

### 2.4.6. Materiales de Construcción.

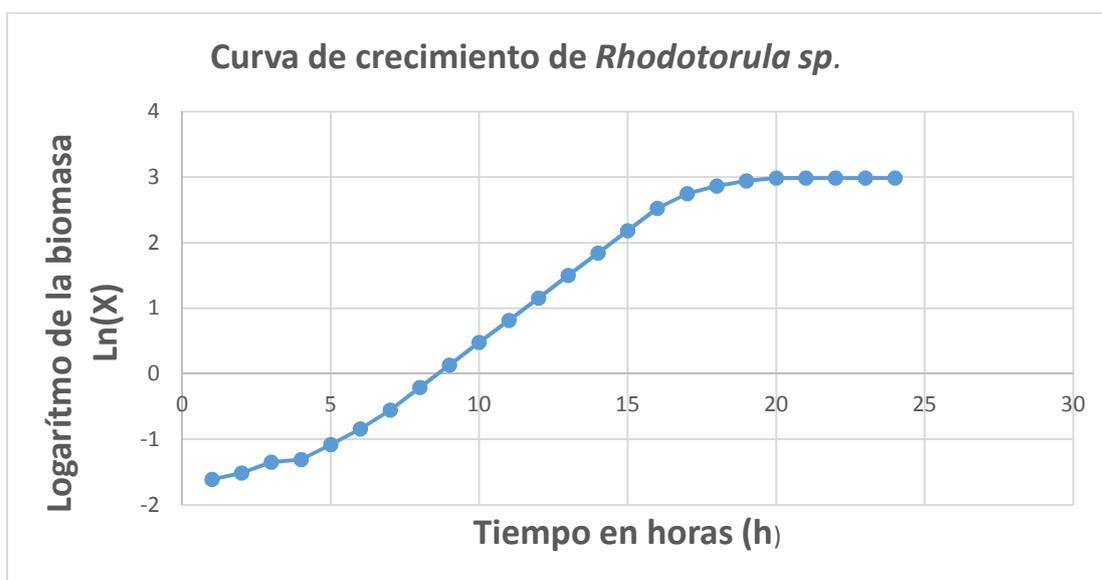
La selección de los materiales de construcción es fundamental en el diseño de un equipo de proceso. Esta depende de las condiciones de operación (temperatura, presión, pH, etc.) a las cuales estará expuesto el material (Doran, P, 1995; Najafpour, 2007).

Otro aspecto importante en la selección del material son los costos de los mismos, dado que los materiales pueden elevar innecesariamente el valor final de los equipos. En este trabajo, la selección de los materiales de construcción para el sistema de reacción se basó en los dos aspectos mencionados.

### Capítulo 3. Resultados y discusión.

#### 3.1. Determinación de la cinética de fermentación de la levadura a nivel de Erlenmeyer.

Los resultados para cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de *Rhodotorula sp.*, se cuantificaron en g/L. A los datos obtenidos se le determinó la media con el fin de realizar las determinaciones necesarias con un valor significativo.

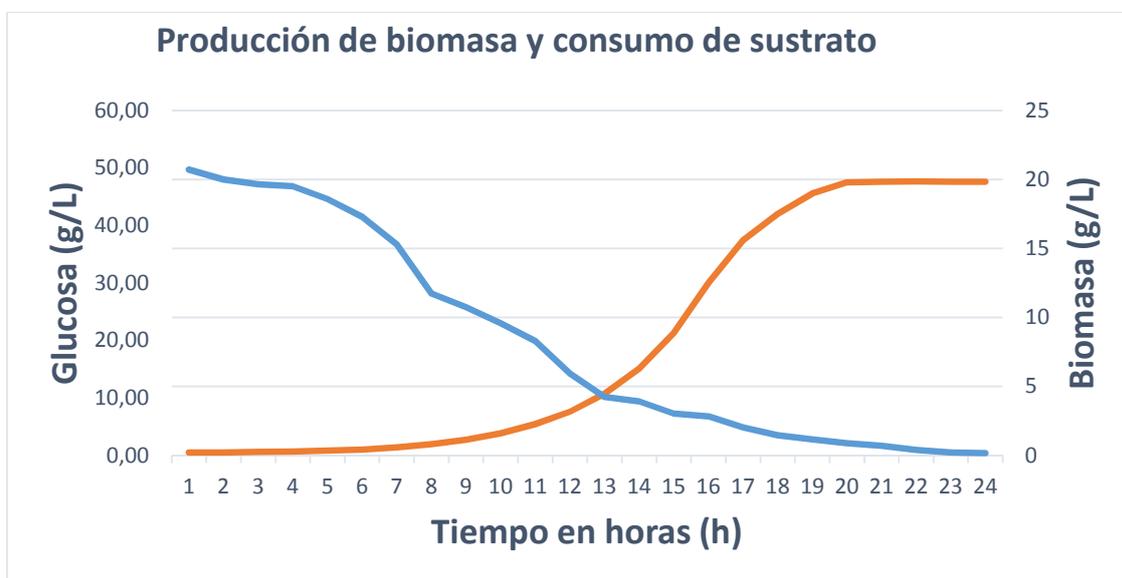


**Gráfico # 1. Curva de crecimiento de *Rhodotorula sp.***

Fuente: Propia.

Como puede observarse en el gráfico 1 la curva de crecimiento muestra una primera fase donde el incremento del logaritmo de la biomasa Ln (X) no reporta un aumento considerable, aunque no se comporta como una fase de latencia típica durante la cual la concentración de biomasa no se modifica substancialmente, pero ocurren profundos cambios en la composición macromolecular y en el estado fisiológico de las células, ambos tendientes a adaptarlas al nuevo entorno. Sin embargo la duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de la complejidad del medio de cultivo (Morioka *et al*, 2014; Najafpour, 2015). En este estudio se parte de un cultivo enriquecido previamente en medio líquido similar al medio de fermentación y con una fuente de carbono y energía simple como lo es la glucosa. Se deduce entonces que el microorganismo se encuentra en un estado fisiológico adecuado lo que justifica este

comportamiento de 3,5 horas aproximadamente, luego se alcanza la fase log o exponencial donde la velocidad específica de crecimiento es máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) y finalmente la fase estacionaria que determina el fin de la fermentación y está caracterizada por mantenerse constante el logaritmo de la biomasa  $\ln(X)$ .



**Gráfico # 2. Producción de biomasa y consumo de sustrato (Erlenmeyer).**

Fuente: Propia.

En el gráfico 2, se muestra la disminución en la concentración de glucosa, debido al consumo de la fuente de carbono demandada por el microorganismo, la concentración de azúcar disminuyó hasta un valor que representa el 99,2 % del azúcar total, lo que demuestra que el sustrato fue consumido en mayor medida para la producción de biomasa, y no para la formación de productos como el etanol ni para el mantenimiento (control de pH, gasto energético para transporte de nutrientes, etc.). Esta manifestación es considerada por varios autores como ideal para la producción de biomasa (Najafpour, 2015; Knothe *et al.*, 2015; Madigan. *et al.*, 2015; Enshaeieh *et al.*, 2015). Sin embargo la autora estima y asume responsabilidad que independientemente al valor del consumo de sustrato otros factores deberán considerarse pues se notó al término de la fermentación un ligero olor alcohólico que sugiere su producción.

En el transcurso de la fermentación se evaluó la concentración celular expresada en peso seco y se relacionó con el tiempo tal como se muestra en el

gráfico 2. Se determinó el rendimiento de biomasa y el consumo de sustrato. En la Tabla 3.1 se observa el resultado de los parámetros estudiados.

**Tabla 3.1. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Rhodotorula sp.***

Parámetros	Valores	Unidad
$X_0$	0	g/L
$X$	19,85	g/L
$S_0$	50	g/L
$S$	0,4	g/L
$\mu_{m\acute{a}x}$	0,34	$h^{-1}$
$K_s$	$S \gg K_s$	
$Y_{x/s}$	0,39	
$C_s$	99,2	%
<b><math>X_0</math> se asume como despreciable el valor inicial de la biomasa.</b>		

Fuente: Propia.

### 3.2. Proceso de extracción de lípidos.

Como se referenció en capítulo anterior después de terminada la fermentación se procede a separar la biomasa por centrifugación, y fue sometida al proceso de extracción de lípidos.

Es necesario destacar que para el proceso de producción de biodiésel, esta etapa es fundamental, debido a que representa una parte significativa del costo total de producción y de ello dependerá la viabilidad y la rentabilidad de una planta de producción de biodiésel. Es por esa razón que el método de extracción de lípidos es valorado en esta investigación.

La pared celular de las levaduras está formada por un complejo de manoproteínas (aproximadamente 25-50 %) que corresponde a una asociación de polisacáridos de -D-manosa con proteínas (manano-oligosacáridos, MOS). Éstas se unen a través de extremos no reductores en forma directa con los 1-3 -glucanos o, indirectamente, con los 1-6 -glucanos. En fin la acción del ácido

clorhídrico sobre la pared celular está dirigida principalmente a la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular, como los glucanos y mananos los cuales tiene un papel importante en el ensamblaje de la misma (Giraudó *et al.*, 2009).

En la tabla 3.2, se observa el efecto de la concentración de ácido clorhídrico como método de disrupción de las células y la cantidad de lípidos obtenidos. Como se aprecia resulta evidente que la concentración del ácido clorhídrico tiene influencia sobre la recuperación de lípidos, además se puede concluir que el aumento de la concentración no está asociada a mayores cantidades de lípidos recuperados. Según Romeroa *et al.*, 2015; Cisneros and Rito, 2005; Morales *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Tanimura *et al.*, 2014, la presencia de materias extrañas, como azúcares complejos y residuos lignocelulósicos, producto a un mal procedimiento en la obtención de la biomasa puede llevar a la obtención de bajos rendimientos debido a que al ser esta hidrólisis poco selectiva el ácido reacciona con esta materia.

**Tabla 3.2. Efecto de la variación de la concentración de ácido clorhídrico sobre la recuperación de lípidos.**

<b>Concentración HCl</b>	<b>Concentración de Lípidos (g/L)</b>	<b>Productividad de Lípidos.</b>	<b>Rendimiento en producto Y<sub>l/s</sub></b>
<b>2 mol/L</b>	2,31	11,61	4,71
<b>4 mol/L</b>	4,40	22,94	8,72
<b>6 mol/L</b>	4,23	21,29	8,46

Fuente: Propia.

Los resultados obtenidos concuerdan con algunos que se reportan en la literatura pues se afirma que las levaduras oleaginosas como las del género *Rhodotorula sp.*, pueden acumular desde 20 a 80 % de lípidos (Amaretti *et al.*, 2010; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Leiva-Candia *et al.*, 2014; Morioka *et al.*, 2014; Knothe *et al.*, 2015) . Sin embargo el comportamiento que muestra la cepa en estudio, solo 22,94 % de lípidos, sugiere que esta no clasifica como una cepa altamente productora de lípidos. La autora sostiene este argumento basada en los resultados de investigaciones hechas por (Martearena *et al.*,

2009; Enshaeieh *et al.*, 2013; Enshaeieh *et al.*, 2015) en las cuales se obtiene 60 % de productividad de lípidos.

### **Resultados del tratamientos con ultrasonidos.**

El ultrasonido utiliza frecuencias entre 20 y 50 kHz. Las ondas de ultrasonido crean muchas microburbujas en muchos sitios de nucleación dentro de la suspensión celular. Estas microburbujas luego colapsan e implosionan durante el período de rarefacción (compresión) de la onda. Este fenómeno, denominado *cavitación*, produce un shock de ondas muy intenso, por lo que genera un fuerte estrés local, hasta deformar al límite las células y producir así su consecuente ruptura.

Como se menciona en capítulos anteriores el método transferencia directa genera amplitudes de oscilación de la onda mucho mayores que en la transferencia indirecta, por esta razón el primer método se utiliza para romper células, mientras que el segundo para disgregar aglomeraciones celulares. No obstante en esta investigación se decide utilizar un baño de ultrasonidos que se corresponde con el método por transferencia indirecta. Para tal decisión se toma en cuenta criterios asumidos en la literatura consultada en las realizan tratamientos sónicos por este método y se reportan resultados satisfactorios (Rosa, 2008; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Atabani *et al.*, 2013; Mejía Cano *et al.*, 2013; Morioka *et al.*, 2014).

Así lo reportan Medeiros *et al.*, (2008), que lograron mayor actividad enzimática en hidrolizados de levaduras, cuando sometieron estas a baños ultrasónicos con diferentes tiempos de exposición.

Para lograr un mayor grado de ruptura y a la vez una mayor extracción de lípidos debe utilizarse una cantidad de energía ultrasónica suficiente que favorezca este proceso. Por ello la frecuencia y la intensidad de la radiación ultrasónica son parámetros que siempre deben ser evaluados en cada estudio de extracción.

Como se describe en el capítulo 2, la frecuencia empleada es de 50 kHz y una potencia de 500 W, tales parámetros, la autora considera que es suficiente

para lograr el quebrantamiento de las paredes celulares de cualquier microorganismo y coincide con Prieto (2009).

**Tabla 3.3 Efecto del tiempo de exposición a ultrasonidos sobre la recuperación de lípidos.**

<b>Ultrasonido</b> <b>50 KHz</b> <b>500W</b>	<b>Concentración</b> <b>de lípidos</b> <b>(g/L)</b>	<b>Productividad</b> <b>de lípidos</b>	<b>Rendimiento</b> <b>en producto</b> <b><math>Y_{p/s}</math></b>
<b>10 min</b>	2,24	11,30	4,49
<b>15 min</b>	3,31	16,66	6,62
<b>20 min</b>	3,24	16,31	6,48

Fuente: Propia

En la tabla 3.3 se observa el efecto de los tiempos de exposición a ondas ultrasónicas sobre la recuperación de los lípidos, se infiere que a tiempos de exposición inferiores a 10 min la concentración de lípidos recuperados es de 2,24 g/L sin embargo a tiempos de 15 y 20 minutos se incrementa la concentración de lípidos hasta concentraciones de 3,31 y 3,24 g/L respectivamente.

Al analizar los resultados de la exposición ultrasónica a 15 y 20 minutos se puede concluir que no hay diferencias significativas entre ellos, y se explica si se tiene en cuenta que el incremento de la intensidad y el tiempo de exposición de la radiación ultrasónica es eficiente hasta cierto valor, a partir del cual no se logra modificar el equilibrio de extracción. Esto es muy importante para lograr hacer de la extracción por ultrasonido un proceso económicamente más factible. Este tratamiento genera un efecto indeseable para algunos procesos, que es el aumento de la temperatura, en esta investigación no excedió los 38 C por lo que la autora decide no tomarlo como criterio de evaluación.

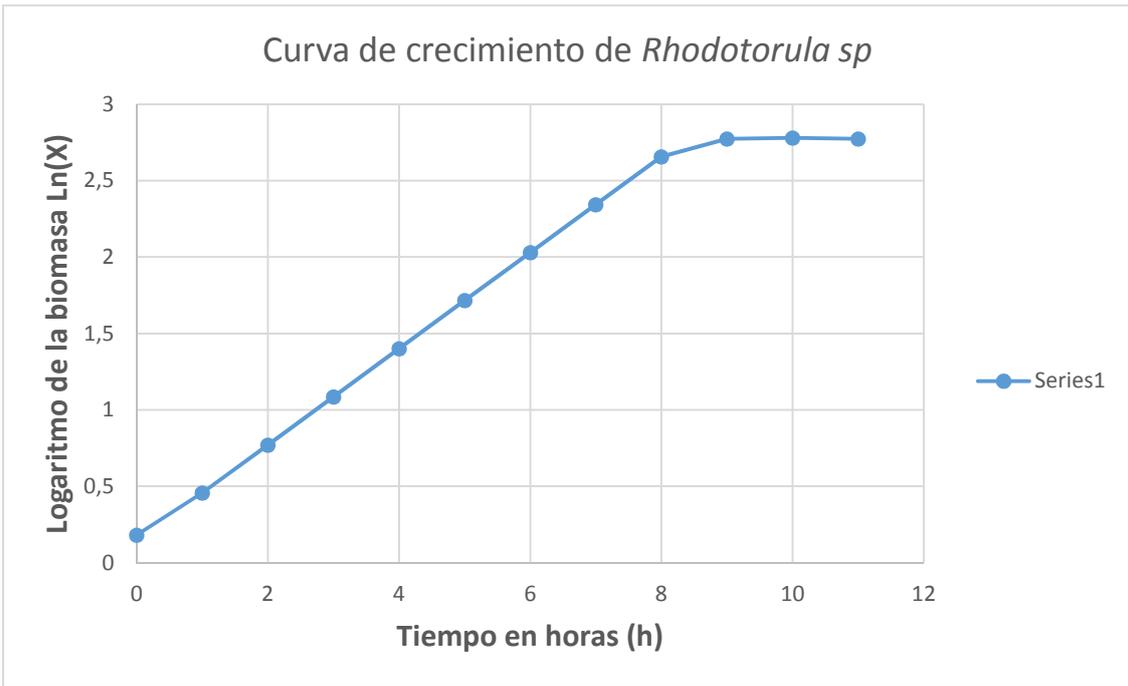
### **3.3. Resultados de los parámetros cinéticos en el fermentador.**

Tal como se explicó para determinar los parámetros cinéticos de la levadura *Rhodotorula sp.* en erlenmeyer agitados, para el reactor, se realizan los mismos procedimientos con respecto a la preparación de los medios de cultivo. No obstante, al tener como referente el comportamiento de los parámetros

cinéticos a escala de laboratorio, se asume los criterios de algunos autores que en esencia expresan la necesidad de eliminar la fase de latencia (Sánchez, 2003; Doran, 1995); pues significa una pérdida de tiempo, por consiguiente consumo de energía y aumento en los costos del proceso así que de manera frecuente se trata de minimizarla. Se precede por tanto en esta investigación a hacer crecer el inóculo en un medio de cultivo igual al que se va a emplear posteriormente, y además transferirlo cuando las células se encuentran en plena fase exponencial. Esta condición debe lograrse una vez que el inóculo alcanza las 9 horas con una concentración teórica inicial de biomasa expresada como peso seco 1,4 g/L. Al tomar la cantidad representativa de 10 % de inóculo tal como lo sugiere Soto, (2004), se comprueba que la concentración celular al momento de tomar la muestra corresponde con el valor que la autora nombró como valor de concentración teórica inicial, de esta forma se determina que la concentración de biomasa inicial es de 1,2 g/L.

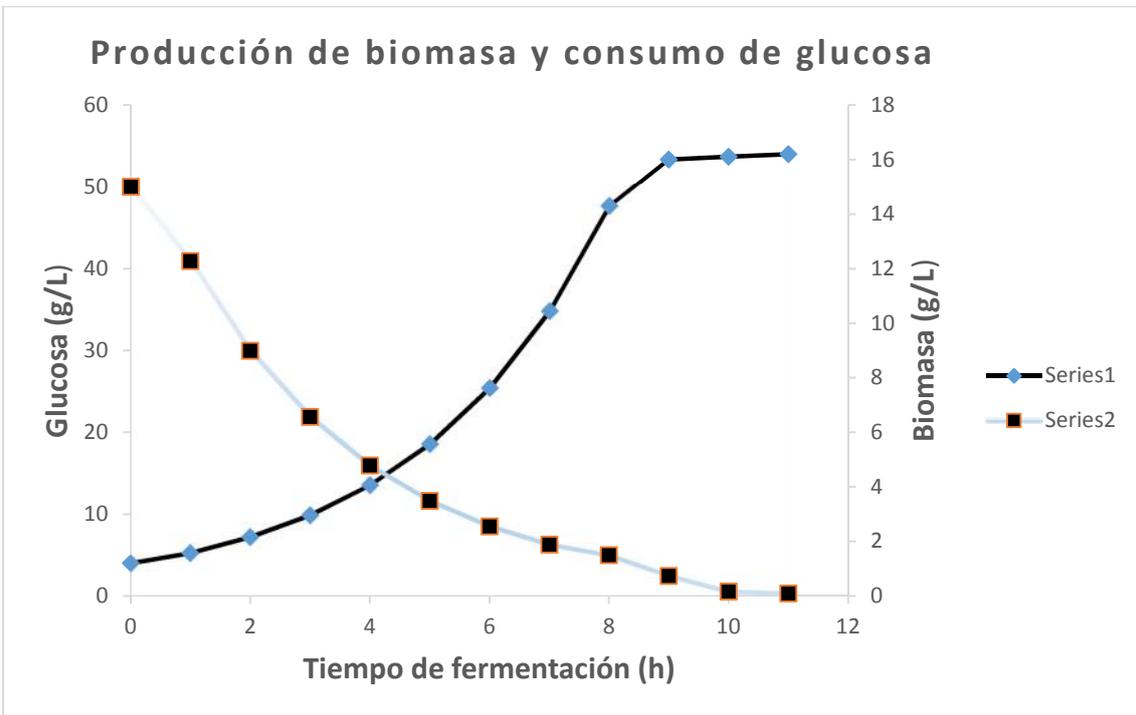
Como se aprecia en el gráfico # 3 que relaciona el logaritmo de la biomasa  $\ln(X)$  contra el tiempo, la fase de latencia se logró minimizar, pues en el transcurso de una hora el microorganismo comenzó su crecimiento exponencial.

Es de esperarse diferencias con respecto al comportamiento cinético del microorganismo cuando crece en un reactor, debido a que los resultados que se obtienen a nivel de laboratorio (Erlenmeyer) son los idóneos. Si se comparan los parámetros cinéticos que rigen este proceso se notan las diferencias antes mencionadas así por ejemplo al analizar el Gráfico # 4 y la tabla 3.4 que muestra la evolución de la biomasa y el consumo de glucosa se distingue que la concentración de la biomasa apenas rebasa los 16 g/L aunque el consumo de glucosa si reporta valores similares. El rendimiento que se obtuvo en esta experiencia difiere un 10 % menos que los que se obtuvo a escala de laboratorio.



**Gráfico # 3. Curva de crecimiento de *Rhodotorula sp.* en el fermentador.**

Fuente: Propia.



**Gráfico # 4. Producción de biomasa y consumo de sustrato en el fermentador.**

Fuente: Propia.

**Tabla 3.4. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Rhodotorula sp.***

Parámetros	Valores	Unidad
<b>X<sub>0</sub></b>	1,20	g/L
<b>X</b>	16,20	g/L
<b>S<sub>0</sub></b>	50,00	g/L
<b>S</b>	0,31	g/L
<b>μ<sub>máx</sub></b>	0,31	h <sup>-1</sup>
<b>K<sub>s</sub></b>	S >> K <sub>s</sub>	
<b>Y<sub>x/s</sub></b>	30,18	%
<b>C<sub>s</sub></b>	99.38	%

Fuente: Propia

### **3.4. Obtención de lípidos para el fermentador**

A continuación se analiza el resultado de los métodos de ruptura publicados en las tablas 3.5 y 3,6 y los gráficos 5 y 6.

En ellas se observa que el tratamiento químico utilizado, es decir hidrólisis con ácido clorhídrico garantiza mayor recuperación de lípidos en el proceso de extracción que los tratamientos con ultrasonidos.

No existe correspondencia de los resultados expuesto en esta investigación con los publicados por Ginés (2014), y Delgado (2015), que aseguran que con los tratamientos sónicos se obtienen mayores rendimiento en la recuperación de lípidos.

Las posibles causa de estas diferencias se atribuyen en este estudio a la hipótesis de que se puede crear una resistencia de acuerdo al contenido graso de la levaduras, ya que forman una especie de capa protectora, que evitan el efecto de cavitación e implosión de las burbujas en la pared de la célula y disminuyen así el efecto del tratamiento con ultrasonido. Sin embargo, el efecto de la grasa sobre la efectividad de los tratamientos con ultrasonido aún no se ha elucidado.

Otro factor que pudiera estar relacionado con los bajos rendimientos del método es que se trabajó con el caldo de cultivo íntegro, es decir no se separó las células del resto de los componentes de medio. Esta condición que fue común para ambos métodos, justifica en parte la diferencia entre los resultados

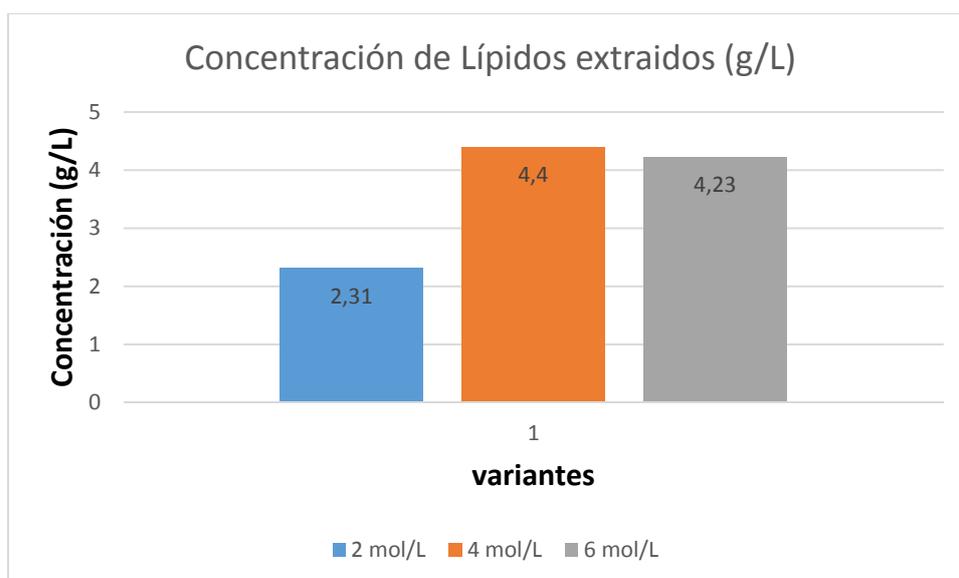
obtenidos en esta investigación y los publicados en la literatura científica (Atabani *et al.*, 2013; Mejía Cano *et al.*, 2013; Morioka *et al.*, 2014).

Por tanto se recomienda tener en cuenta estas circunstancias para próximos estudios.

**Tabla 3.5. Efecto de la variación de la concentración de ácido clorhídrico sobre la recuperación de lípidos.**

Concentración HCl	Concentración de Lípidos (g/L)	Productividad de Lípidos %	Rendimiento en producto Y <sub>l/s</sub>
2 mol/L	2,19	13,55	4,42
4 mol/L	4,20	25,78	8,40
6 mol/L	4,19	25,84	8,43

Fuente: Propia.



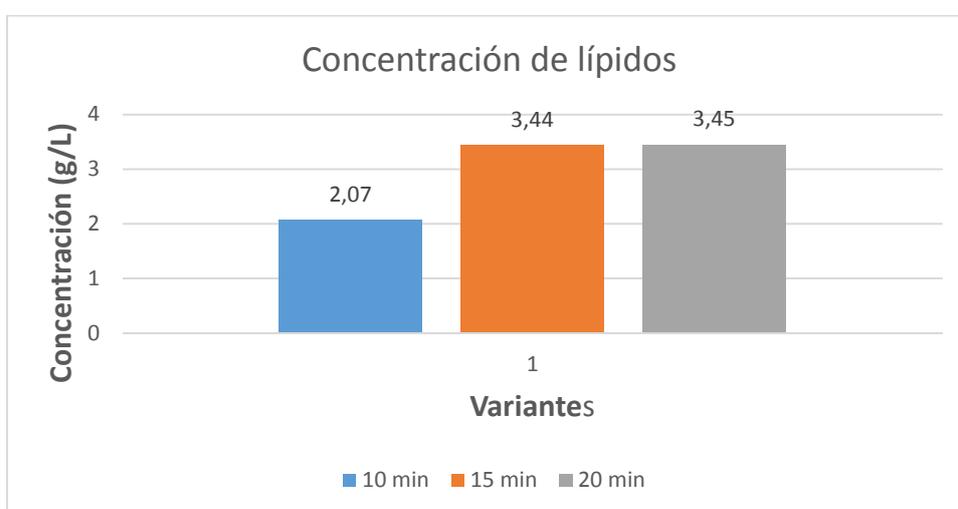
**Gráfico # 5 Efecto de la variación de la concentración de ácido clorhídrico sobre la recuperación de lípidos.**

Fuente: Propia.

**Tabla 3.6. Efecto del tiempo de exposición a ultrasonidos sobre la recuperación de lípidos.**

Ultrasonido 50 KHz 500W	Concentración de lípidos (g/L)	Productividad de lípidos %	Rendimiento en producto Y <sub>l/s</sub>
10 min	2,07	12,81	4,18
15 min	3,44	21,24	6,92
20 min	3,45	21,28	6,94

Fuente: Propia.



**Gráfico # 6 Efecto del tiempo de exposición a ultrasonidos sobre la recuperación de lípidos.**

### 3.5. Análisis estadístico.

Como se observa en la tabla 3.7, los datos del análisis estadístico de la fermentación en Erlenmeyer, muestran que los valores de probabilidad (p-value) para la mayoría de los modelos son menores que 0,01, esto indica que correlacionan estadísticamente la producción de biomasa con el tiempo para un 99% de confianza, para el modelo cuyo valor es mayor que 0.01 pero menor que 0.05 el nivel de confianza es de un 95 %, sin embargo al analizar los coeficientes de correlación y los R<sup>2</sup> ajustados, se observa que el modelo que presenta mayor ajuste es el exponencial (Anexo 7, Figura A), y su expresión matemática es la siguiente:

$$X = e^{(-0.97+0.24 \cdot t)}$$

**Ec.3.1.**

**Tabla 3.7 Modelos de ajuste para la producción de biomasa.**

Modelo	Valor de probabilidad (p-value)	Coefficiente de correlación	R <sup>2</sup> ajustado (%)
Lineal	0.00	0,94	87.66
Exponencial	0.00	0.98	95.24
Recíproco de x	0.02	-0.48	23.35
Doble Recíproco	0.00	0.85	72.61
Logarítmico	0.00	0.77	59.94
Multiplicativo	0.00	0.92	85.18
$\sqrt{\frac{C_s}{x}}$	0.00	0.88	77.20
Curvas S	0.00	-0.67	45.13

Fuente: Propia

Como se observa en la tabla 3.8, los valores de probabilidad (p-value) para la mayoría de los modelos son menores o igual que 0,01, esto indica que correlacionan estadísticamente el consumo de glucosa con el tiempo para un 99% de confianza, para el modelo cuyo valor es mayor 0.05 no se ajusta ya que el nivel de confianza es menor que 95 %, sin embargo al analizar los coeficientes de correlación y los R<sup>2</sup> ajustados, se observa que el modelo que presenta mayor ajuste es exponencial (Anexo 7, Figura B), y su expresión matemática es la siguiente:

$$C_s = e^{(4,8-0,43 \cdot t)} \quad \text{Ec.3.2.}$$

Tal como se reporta en la literatura, para la relación del logaritmo natural contra el tiempo, el modelo que presenta mayor ajuste es el de regresión lineal (Anexo 7, Figura C), Para el referente se realizan ajustes en los datos; ya que solo se toman los que corresponde con la fase exponencial del crecimiento. Esta afirmación se sustenta del análisis que muestra que el coeficiente de correlación es de 0,99, el valor de R<sup>2</sup> de 99,99 % y para un valor de probabilidad de 0,00. Por tanto se asegura con un nivel de confianza del 99 % el grado de correlación entre las variables. También de la ecuación resultante se comprueba estadísticamente el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento  $\mu_{\text{máx}}=0,34 \text{ h}^{-1}$ .

$$\ln X = 0,13 + 0,34t$$

Ec.3.3.

**Tabla 3.8 Modelos de ajuste para la producción de biomasa.**

Modelo	Valor de probabilidad (p-value)	Coefficiente de correlación	R <sup>2</sup> ajustado (%)
Lineal	<b>0.00</b>	<b>-0,96</b>	<b>92.56</b>
Exponencial	<b>0.00</b>	<b>-0.97</b>	<b>93.73</b>
Recíproco de x	<b>0.00</b>	<b>0.70</b>	<b>49.59</b>
Doble Recíproco	<b>0.18</b>	<b>-0.28</b>	<b>7.89</b>
Logarítmico	<b>0.00</b>	<b>-0.94</b>	<b>88.19</b>
Multiplicativo	<b>0.00</b>	<b>-0.82</b>	<b>66.75</b>
Curvas S	<b>0.01</b>	<b>0.53</b>	<b>28.27</b>

Fuente: Propia

El signo + 0 – en los valores de los coeficientes de correlación significan si la tendencia de los datos ajustados a los modelos es positiva o negativa.

En la tabla 3.9, se aprecian los resultados del análisis estadístico realizado para los datos obtenidos de la fermentación en el reactor. En ella se evidencia que los valores de probabilidad (p-value) para la mayoría de los modelos son menores que 0,01, esto indica que correlacionan estadísticamente la producción de biomasa con el tiempo para un 99% de confianza, sin embargo al analizar los coeficientes de correlación y los R<sup>2</sup> ajustados, se observa que el modelo que presenta mayor ajuste es el exponencial (Anexo 8, Figura A), y su expresión matemática es la siguiente:

$$X = e^{(0.05+0.26t)}$$

**E.c 3.4**

Como se observa en la tabla 3.10, los valores de probabilidad (p-value) para la mayoría de los modelos son menores o igual que 0,01, esto indica que correlacionan estadísticamente el consumo de glucosa con el tiempo para un 99% de confianza, sin embargo al analizar los coeficientes de correlación y los R<sup>2</sup> ajustados, se observa que el modelo que presenta mayor ajuste es logarítmico (Anexo 8, Figura B), y su expresión matemática es la siguiente:

$$C_s = 52,09 - 21,6 \cdot \ln t$$

**Tabla 3.9. Modelos de ajuste para la producción de biomasa.**

Modelo	Valor de probabilidad (p-value)	Coefficiente de correlación	R <sup>2</sup> ajustado (%)
Lineal	0.00	0,97	93,66
Exponencial	0.00	0.98	95.97
Recíproco de x	0.01	-0.66	38,93
Doble Recíproco	0.00	0.94	88,92
Logarítmico	0.00	0.87	73,25
Multiplicativo	0.00	0.96	92,49
$\sqrt{\frac{a}{x}}$	0.00	0,93	86,61
Curvas S	0.00	-0.82	64,33

Fuente: Propia

**Tabla 3.10 Modelos de ajuste para el consumo de sustrato.**

Modelo	Valor de probabilidad (p-value)	Coefficiente de correlación	R <sup>2</sup> ajustado (%)
Lineal	0,00	-0,93	86,36
Exponencial	0,00	-0,96	91,00
Recíproco de x	0,00	0,92	84,00
Doble Recíproco	0,27	-0,35	3,2
Logarítmico	0,00	-0,99	98,8
Multiplicativo	0,00	-0,84	68,72
$\sqrt{\frac{a}{x}}$	0,00	-0,97	95,14

Fuente: Propia

Cuando se relaciona el logaritmo natural de la producción de biomasa contra el tiempo se comprueba estadísticamente que el modelo que presenta mayor ajuste es el de regresión lineal (Anexo 8, Figura C). Esta afirmación se sustenta del análisis que muestra que el coeficiente de correlación es de 0,99, el valor de R<sup>2</sup> de 99,99 % y para P=0,00. Por tanto se asegura con un nivel de confianza del 99 % el grado de correlación entre las variables. También de la ecuación resultante se comprueba estadísticamente el valor de la velocidad

específica máxima de crecimiento  $\mu_{\text{máx}}=0,31 \text{ h}^{-1}$   
 $0,31t$

$$\ln X = 0,14 +$$

**Prueba de hipótesis para determinar si existen diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos.**

Para evaluar si existen diferencias significativas entre los resultados de lípidos obtenidos por ambas condiciones se realiza una prueba de hipótesis:

$$H_0: \mu_A = \mu_B$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_B$$

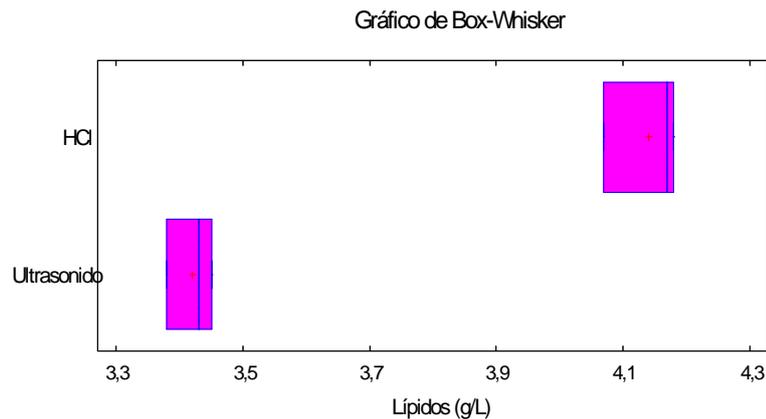
Donde:

$H_0$ : es la hipótesis nula, que refleja que no existen diferencias significativas entre los dos métodos

$H_1$ : es la hipótesis alternativa, que refleja que existen diferencias significativas entre los dos métodos

$\mu_A$  y  $\mu_B$ : las medias para los dos métodos respectivamente.

El resultado de esta comparación para las dos condiciones según la prueba de hipótesis realizada muestra un valor de probabilidad (p-value) igual a 0,00; por lo que es este menor que 0,05; lo que indica que existen diferencias significativas para un 95% de confianza, lo cual se refleja en el figura, y se confirma estadísticamente que al aplicar el método de HCl a 6 mol/L la concentración de lípidos es superior apreciablemente.



**Gráfico # 7. Diferencias significativas de concentración de Lípidos para los métodos.**

Fuente: Propia

### 3.6. Escalado.

#### 3.6.1. Tiempos de fermentación.

Para el proceso a realizar se escoge como modo de operación el discontinuo (*batch*), ya que este ofrece diversas ventajas, entre las que se debe destacar: fácil construcción y manejo y la minimización de los riesgos de contaminación por microorganismos externos (Najafpour. 2007; Alfonso, 2015).

El valor de la  $K_s$  es despreciable con respecto a la concentración de sustrato, de la ecuación Ec. se tiene que:

$$t = \int_{X_0}^X \frac{K_s + S}{\mu_{má} \cdot X \cdot S} \cdot dX$$

Por tanto la ecuación queda:

$$t = \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu_{má} \cdot X}$$

Si se integra:

$$t = \frac{1}{\mu_{má}} \cdot \ln \frac{X}{X_0}$$

Resultado:

$$t = 8,74 \text{ h}$$

### 3.6.2. Dimensionamiento del fermentador.

En la Tabla 3.11 se muestra el dimensionamiento del fermentador diseñado. Para cumplir con el criterio de semejanza geométrica el sistema de agitación del fermentador es de turbina tipo Paletas de hojas planas, para asegurar homogeneidad en todo el volumen de trabajo y facilitar la limpieza. Para determinar los parámetros dimensionales se utilizaron relaciones (H:D) y (D<sub>i</sub>:D) iguales a 2,31 y 0,923 respectivamente.

**Tabla 3.11 .Resultados del diseño del biorreactor prototipo.**

Elemento	Valores	Unidades
V	0.1	m <sup>3</sup>
D <sub>t</sub>	0.4	m
H	0.8	m
D <sub>i</sub>	0.352	m

Fuente: Propia

### 3.6.3. Velocidad de agitación y potencia consumida por el agitador.

Una de las posibles causas de una agitación excesiva, es la muerte celular, para evitar que esto ocurra se hace necesario calcular la velocidad de agitación para el fermentador prototipo. A través de las técnicas de escalado se obtienen las ecuaciones necesarias para el cálculo. (Ec.2.15).El valor de Reynold obtenido por la ecuación 2.16 para el reactor modelo fue de 1 170.

$$N_2 = N_1 \left( \frac{D_{i1}}{D_{i2}} \right)^{2/3}$$

$$N_2 = 260 \left( \frac{0.06}{0.352} \right)^{2/3}$$

$$N_2 = 80 \text{ r.p.m}$$

El  $N_p$  se obtiene mediante el Anexo 5 para agitadores de turbina de hojas planas.

$$N_p = 2.5$$

Cálculo de la potencia

$$P = 1 \cdot 2.5 \cdot 1200 \cdot 4.333^3 \cdot 0.0683^5$$

$$P = 0.36W$$

Se determina  $N_a$  gráficamente (Anexo 6)

$$N_a = 0.032$$

Se determina la potencia para cuando existe la aireación por la ecuación 2.18.

$$\frac{P_g}{0.36} = 0.35 + \frac{0.65}{1+(16.67 \cdot 0.032)}$$

$$P_g = 0.27W$$

Determinación de la potencia cuando hay aireación para el prototipo:

$$P_{g2} = \frac{P_{g1}}{V_1} \cdot V_2$$

$$P_{g2} = \frac{0.29}{5 \cdot 10^{-4}} \cdot 0.1$$

$$P_{g2} = 58 W$$

**Tabla 3.12. Velocidad de agitación y potencia consumida en el fermentador modelo (0.5L) y prototipo (100L).**

Elemento	N (Velocidad de agitación)	P(potencia consumida)
Fermentador de 0.5 L	260 rpm	0.27 W
Fermentador de 100 L	80 rpm	58 W

Fuente: Propia

### 3.6.4. Balance de calor.

Los calores que intervienen en el proceso de fermentación son:

$$Q_{acum} = Q_{gen} + Q_{ag} + Q_{air} - Q_{sen} - Q_{int} - Q_{evap}$$

donde:

#### Calor acumulado.

Al ser un sistema estacionario este calor se desprecia.

#### Calor disipado por el agitador.

$$Q_{agit} = \frac{58}{0.1}$$

$$Q_{agit} = 580 \quad 74.78 \frac{kcal}{h}$$

#### Calor por aireación.

Se desprecia el calor por aireación ya que la presión en la salida del aireador es aproximada a la presión en la superficie del líquido.

#### Calor sensible.

El calor necesario para que el medio alcance la temperatura de 37°C se expresa:

$$Q_{sen} = 120 \cdot 0.8 \cdot (37 - 27)$$

$$Q_{sen} = 960 \frac{kcal}{h}$$

#### Calor intercambiado con la chaqueta.

$$Q_{int} = 0.6 \cdot 1 \cdot 37.5$$

$$Q_{int} = 22.5kW \rightarrow 19\,350 \frac{kcal}{h}$$

#### Calor por evaporación.

Como la temperatura de trabajo es 37°C, el calor por evaporación es despreciable.

### **Calor generado.**

El calor generado se obtiene mediante la expresión:

$$Q_{gen} = Q_{int} - Q_{ag} + Q_{sen}$$

$$Q_{gen} = 19\,350 - 74.78 + 960$$

$$Q_{gen} = 22\,235.22 \frac{kcal}{h}$$

### **3.6.5. Cantidad de agua de calentamiento**

La masa de agua se calcula con un 10% de pérdida de calor.

$$m_{agua} = \frac{19350 \cdot 0.9}{1 \cdot (40 - 35)}$$

$$m_{agua} = 3\,438 \frac{kg}{h} \quad 3.483 \frac{m^3}{h}$$

### **3.6.6. Materiales de construcción.**

Se recomienda acero inoxidable SS 316L para el tanque y los accesorios en contacto con el medio de fermentación ya que cuenta con propiedades específicas de resistencia a la corrosión que justifica su uso a pesar de su elevado costo, en el caso del sistema de enfriamiento (chaqueta) se recomienda el uso de Acero 304.

## Conclusiones

El resultado de la comparación de los métodos de ruptura de células utilizados mostró que el método más eficiente es el de Hidrólisis con ácido clorhídrico.

La prueba de hipótesis corroboró, que la cantidad de lípidos obtenidos por los métodos comparados, no están correlacionados estadísticamente, por lo que existe diferencia significativa entre los métodos.

Los parámetros cinéticos obtenidos de la fermentación fueron  $X=16,20$  g/L,  $Y_{x/s}=30,1$  %,  $C_s=99,38\%$  y  $\mu_{m\acute{a}x}=0,31h^{-1}$

La mayor productividad de lípidos fue de 25,85 %, se corresponde con el tratamiento con ácido clorhídrico.

Se empleó el criterio de escaldo de potencia por unidad de volumen en el diseño de un reactor biológico de 100 L partiendo de otro de 0,5 L.

**Recomendaciones:**

Realizar el estudio utilizando otras cepas de levaduras oleaginosas y otras fuentes de carbono alternativas.

Valorar otros métodos de ruptura celular y solventes para la extracción.

Centrifugar, previo a los tratamientos, para evitar materias extrañas en el proceso de ruptura.

Utilizar para el escalado otros criterios como el coeficiencia de trasferencia de masa constante.

## Bibliografía.

1. Acuña. R. 2015. Dimensionamiento y escalamiento de bioprocesos industriales.
2. Agarwal. A and Das. L. 2001. Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines. *Journal Engineering Gas Turbines and Power*. 123, 440-447.
3. Alfonso. Y. 2015. Propuesta de diseño de los principales equipos tecnológicos de la Planta de roncencia biológica Biorat". Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico
4. Almeida. V. F, García-Moreno. P. J, Guadix. A and Guadix. E. M. 2015. Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. *Fuel Processing Technology*, 133, 152-160.
5. Amaretti. A, Raimondi. S, Sala. M, Roncaglia. L, Lucia. M, Leonardi. A. and Rossi. M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories*, 9, 1-6.
6. Amato. S. P. 1992. Procesos fermentativos. Curso Latinoamericano de síntesis de bioproductos y escalamiento de procesos biotecnológicos. San José, Universidad de Costa Rica y Universidad Nacional.
7. American Society for Testing and Materials. ASTM E2997-16 Standard test method for analysis of biodiesel products by gas chromatography-mass spectrometry. Disponible en: <http://www.astm.org>. fecha de consulta: mayo 2016.
8. Angerbauer. C, Siebenhofer. M, Mittelbach. M, Guebitz. G.M. 2008 Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol* 99:3051–3056.
9. Annicchiarico. C. D, González. N. C. 2011. Diseño conceptual de un fermentador para la producción de n- butanol a partir de glucosa empleando *clostridium acetobutylicum*atcc 824. Universidad Industrial de Santander. Colombia.
10. Asenjo. J. 1995. Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures, Scale-Up. En: *Biorreactor System Design*. U.S.A. Marcel Dekker, inc.

11. Atabani. A, Silitonga. A, Ong. H, Mahlia. T, Masjuki. H, Badruddin. I. A. and Fayaz. H. 2013. Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 211-245.
12. Barrera. M. 2004. Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Tesis (Ingeniera Química). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 110 p.
13. Beltrán. A. P. 2011. Desarrollo tecnológico de un biodiesel de segunda generación. Máster para obtener el grado de: Maestro en ciencias con especialidad en geociencias y administración de recursos naturales, Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura
14. Bligh. E.G and Dye. W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917.
15. Chi. Z, Zheng. Y, Jiang. A. and Chen. S. 2011. "Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process." *Applied biochemistry and biotechnology* 165(2): 442-453.
16. Chun-Hai. Z, Tong. Z, Mei. L, Zhen-Ming. C. 2010. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochemistry*. 45: 1121-1126.
17. Cisneros. M. and Rito. M. 2005. Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *Revista mexicana de ingeniería química*, 4, 131-139.
18. Dai. C.C, Tao. J, Xie. F, Dai. Y. J, Zhao. M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*. 6, 2130-2134.
19. Delgado. J. O. 2015. "Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos." *Publicaciones e Investigación* 6: 141-152.

20. Demirbas. A. 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 14–34.
21. Doran. P. 1999. Fluid flow and Mixing. En: *Bioprocess engineering Principles*. London. Academic Press Limited. p. 139.
22. Doran. P. M. 1995. *Bioprocess engineering principles*, Academic press.
23. Duarte. A. 1998. *Introducción a la ingeniería Bioquímica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 529 p.
24. Enshaeieh. M, Abdoli. A. and Madani. M. 2012. "Bioconversion of different carbon sources into microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts." *J. Biol. Today's World* 1(2): 82-92.
25. Enshaeieh. M, Abdoli. A. and Madani. M. 2013. Selection and optimization of single cell oil production from *Rhodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *Journal of cell and molecular research*, 4, 68-75.
26. Enshaeieh. M, Abdoli. A. and Madani. M. 2015. Single Cell Oil (SCO) Production by *Rhodotorula mucilaginosa* and Its Environmental Benefits. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 387-400.
27. Fogler. H. S. 2001. *Elementos de Ingeniería de las reacciones químicas*. (3 ed.). México: Prentice Hall.
28. Fontanille. P, Kumar. V, Christophe. G, Nouaille. R. and Larroche. C. 2012. "Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*." *Bioresource Technology* 114: 443-449.
29. Gao-Qiang. L, Qin-Lu. L, Xian-Chun. J, Xiao-Ling. W and Yan. Z. 2010. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils.
30. García. M. C, da Silva D. D, Grigull. V. H, Wagner. T. M, Apati. G. P, Schneider. A. L, de Aragão. G. M and Pezzin. A. P. 2009 "Estudo do efeito de diferentes estratégias de extração sobre as propriedades do poli (3-Hidroxibutirato)."
31. Ginés Rodríguez, E. 2014. "Los ultrasonidos como alternativa a la desinfección con hipoclorito: efectos sobre la vida útil en boniato (*Ipomoea batatas*) mínimamente procesado.
32. Giraudó. M, Vicente. F, Scollo. D, Ugarte. M, Kulhawiuk. D, Fomicz. S. and Mora. V. 2009. Determinación de glucomanos en pared celular de

- Saccharomyces cerevisiae* por electroforesis capilar de zona. *ACE: Revista de enología*, 2.
33. Hu. C, Zhao. X, Zhao. J, Wu. S and Zhao. Z. K. 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 100, 4843-4847.
  34. Jiménez. I y Rojas. C. 2003. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* subesp. kurstaki en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Tesis (Ingeniera Química). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 130 p.
  35. Katre. G, Joshi. C, Khot. M, Zinjarde. S, RaviKumar. A. 2012. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express*. 2, 1-14.
  36. Knothe. G, Krahl. J and Van Gerpen. J. 2015. *The biodiesel handbook*, Elsevier.
  37. Körbitz. W. 1999. Biodiesel production in Europe and North America, an encouraging prospect. *Renewable Energy*. 16, 1078-1083.
  38. Koutinas. A, Chatzifragkou. A, Kopsahelis. N, Papanikolaou. S and Kookos. I. K. 2014. "Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production." *Fuel* 116: 566-577.
  39. Lee. S.S. 2004. In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. EN: *Animal feed Science and Technology*. Vol. 115, N° 3-4 (May. 2004); p. 215-226.
  40. Leiva-Candia, D.E ; Pinzi, S ; Redel-Macías, M.D ; Koutinas, A; Webb, C; Dorado, M.P; 2014. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*. 123, 33-42.
  41. Li. Y.H, Zhao. Z.B, Bai. F.W. 2007 High-density cultivation oleaginous *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed batch culture. *Enzyme Microbiology Technology* 41: 312-317
  42. Limtong. S, Kraisintu. P and Yongmanitchai. W. 2010. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16.

43. Li-Xia P, Deng-Feng Y, Li S, Wei L, Gui-Guang C, Zhi-Qun L. 2009. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*. 47: 215-220
44. Loera-Quezada, Olguin E. 2010. Las microalgas oleaginosas como productoras de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 1: 91 – 116.
45. Lydersen. B. K, D'Elia. N. A, Nelson. K. L and Jakoby. W. B 1994. *Bioprocess engineering: systems, equipment and facilities*, Wiley New York.
46. Madigan. T. M, Martinko. J. M, Bender. K. S, Buckley. D. H and Stahl. D. A 2015. *Biology of microorganisms (BROCK)*. 14 ed.: Prentice Hall Hispanoamericana.
47. Maldonado. O. A. 2013 Evaluación de la producción microbiana de aceites a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de biodiesel.
48. Martearena. M, Scaroni. E and Locatelli. S. Producción de lípidos a partir de levadura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*. 2009. Segundo Congreso Iberoamericano, Hidrogeno y Fuentes Sustentables de Energía, HYFUSEN, Córdoba, Argentina.
49. Medeiros. F. O, Alves. F. G, Lisboa. C. R, Martins. D. S, Burkert. C. A V and Kalil. S. J. 2008. "Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório." *Química Nova* 31(2).
50. Mejía Cano, A. M; Aguilar, R. C. M; and Bernadette, K. C. 2013. Evaluación del efecto de factores intrínsecos de una matriz líquida sobre la inactivación microbiana mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad.
51. Métodos de disrupción celular. 2016 disponible en: <http://www.thebellmeade.com>.
52. Monthieu. Ch. 2010. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel. Proyecto fin de carrera de Ingeniería en Organización Industrial.
53. Morales. R, Brufau. J and Francesch. M. 2008. Las Paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

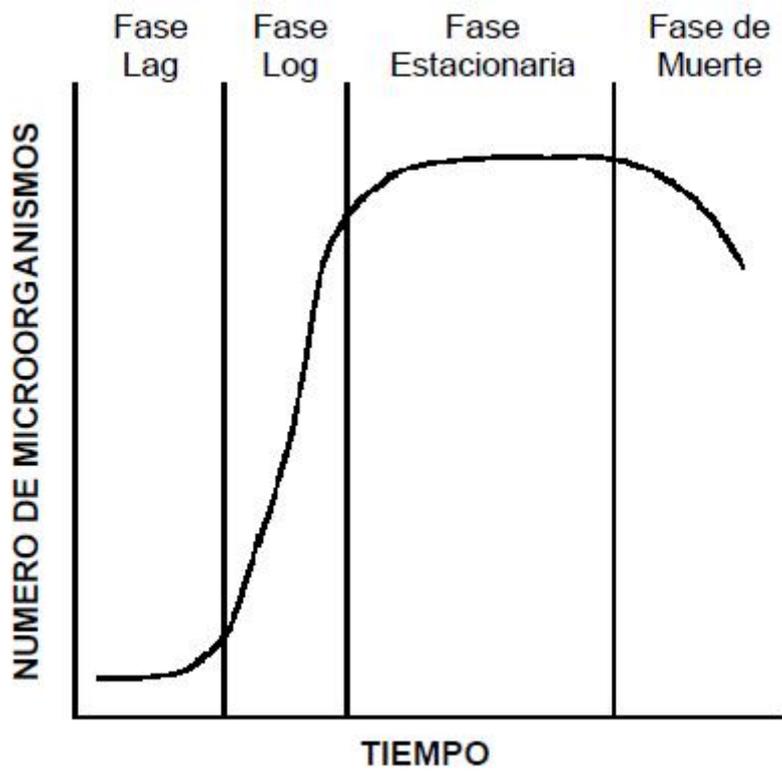
54. Morioka. L. R. I, Matos. Â. P, Olivo. G and Sant'anna. E. S. 2014. Floculação de *Chlorella sp.* produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. *Química Nova*, 37, 44-49.
55. Najafpour, Ghasem D. 2007. Appendix A2 *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier.
56. Najafpour. G. D. 2015. Chapter 6 - Bioreactor Design. *Biochemical Engineering and Biotechnology (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier.
57. Papanikolaou. S and Aggelis. G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1031-1051.
58. Parra. M. E. 2004. Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Tesis de grado (ingeniera química). Bogotá: Universidad de los Andes. Facultad de ingeniería química.
59. Posadas. A. 2011. Desarrollo tecnológico de un biodiesel de segunda generación. Tesis de maestría en geociencias y administración de recursos naturales.
60. Prieto, F .2009 Escalado del proceso de transformación directo del microorganismo "*Mucor circinelloides*" en biodiésel. Proyecto de fin de carrera.
61. Qiao. K, Abidi. S. H. I, Liu. H, Zhang. H ,Chakraborty. S, Watson. N, Ajikumar. P. K. and Stephanopoulos. G. 2015. "Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*." *Metabolic engineering* 29: 56-65.
62. Quines. L. K, Schmidt. M, Zanfonato. K, Schmidell. W and Aragão. G. M. 2015. "Métodos de extração de poli-hidroxialcanoatos a partir de biomassa bacteriana." *Química Nova* 38(9): 1207-1218.
63. Quintero. R. 1981. Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. 332 p.
64. Quintero. R. R. 1993. Escalamiento de fermentaciones. En Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. México: Alhambra, México.

65. Reyna .G.R. 2012 Producción de lípidos por cepas nativas de *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula Mucilaginosa* y generación de un consorcio microbiano. Tesis de Maestría en Ciencias con acentuación en Microbiología
66. Romeroa, L., Parra, R. and Martínez, A.K., 2015. Evaluation Method of Removing the lutein obtained from cell disruption of the microalgae *Haematococcus pluvialis*. 13 LACCEI Annual International Conference. "Engineering Education Facing the Grand Challenges, Santo Domingo, Dominican Republic.
67. Rosa. D. D. 2008. Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa Phytopathologica*, 259-261.
68. Rossi. M, Amaretti. A, Raimondi. S and Leonardi. A. 2011. "Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi." *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies* 1: 72-74.
69. Ryu. B.G, Kim. J, Kim. K, Choi. Y.E, Han. J.I, Yang. J.W. 2013. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresource technology*. 135, 357-364.
70. Sánchez. R. 2003. Optimización de la operación de biorreactores en el proceso de fermentación biológica. Tesis (Magíster en Ingeniería Mecánica). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Mecánica. p 110.
71. Sankh. S, Thiru. M, Saran. S, Rangaswamy. V. 2013. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel*. 106, 690-696.
72. Santamauro. F, Whiffin. F. M, Scott. and Chuck. C. J. 2014. "Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources." *Biotechnology for biofuels* 7(1): 1.
73. Serna. L, Camargo. F, Rengifo. C. A. 2013. Actividad antimicrobiana y cinética de fermentación de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans*. *Rev. Fac. Ing. Univ.* 55.
74. Seye, O. 2003. Análise de ciclo de vida aplicada ao processo produtivo de cerâmica estrutural tendo como insumo energético capim elefante

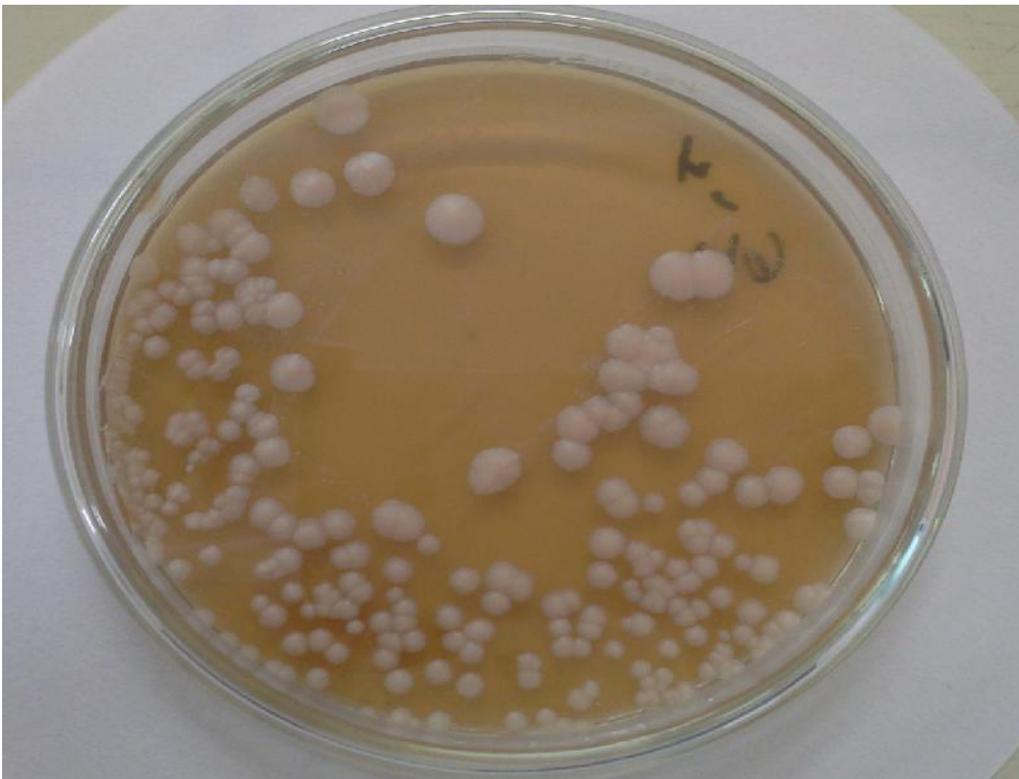
- (*Pennisetum purpureum Schaum*). Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 167
75. Shuler. M. L and Kargi. F. 2002. Bioprocess engineering, Prentice Hall New York.
76. Soto. M. 2004. Estudio de la producción de biomasa en un cultivo de *Bacillus thuringiensis* subesp *kurstaki* por medio de una metodología de alimentación fedbatch continua. Tesis (Ingeniera Químico). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. P 88 .
77. Souza. C, Gurpilhares. D and Roberto. I. 2013 "Estudo dos parâmetros de rompimento das células de *saccharomyces cerevisiae* visando otimizar a liberação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase."
78. Tai. M. and. Stephanopoulos. G 2013. "Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production." *Metabolic engineering* 15: 1-9.
79. Tanimura. A, Takashima. M, Sugita. T, Endoh. R, Kikukawa. M, Yamaguchi. S, Sakuradani. E, Ogawa. J and Shima. J. 2014. "Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production." *Bioresource Technology* 153: 230-235
80. Tanimura. A, Takashima. M, Sugita. T, Endoh. R, Kikukawa. M, Yamaguchi. S, Sakuradani. E, Ogawa. J and Shima. J. 2014. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology*, 153, 230-235.
81. Thiru. M, Sankh. S, Rangaswamy. V. 2011. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource technology*. 102, 10436-10440.
82. Thiru. M, Sankh. S, Rangaswamy. V. 2011. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource technology*. 102, 10436-10440.
83. Tovar. C. T, Benítez. L. T, Ortiz. Á. V and. Rodríguez. L. M 2013. "Obtención de biodiesel a partir de diferentes tipos de grasa residual de origen animal." revista. Luna. Azul 36: 10-25.
84. Vélez. D. 2014 Obtención de biodiésel a partir de aceites fúngicos.

85. Wang. Q, Guo. F.J, Rong. Y.J, Chi. Z.M. 2012. Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. *Renewable Energy*. 46, 164-168.
86. Xue. F.Y, Zhang. X, Luo. H. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem*. 41: 1699-1702.
87. Zhu. L.Y, Zong. M.H, Wu. H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource technology*. 99, 7881-7885.

**Anexo 1: Curva de crecimiento en microorganismos.**



**Anexo 2: Cepa de *Rhodotorula* sembrada en medio de cultivo sólido.**



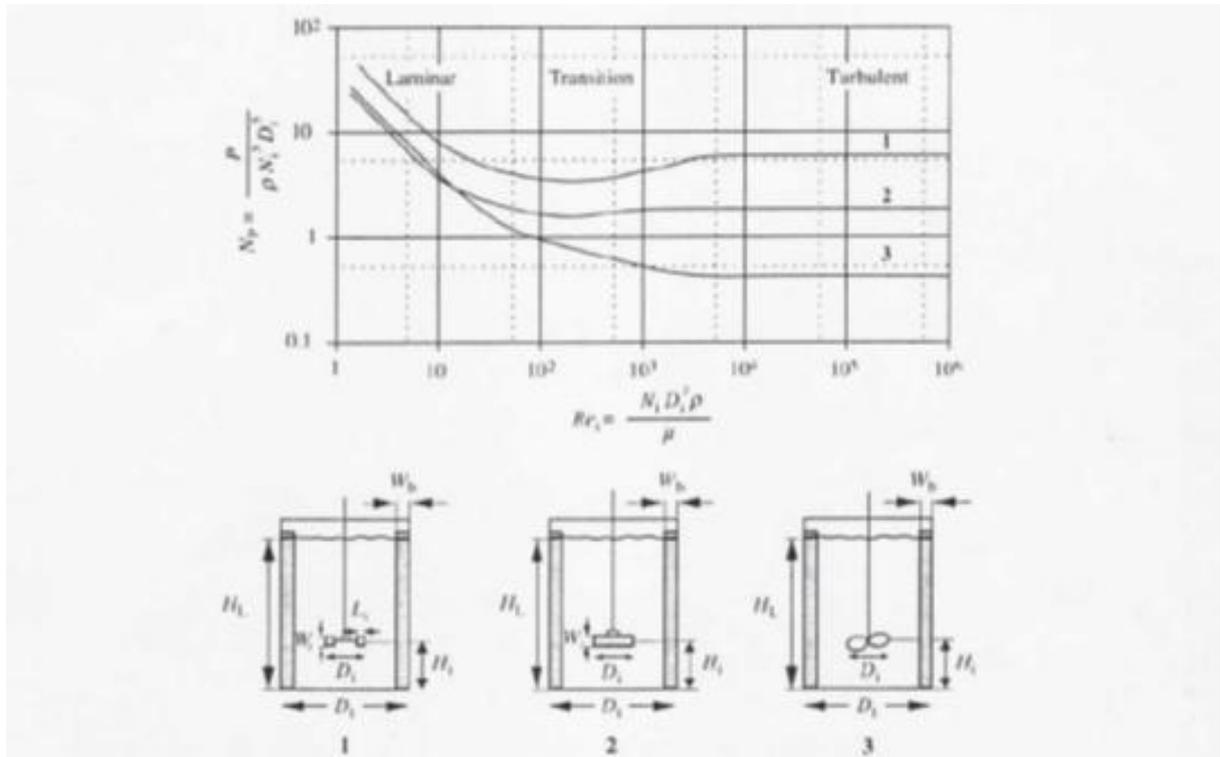
**Anexo 3 Proceso de fermentación en erlenmeyer.**



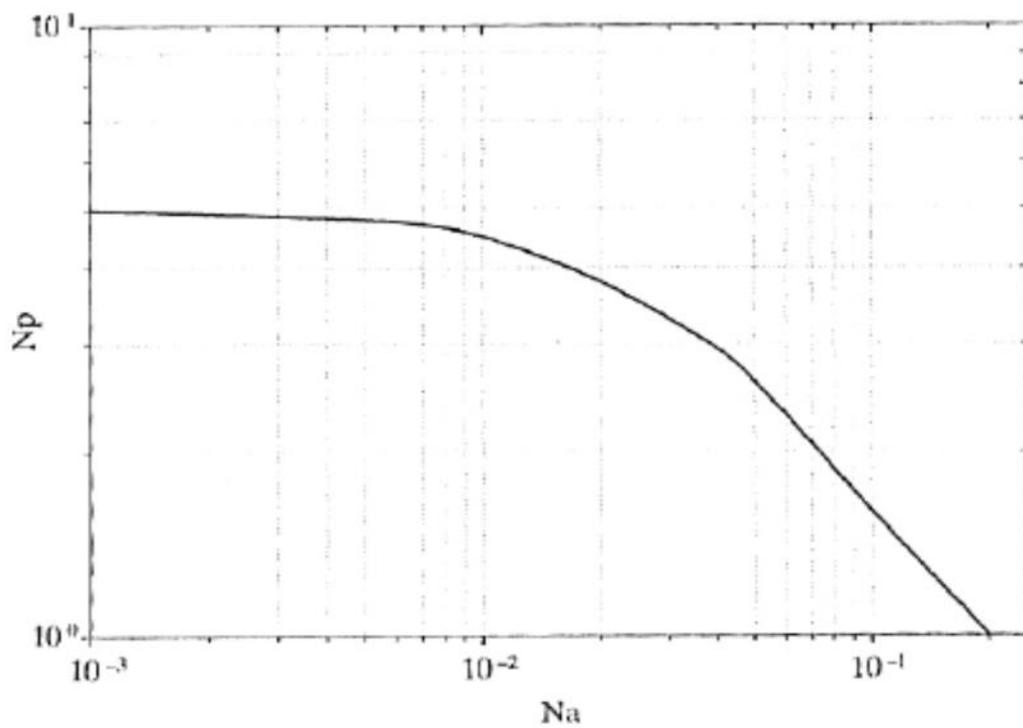
**Anexo 4: Proceso de fermentación en el biorreactor.**



Anexo 5: Relación entre el número de potencia y el de Reynolds para diferentes tipos de impulsores.



Anexo 6: Relación entre el número de potencia y el número de aeración.



Anexo7: Modelos de correlación entre la producción de biomasa, el consumo de sustrato y el logaritmo de la biomasa con el tiempo (Erlenmeyer).

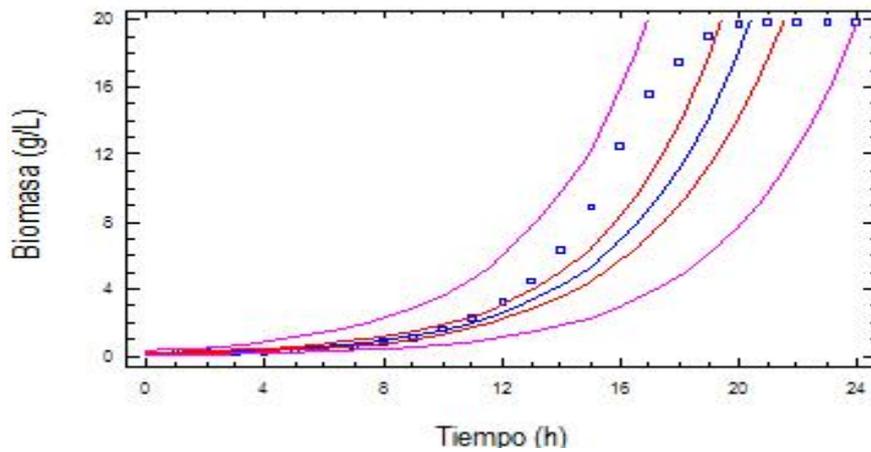


Figura A. Modelo de correlación (exponencial) entre la producción de biomasa con el tiempo.

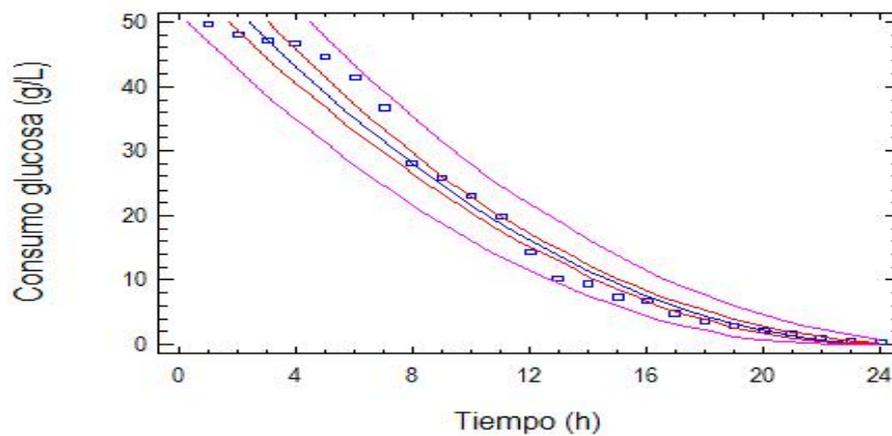


Figura B. Modelo de correlación (exponencial) entre consumo de glucosa con el tiempo.

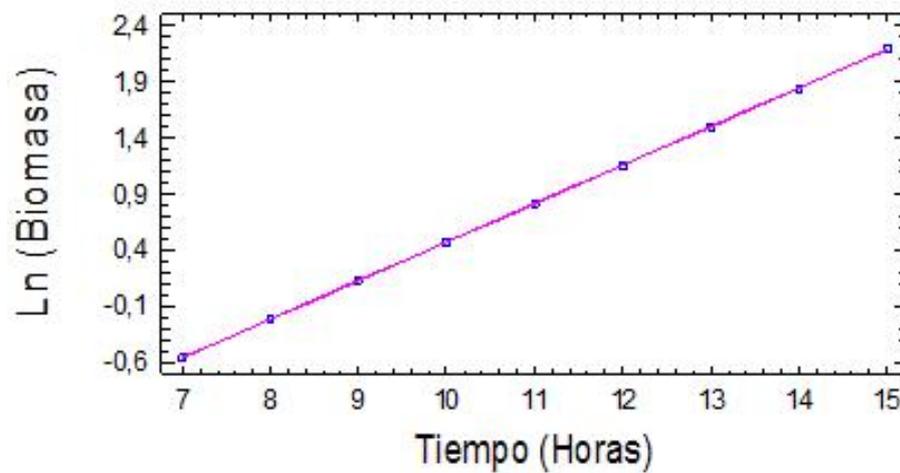


Figura C. Modelo de correlación (lineal) entre el Ln de la biomasa con el tiempo.

Anexo 8: Modelos de correlación entre la producción de biomasa, el consumo de sustrato y el logaritmo de la biomasa con el tiempo (escala banco).

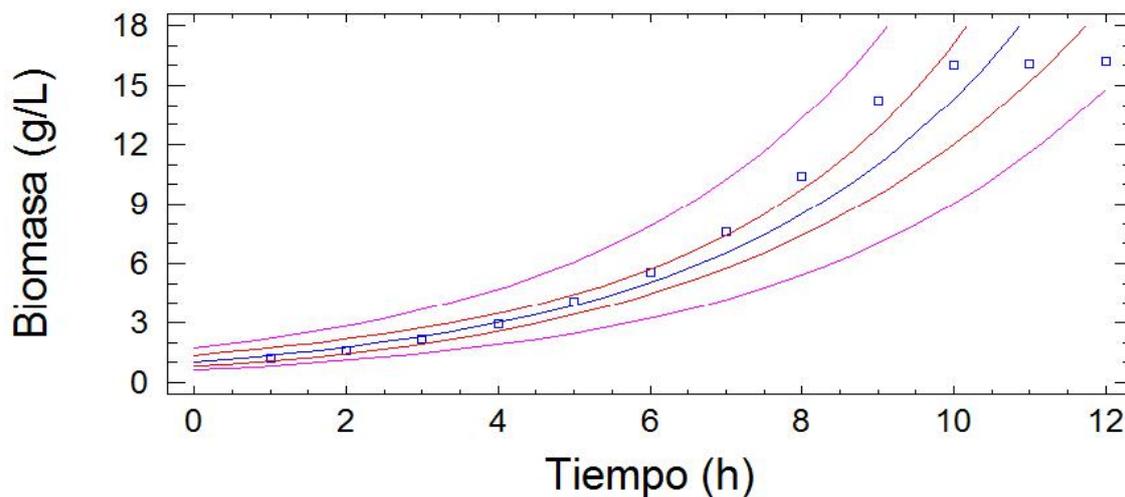


Figura A. Modelo de correlación (exponencial) entre la producción de biomasa con el tiempo.

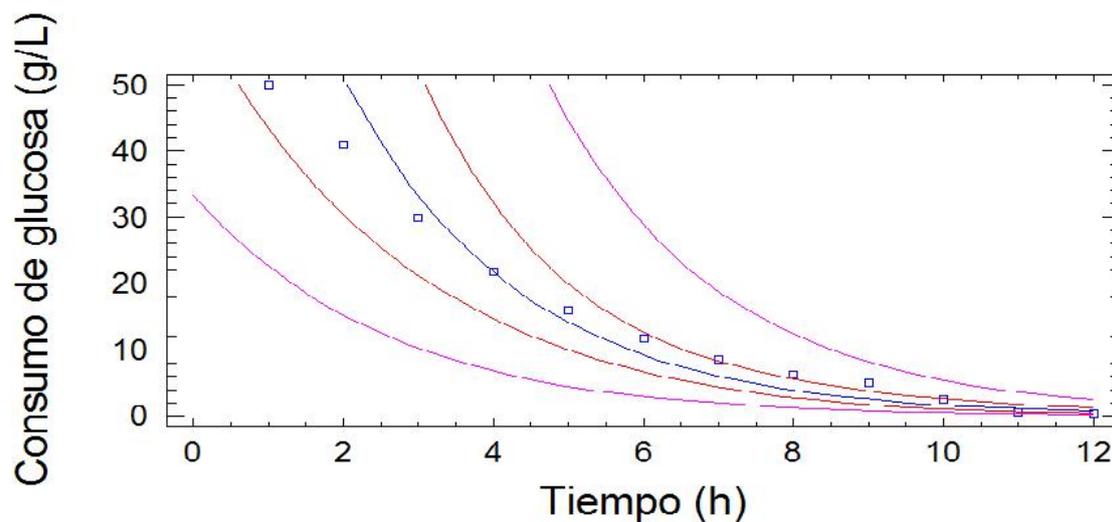


Figura B. Modelo de correlación (exponencial) entre consumo de glucosa con el tiempo.

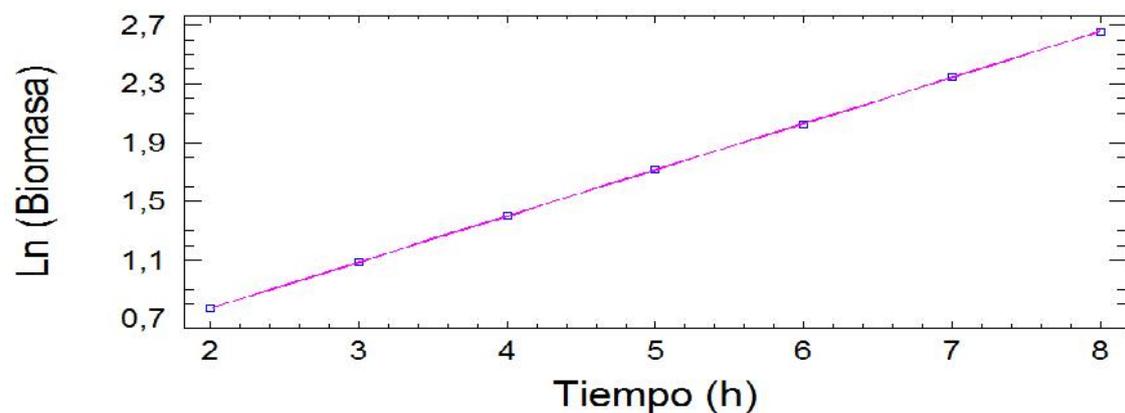


Figura C. Modelo de correlación (lineal) entre el Ln de la biomasa con el tiempo.



