



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD SALTILLO**

**SUSTENTABILIDAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y  
ENERGÍA**

**Determinación de los parámetros cinéticos en la  
biotransformación de glicerol crudo a etanol**

**Tesis que presenta**

**Ing. Vianey Martínez Bautista**

**Para obtener el Grado de**

**Maestra en Ciencias en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y  
Energía**

**Directores**

**Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez**

**Dr. Leopoldo Javier Ríos González**

**Ramos Arizpe, Coahuila**

**Agosto, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido durante la realización de este proyecto. Al personal que estuvo involucrado indirectamente, como laboratorios de análisis de la unidad.

Se agradece el apoyo al Dr. Salvador por su apoyo para el análisis de la cinética. A la Dra. Thelma por el apoyo con el equipo HPLC de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Agradezco el apoyo por parte de mis directores, Dr. Leopoldo y Dra. Lourdes

A los miembros del programa de la maestría y compañeros.

Y finalmente a mis familiares y amigos que me motivaron a seguir a delante aun a pesar de la distancia.

## CONTENIDO

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	iv
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1. Producción de etanol.....	2
2.2. Producción de etanol en México.....	3
2.3. Etanol como combustible.....	4
2.4. Generalidades del glicerol .....	6
2.5. Fermentación .....	12
2.6. Microorganismos productores de etanol .....	13
2.7. Cinética de crecimiento .....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	29
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	31
5.1. Objetivos General .....	31
5.2. Objetivos específicos .....	31
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	32
6.1. Revisión bibliográfica, parámetros de operación durante la fermentación .....	32
6.2. Diseño experimental .....	32
6.3. Caracterización fisicoquímica.....	33
6.4. Tratamiento glicerol crudo.....	35
6.5. Adaptación de microorganismos al glicerol crudo .....	36
6.6. Adaptación de <i>S. cerevisiae</i> al glicerol.....	37
6.7. Cuantificación de biomasa.....	38
6.8. Curva de crecimiento .....	38
6.9. Etapa 1. Fermentación en biorreactores.....	39
6.10. Etapa 2. Fermentación en reactor de 7 L.....	40

6.11.	Análisis estadístico.....	41
6.12.	Determinación de parámetros cinéticos .....	41
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
7.1.	Caracterización de glicerol crudo .....	43
7.2.	Activación de microorganismos y adaptación a glicerol .....	46
7.3.	Crecimiento de los microorganismos en glicerol crudo .....	49
7.4.	Purificación de glicerol crudo.....	53
7.5.	Curva de crecimiento glicerol puro.....	54
7.6.	Fermentación en microrreactores con glicerol puro .....	56
7.7.	Curva de crecimiento glicerol crudo tratado.....	62
7.8.	Fermentaciones en glicerol crudo tratado .....	65
7.9.	Análisis estadístico .....	69
7.10.	Determinación de los Parámetros cinéticos en microrreactores.....	72
7.11.	Escalamiento en reactor controlado .....	76
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción mundial de etanol (miles de L) [13]. .....	3
<b>Tabla 2.</b> Mezclas etanol – gasolina [11]. .....	5
<b>Tabla 3.</b> Composición de glicerol crudo obtenido en distintos procesos. ....	8
<b>Tabla 4.</b> Grados de purificación glicerol. ....	9
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los parámetros de fermentación anaerobia de <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> . .....	32
<b>Tabla 6.</b> Diseño experimental. ....	33
<b>Tabla 7.</b> Caracterización de glicerol crudo, (% p/p). ....	45
<b>Tabla 8.</b> Caracterización glicerol crudo de diversas fuentes de materia prima. ....	46
<b>Tabla 9.</b> Nomenclatura de experimentos en microrreactores .....	56
<b>Tabla 10.</b> Cambio de pH después de la fermentación glicerol puro .....	57
<b>Tabla 11.</b> Cambio de pH durante la fermentación de glicerol puro con <i>S. cerevisiae</i> . ....	59
<b>Tabla 12.</b> Variación de pH en glicerol crudo tratado con <i>E. coli</i> . ....	65
<b>Tabla 13.</b> pH fermentación <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo tratado .....	67
<b>Tabla 14.</b> Parámetros cinéticos en microrreactores. ....	73
<b>Tabla 15.</b> Rapidez específica de crecimiento ( $\mu$ ) en microrreactores ( $h^{-1}$ ). ....	73

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fórmula condensada y representación espacial del glicerol. ....	6
<b>Figura 2.</b> Reacciones involucradas posteriores a la glucólisis en la fermentación alcohólica. .....	12
<b>Figura 3.</b> Ruta metabólica en <i>E. coli</i> , adaptada de [48, 52, 54, 56].....	15
<b>Figura 4.</b> Ruta metabólica <i>S. cerevisiae</i> , adaptada de [57, 67, 69].....	22
<b>Figura 5.</b> Fases del crecimiento celular, adaptación de [71]. ....	24
<b>Figura 6.</b> Relación entre la concentración de sustrato con la rapidez específica de crecimiento .....	28
<b>Figura 7.</b> Producción de biodiesel en México [73]. ....	30
<b>Figura 8.</b> Separación de ácidos grasos sin transesterificar en glicerol crudo .....	36
<b>Figura 9.</b> Fermentación en microrreactores.....	40
<b>Figura 10.</b> Biorreactor de 7 L .....	40
<b>Figura 11.</b> Comparación entre muestras de glicerol crudo (derecha) y puro (izquierda)....	43
<b>Figura 12.</b> Análisis IR de glicerol crudo y puro .....	44
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB.....	46
<b>Figura 14.</b> Evidencia de la ausencia de inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio enriquecido con glicerol crudo y grado reactivo .....	47
<b>Figura 15.</b> Morfología <i>S. cerevisiae</i> en glucosa (izquierda) y glicerol (derecha) .....	48
<b>Figura 16.</b> Emulsificación del glicerol crudo al acidificar. ....	49
<b>Figura 17.</b> Glicerol crudo con Tween 20 después de la esterilización .....	50
<b>Figura 18.</b> Medición de DO del crecimiento de <i>E. coli</i> en glicerol crudo adicionado con Tween 20 .....	51
<b>Figura 19.</b> Crecimiento celular de <i>E. coli</i> en glicerol crudo con Tween 20 .....	51
<b>Figura 20.</b> Crecimiento <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo.....	52
<b>Figura 21.</b> Cultivo <i>S. cerevisiae</i> después del proceso de esterilización. ....	52
<b>Figura 22.</b> Separación de ácidos grasos del glicerol.....	53

<b>Figura 23.</b> Crecimiento óptico y celular de <i>E. coli</i> , obtención de la curva de crecimiento glicerol puro.....	54
<b>Figura 24.</b> Correlación de biomasa y absorbancia.....	54
<b>Figura 25.</b> Crecimiento óptico y celular de <i>S. cerevisiae</i> en glicerol puro.....	55
<b>Figura 26.</b> Curva de crecimiento para <i>S. cerevisiae</i> en glicerol puro.....	55
<b>Figura 27.</b> Producción de biomasa <i>E. coli</i> en microrreactores .....	57
<b>Figura 28.</b> Producción de etanol. <i>E. coli</i> en microrreactores.....	58
<b>Figura 29.</b> Consumo de glicerol <i>E. coli</i> en microrreactores en glicerol puro .....	59
<b>Figura 30.</b> Producción de biomas en <i>S. cerevisiae</i> microrreactores glicerol puro .....	60
<b>Figura 31.</b> Producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> .....	61
<b>Figura 32.</b> Consumo de glicerol en glicerol puro por <i>S. cerevisiae</i> .....	62
<b>Figura 33.</b> Obtención de datos, curva de crecimiento <i>E. coli</i> en glicerol crudo tratado. a) absorbancia y b) peso seco de biomasa .....	63
<b>Figura 34.</b> Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> en glicerol crudo tratado.....	63
<b>Figura 35</b> Crecimiento óptico a) y celular b) para <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo tratado. 64	
<b>Figura 36.</b> Curva de crecimiento <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo tratado.....	64
<b>Figura 37.</b> Producción de biomasa por <i>E. coli</i> en glicerol crudo tratado .....	66
<b>Figura 38.</b> Consumo de glicerol crudo tratado por <i>E. coli</i> .....	66
<b>Figura 39.</b> Producción de biomasa por <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo.....	67
<b>Figura 40.</b> Consumo de glicerol crudo por <i>S. cerevisiae</i> .....	68
<b>Figura 41.</b> Análisis cromatográfico, fermentado con <i>S. cerevisiae</i> en glicerol crudo tratado .....	69
<b>Figura 42.</b> Efectos sobre la generación de biomasa .....	70
<b>Figura 43.</b> Análisis consumo de glicerol .....	71
<b>Figura 44.</b> Análisis producción de etanol .....	72
<b>Figura 45.</b> Efecto de la concentración del sustrato sobre la tasa específica de crecimiento. □ <i>E. coli</i> GP, ◇ <i>S. cerevisiae</i> GP, ○ <i>E. coli</i> GC, ▲ <i>S. cerevisiae</i> GC .....	75
<b>Figura 46.</b> Parámetros de control de fermentación de glicerol crudo con <i>S. cerevisiae</i> .....	76
<b>Figura 47.</b> Producción de etanol en glicerol crudo con <i>S. cerevisiae</i> .....	77
<b>Figura 48.</b> Control de pH y temperatura en la fermentación de glicerol crudo por <i>S. cerevisiae</i> . .....	78

**Figura 49.** Producción de etanol F2 en glicerol crudo por *S. cerevisiae*, glicerol (□),  
 Biomasa (▲), Etanol (◇) ..... 79

**Figura 50.** Producción de etanol F3 en glicerol crudo por *S. cerevisiae*, glicerol (□),  
 Biomasa (▲), Etanol (◇). ..... 80



## RESUMEN

La generación de glicerol crudo por parte de la industria del biodiesel deja a este residuo como materia prima de gran interés para la obtención de productos de valor agregado por medio de procesos biológicos, tal es el caso del etanol. Se obtuvieron los parámetros cinéticos en la fermentación de glicerol crudo y puro en tres concentraciones 10, 20 y 30 gL<sup>-1</sup>, con cepas de tipo salvaje de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las condiciones de crecimiento se determinaron bajo condiciones reportadas en literatura. De acuerdo con el análisis estadístico, el glicerol crudo no tuvo efectos significativos en la fermentación con *E. coli*. Por otro lado, *S. cerevisiae* presentó efectos negativos en el consumo de glicerol crudo pero positivo en la producción de biomasa, finalmente en la producción de etanol con glicerol puro no hubo diferencias significativas entre *S. cerevisiae* y *E. coli*. Los parámetros cinéticos en los microrreactores también fueron mayores para *S. cerevisiae* con glicerol puro. Las tasa máxima de crecimiento en ambos organismos son bajas, en *S. cerevisiae* fue de 0.014 h<sup>-1</sup> y en *E. coli* de 0.011 h<sup>-1</sup>. Con los resultados obtenidos estadísticamente y con los parámetros cinéticos, *S. cerevisiae* se escaló al reactor de 7 L, con glicerol crudo, en este último experimento se alcanzó una concentración de 0.78 ± 0.07 gL<sup>-1</sup> de etanol, a pesar del bajo consumo de glicerol con 0.04 g. El glicerol crudo es una sustancia compleja, no obstante, ambos microorganismos fueron capaces de crecer.

## ABSTRACT

Raw glycerol from industrial biodiesel it is a waste that requires final proper disposal to avoid environmental damage due impurities in it. Therefore, obtaining value-added products through biological process would help to reduce negative effects. Kinetic parameters in raw and pure glycerol fermentation were obtained at concentrations of 10, 20 and 30 g·L<sup>-1</sup>, using *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* wild strains. Growing conditions were setting according to literature. For glycerol and ethanol quantification HPLC was used. A growth curve of dry weight and optic density correlation was used to obtain biomass. Only carbon (raw and pure glycerol) and nitrogen sources were included in the fermentative broth. Temperature of 30 °C and pH of 5.5 for *S. cerevisiae* was used, for *E. coli* it used temperature of 34 °C and pH of 7.5. According to the statistical analysis, using *E. Coli* in the fermentation of raw glycerol did not have significative effects. On the other hand, using *S. cerevisiae* on raw glycerol did have a negative effect in the glycerol consumption, but a positive biomass production. Finally, there were no significative differences between the use of *S. cerevisiae* or *E. coli* in ethanol production by using pure glycerol. *S. Cerevisiae* product yields were 0.5, 0.44 and 0.21 g·g<sup>-1</sup>, 0.70, 0.45 and 0.21 g·g<sup>-1</sup> for *E. Coli* for 10, 20 and 30 g·L<sup>-1</sup> in pure glycerol for both microorganisms, respectively. Both microorganisms growth rates maxim are low, 0.014 h<sup>-1</sup> y 0.011 h<sup>-1</sup> in *S. cerevisiae* and *E. coli*, respectively. With the statistical results obtained and the kinetic parameters, *S. cerevisiae* was scaled to a 7 L reactor. In this experiment, a production of 0.78 g·L<sup>-1</sup> of ethanol and a low net consumption of glycerol of 0.04 g were obtained. Raw glycerol is a complex substance; however, the microorganisms were able to grow.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol representan una alternativa renovable y ambientalmente segura en comparación con los combustibles fósiles, sin embargo, su viabilidad económica representa una preocupación, por ello las biorrefinerías se han propuesto como solución a este problema [1].

Con el aumento en la capacidad de producción de biodiesel se ha creado un excedente de glicerol crudo en el mercado, contribuyendo a que los precios se abaraten [2] convirtiéndose en un sustrato potencial para los procesos de fermentación en la producción de hidrógeno y etanol [3], reduciendo los problemas atribuidos a su eliminación [1].

El glicerol crudo proveniente de la industria del Biodiesel presenta una gran cantidad de impurezas, las cuales impiden su uso directamente sin algún pretratamiento, pero la purificación del glicerol a una calidad de grado alimentaria es muy costosa.

Con el desarrollo de nuevas aplicaciones del glicerol crudo, para la producción de compuestos de valor agregado pueda conllevar a un incremento de la economía de las plantas de biodiesel.

Varios microorganismos se han estudiado para la producción de compuestos a partir del glicerol, *Escherichia coli* es una bacteria que se ha empleado para la producción de etanol e hidrógeno, en la mayoría de los estudios los rendimientos son mayores al usar glicerol crudo en comparación al puro [4, 5], ha presentado tolerancia a sales [5]. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura ampliamente utilizada en la industria de bebidas alcohólicas, su crecimiento en glicerol como única fuente de carbono es bajo, por ello, las investigaciones son entorno a la generación de cepas modificadas para aumentar los rendimientos.

En este estudio se evaluó la producción de etanol como principal metabolito de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glicerol crudo proveniente de la transesterificación de grasas residuales. *S. cerevisiae* tuvo mejores rendimientos en la producción de etanol  $0.5 \text{ gg}^{-1}$  en glicerol puro en microrreactores, por ello se escaló a un reactor de 7 L.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Producción de etanol**

La producción de bioetanol ha conllevado a distintas controversias en temas relacionados a la eficiencia energética, el impacto ambiental, así como su rentabilidad [6]. El etanol, como bioenergético, se puede producir a partir de diversas fuentes, las cuales han marcado tres generaciones. La primera generación involucra cultivos alimenticios, como el maíz o la caña de azúcar, poniendo el tema de la seguridad alimentaria en discusión [6].

La segunda generación surgió con el aprovechamiento de biomasa lignocelulósica. Este tipo de material está compuesto principalmente de celulosa y hemicelulosa empaquetadas por capas de lignina, resultando en una estructura cristalina, difícil de pretratar [7, 8]. La etapa de pretratamiento presenta un desafío para el escalonamiento comercial [9], ya que es uno de los procesos más importante y costosos en la producción de etanol derivado de material lignocelulósico [7, 8]. La finalidad del pretratamiento es hacer accesible la celulosa para la conversión de carbohidratos en azúcares fermentables, disminuyendo la cristalinidad de la celulosa, eliminando la hemicelulosa y rompiendo la estructura de la lignina [7].

Las algas son una potencial fuente de carbono para la obtención de etanol de tercera generación. El empleo de algas evita algunos inconvenientes de otras materias primas vegetales como: el uso de fertilizantes, riego y daño al suelo; además tiene un potencial de calentamiento global, a largo plazo, más bajo [10]. Por otra parte, el uso de glicerol como fuente de carbono para la producción de etanol también está considerado dentro de la tercera generación. Estas investigaciones se encuentran en sus primeras etapas [11].

Brasil y EE. UU. son los dos principales países productores de etanol; para el 2017 contribuyeron con un 27% y 58% respectivamente, lo que presenta el 85% de la oferta mundial. Brasil dio inicio con el Programa Pro-Alcohol en los años 70's [12]. En el caso de EE. UU., en 2005 el Congreso de Estados Unidos aprobó la Ley de Política Energética y en 2007 la Ley de Seguridad e Independencia Energética [13], que incluían la producción de bioetanol. Además de Brasil y Estados Unidos hay otros países productores de etanol, los cuales se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Producción mundial de etanol (miles de L) [13].

<b>País</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>
Estados Unidos	40,543.66	46,024.27	49,113.61	51,321.62	54,057.70	57,199.60
Brasil	25,804.17	28,960.15	31,391.68	34,298.50	37,395.71	40,625.33
UE-27	5,761.52	6,465.07	7,538.66	9,154.72	10,795.30	11,773.80
China	4,109.00	4,368.09	4,648.94	4,823.56	4,961.93	5,121.19
India	1,680.31	1,703.58	2,429.56	2,481.79	2,532.37	2,574.75
Canadá	1,130.82	1,572.55	1,703.18	1,713.60	1,729.65	1,721.32
Argentina	416.26	440.61	454.73	468.93	483.22	497.60
Indonesia	240.30	424.57	440.57	461.78	485.20	509.64
Australia	238.00	383.72	386.46	389.23	392.01	394.82
Japón	100.20	100.20	130.00	130.00	130.00	130.00
Malasia	66.25	66.48	66.84	67.03	67.48	67.98
México	65.69	70.38	75.08	76.95	78.83	80.71
Turquía	64.34	64.99	65.18	65.49	65.76	65.86
Republica de Sudáfrica	15.42	15.74	15.91	16.07	16.18	16.26

## 2.2. Producción de etanol en México

México ocupa el lugar número 14 en cuanto a emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) debido a que su sistema energético se basa principalmente en el uso de combustibles fósiles [14]. El sector que más consume energía y por lo tanto tiene un mayor impacto en las emisiones de GEI es el de transporte [15], conllevando a que México presente interés en alternativas como los biocombustibles [16]. Por esta razón se han aprobado leyes como la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, que favorece el uso de biodiesel y bioetanol en la venta de diésel y gasolina en México por PEMEX [16], en esta ley se estableció una comisión encargada de aplicar la política, con miembros de los ministerios de medio ambiente (SEMARNAT), energía (SENER), agricultura (SAGARPA) y finanzas. Sin embargo, esta comisión ha sido incapaz de poner en práctica una política desde hace varios años, por lo que su impacto en el sector agrícola y en la economía no han presentado algún efecto [17]. Otra ley que promueve la reducción de GEI es La ley de Cambio Climático de México de 2012, en la cual se establecieron metas para reducir las emisiones de GEI en un 30% a 2020 y un 50 % a 2050, teniendo como referencia el año 2000 [14].

Por otra parte, la producción de etanol de caña de azúcar se ha realizado desde hace varios años en México, siendo dirigido al mercado de bebidas embriagantes, principalmente, y al uso industrial. Los principales productores de etanol son los ingenios azucareros, que se encuentran trabajando a un 44% de su capacidad instalada, debido a la demanda limitada [18]. Se han investigado materias primas alternativas para la producción de etanol en México, donde destacan el bagazo de caña de azúcar, agave azul [16] y los residuos de la industria del tequila [19, 20]. De acuerdo con el informe de REN21, 2017, la producción de etanol en México aumentó de casi cero en años anteriores a 20 millones de litros, aplicando mezclas de etanol al 5.8% (E5.8) [21].

La discusión en México en cuanto a la promoción de biocombustibles, como el etanol a base de cultivos energéticos, gira en torno a los precios de los mercados agrícolas, la contaminación puntual del agua y la seguridad hídrica, sin tener garantías de mejoras significativas de la seguridad energética, [17]. Por ello, los incentivos económicos adecuados desempeñan un papel importante en el desarrollo de la energía renovable [22].

### **2.3. Etanol como combustible**

El bioetanol se considera una buena alternativa a los combustibles fósiles para reducir la crisis energética y contribuir a reducir la contaminación ambiental [23]. Además, el ser un potenciador del octano en la gasolina sin plomo, remplazando al metil-tert-butil éter (MTBE) y ser empleado como compuesto oxigenado para la combustión limpia de gasolina, son solo algunos factores que contribuyen al interés de usar al etanol como combustible [11]. Otra ventaja del etanol es presentar una baja toxicidad; de manera que, en caso de presentarse fugas o derramamientos, afecta menos al medio ambiente; contrariamente al efecto ocasionado por los derrames de petróleo crudo [24].

Sin embargo, también presenta desventajas. Por ejemplo, cuando se emplean mezclas de baja relación etanol-gasolina aumenta la formación de smog. En el caso de mezclas de alta concentración de etanol, se pueden presentar dificultades en los autos en condiciones de clima frío [11], debido a que, por la baja presión de vapor del etanol, la ignición es deficiente. Aunado a lo anterior, en mezclas de 95% etanol-gasolina se da la formación de aldehídos, que provocan una combustión incompleta [25].

Los vehículos especiales de combustible flexible (FFV por sus siglas en inglés) están equipados con sensores de línea, que miden los niveles de etanol y adaptan la relación aire-combustible para mantener buenas condiciones de combustión [11]. En países como EE. UU. y Brasil se manejan distintas mezclas, las cuales en algunos casos no necesitan cambios en el motor, ver Tabla 2.

**Tabla 2.** Mezclas etanol – gasolina [11].

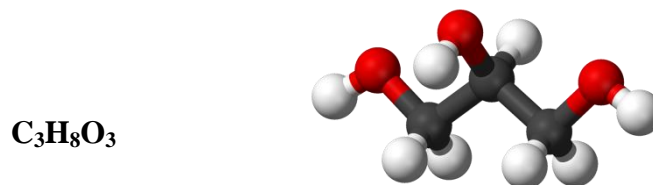
Código	Mezcla	Países	Nota
E5	Max. 5% etanol anhidro	Europa Occidental, India	
E10	Max. 10% etanol anhidro	EE. UU, Europa, China, India, África del Sur	Mezcla en autos regulares
E15	Max. 15% etanol anhidro	EE. UU automóviles >2000, África del Sur	
E25	Max. 25% etanol anhidro	Brasil	
E85	Max. 85% etanol anhidro	EE. UU, Europa	Vehículos especiales de combustión flexible (FFV)
E100	Etanol hidratado (5.3 %p agua)	Brasil	

Con respecto a las emisiones al medio ambiente, éstas son menores que las emitidas con el uso de gasolina. Por ejemplo, se ha observado una reducción del 17% las emisiones de gases de efecto invernadero al usar una mezcla E85 y de un 64% cuando se usa etanol derivado de material celulósico [11]. En otra investigación, realizada por Zhang & Sarathy 2016 [26], se reporta que al usar una mezcla de 32% etanol obtenido a partir de caña de azúcar, las emisiones de CO<sub>2</sub> se redujeron un 7.1% respecto a las emisiones generadas usando sólo gasolina. Por otra parte, el etanol en un motor de combustión interna puede aumentar las emisiones de productos de combustión incompleta, conllevando a una mayor generación de ozono a nivel del suelo [11], siendo el formaldehído y acetaldehído los principales compuestos generados que aumentan al incrementar la concentración de etanol en la mezcla etanol-gasolina [26].

## 2.4. Generalidades del glicerol

### 2.4.1. Características fisicoquímicas del glicerol

El glicerol, también conocido como glicerina o propano-1,2,3-triol (Figura 1), es un producto químico con una variedad de usos en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. El glicerol es un alcohol de baja toxicidad que consiste en una cadena de tres carbonos unidos a grupos hidroxilo, dos primarios y uno secundario [27]. Algunas de sus características físicas es ser incoloro, inodoro e higroscópico. Presenta una densidad de 1.261 g·cm<sup>-3</sup> y viscosidad de 1.5 Pa·s. Los grupos hidroxilos lo hacen ser miscible en agua y en alcoholes, siendo insoluble en hidrocarburos [28].



**Figura 1.** Fórmula condensada y representación espacial del glicerol.



### **2.4.2. Fuentes de producción de glicerol**

El glicerol es un subproducto de distintas industrias. En el caso de la producción de biodiesel se forma después del proceso de transesterificación; en plantas oleo-químicas se genera durante las reacciones de saponificación e hidrólisis en la obtención de jabón [28, 29] y también es producido por levaduras durante la osmorregulación para disminuir la actividad del agua extracelular [27, 30].

En un proceso de transesterificación de triglicéridos se produce en promedio 1 kg de glicerol crudo por cada 10 kg de biodiesel producido [31]. Cuando el glicerol proviene del biodiesel a partir de residuos, como los derivados del aceite de cocina, el glicerol no tiene aplicación alguna y solo es incinerado [32]; a consecuencia de este problema su demanda es baja y su eliminación puede ser costosa y perjudicial para el medio ambiente [33].

Para 2016, mundialmente se generaron más de 30.8 millones de m<sup>3</sup> de glicerol, siendo EE. UU. y Brasil los mayores productores seguidos de Alemania, Indonesia y Argentina con 3 millones cada uno [33]. En EE. UU. la producción de biodiesel comenzó a incrementarse cuando se implementó la Ley de Política Energética de 2005, donde se proporcionan incentivos fiscales, teniendo la mayor generación de glicerol crudo. Por ello, ese país ha promovido la investigación relacionada con la obtención de productos a partir de glicerol crudo, como una prioridad [34].

### **2.4.3. Impurezas en el glicerol crudo**

La composición del glicerol crudo varía de una a otra planta de producción de biodiesel y está determinado principalmente por la composición y calidad de la materia prima [35], también por la eficiencia en la transesterificación, así como en el proceso de recuperación del biodiesel [36]. Las principales impurezas son: agua, metanol, jabones, sales y ésteres formados durante la reacción [28], ver Tabla 3. El glicerol obtenido por transesterificación de aceite vegetal residual contiene más jabones e impurezas que uno obtenido a partir de aceite virgen [28].

**Tabla 3.** Composición de glicerol crudo obtenido en distintos procesos.

Componente	Transesterificación %	Saponificación %	Hidrólisis %
Glicerol	75	83-84	88-90
Cenizas	10	8.5-9.5	0.7-1.0
Agua	10	6-7	8-9
MONG	5	3-4	0.7-1.0
Trietilenglicol	1	0.1	0.2

MONG (materia orgánica no glicerol)

La presencia de metanol en el glicerol crudo representa problemas ambientales. Además, actúa como un compuesto inhibitorio para el crecimiento de microorganismos y causa subproductos no deseados durante procesos de fermentación para la revaloración de este subproducto [27, 37]. Por otro lado, concentraciones por arriba de  $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol crudo inhiben el crecimiento celular, debido a la presencia de impurezas y a una alta salinidad (Na o K) [2]. La inhibición puede reducirse con un ajuste de pH para la separación de ácidos grasos y sales [3], mientras que el metanol se puede evaporar del medio durante la esterilización en autoclave [38].

#### 2.4.4. Procesos de purificación

El glicerol crudo derivado de la reacción de transesterificación del proceso de producción de biodiesel se puede usar después de someterlo a una purificación. La purificación comienza con la neutralización por un ácido, y luego se elimina el agua y el alcohol, para obtener un producto con una concentración de glicerol de 80-88%. De esta manera, el glicerol crudo puede ser comercializado [29]. En operaciones más complejas, la glicerina se somete a destilación hasta alcanzar una pureza del 99% o más, y se vende a los mercados cosméticos y farmacéuticos [29]. En la Tabla 4 se resumen los diferentes grados de glicerol de acuerdo con su pureza y los usos comunes que tienen [2].

**Tabla 4.** Grados de purificación glicerol.

Tipo de glicerol	Contenido de glicerol (%)	Fuentes/aplicaciones
Glicerol crudo	70-90	Subproducto de la producción de biodiesel
Grado técnico	99.5 (no certificado, principalmente >96.0 %)	Adecuado para aplicaciones industriales
Farmacopea de los Estados Unidos (USP)	99.5 USP (basado es sebo) 99.5 USP (basado en vegetales)	Utilizado en cosmética, farmacéutica y alimentos
El código de Sustancias Químicas para Alimentos (FCC)	99.7 USP/FCC- Kosher	

Generalmente los procesos de purificación inician con la neutralización de la corriente de residuos de glicerol con ácido, para separar los jabones, las sales y los ácidos grasos libres. El agua y la mayoría del metanol se recuperan por evaporación y destilación, para reciclarse en el proceso de producción. En esta etapa, el glicerol en bruto contiene ácidos grasos libres y algo de metanol (trazas del 2%) y tiene un color marrón amarillo a marrón oscuro, con una pureza que varía del 80 al 88% [39].

Debido a que la purificación del glicerol crudo es económicamente desfavorable por la caída de su precio [35, 40], algunos métodos de purificación que involucren la recuperación de metanol sugieren un beneficio sólo a plantas a gran escala, debido a la limitación ocasionada por costos y altos requerimientos de energía [2].

Por otra parte, la disposición o eliminación del glicerol, crudo también es una acción costosa y perjudicial para el medio ambiente [33]. Al ser un residuo alcalino, su liberación al medio ambiente dañaría la comunidad biótica, ya que la presencia de metanol, sales y metales pesados tienen un efecto perjudicial en la salud de los seres humanos y animales [40].

Un proceso de purificación de glicerina podría beneficiar a una planta de biodiesel a través de la recuperación de glicerina y una disminución en el costo del tratamiento de aguas residuales [29]. La tendencia actual, a la baja en el precio de mercado de la glicerina podría compensarse mediante el fomento del desarrollo de nuevas aplicaciones de glicerina con el fin de expandir el mercado existente y estabilizar el precio del mercado [29].

De acuerdo con la teoría económica estándar, el proceso capaz de agregar el mayor valor a la materia prima, al menor costo, dominará al mercado. Por lo tanto, usar la glicerina para la producción de un combustible parece ser una alternativa muy prometedora [30].

#### **2.4.5. Aplicaciones del glicerol**

El glicerol tiene amplias aplicaciones en áreas de cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos; sin embargo, éste debe ser de alta calidad y pureza. Así, encontrar aplicaciones al glicerol crudo podría cambiar rápidamente la situación del mercado actual de este subproducto [30].

Dentro de las aplicaciones energéticas en las que se puede aprovechar al glicerol crudo se encuentra la producción de biogás por métodos biológicos, el cual al ser empleado como co-sustrato proporciona un mayor rendimiento del biogás producido [35]. Algunos microorganismos oleaginosos han presentado una mayor eficiencia en la conversión de glicerol crudo a biodiesel, comparado con la generación de hidrógeno o etanol [35].

En la producción microbiológica de etanol empleando materia lignocelulósica, el papel del glicerol mejoraría el proceso del pretratamiento al emplearse como solvente orgánico (*método organosolv*). En el estudio realizado por Trinh et al. 2016 [7] se obtuvo un rendimiento de  $0.44 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{azúcar}}$ , correspondiente a un rendimiento teórico de 84.3%, al pretratar la paja de arroz con glicerol grado industrial (pureza del 70%) acidificado con HCl. En otro estudio, Romaní et al. 2016 [41] aplicaron el *método organosolv* en madera (*Eucalyptus globulus*), obteniendo una concentración de etanol de  $94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , con una conversión del 77% de celulosa a etanol, empleando una cepa industrial y termotolerante de *S. cerevisiae*.

Por otra parte, considerando el factor económico, el esquema de producción de etanol es más complejo para el maíz que para el glicerol y también se requiere de una mayor inversión de capital, los costos operacionales son casi de un 40% inferiores para la producción de etanol a partir de glicerol, incluso cuando no se da crédito al formiato o al hidrógeno coproducidos [27].

Durante la fermentación de glicerol también se generan cantidades importantes de hidrógeno. Pachapur et al. 2016 [3] emplearon al glicerol crudo sin ningún pretratamiento para la producción de hidrógeno usando un co-cultivo de *Enterobacter aerogenes* y *Clostridium butyricum*. En este estudio la producción de hidrógeno mejoró al adicionar Tween 80 para disminuir la viscosidad de glicerol crudo y aumentar su biodisponibilidad. La adición de Tween incrementó la producción de hidrógeno hasta 1.25 veces en comparación con su ausencia ( $25.56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Trabajando con una concentración de  $17.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol crudo y  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Tween 80 se alcanzó una producción máxima de  $32.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de hidrógeno.

Otra ventaja del uso de glicerol como sustrato en procesos biológicos, es el hecho de que se pueden reducir los problemas de heterogeneidad en biorreactores grandes, manteniendo el rendimiento de producción de biomasa, incluso si la levadura encuentra un gradiente de concentración de sustrato o zonas con oxígeno limitado [42].

También se ha evaluado la producción microbiológica de otros productos químicos como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) usando el hongo *Pythium irregulare*. Cuando *P. irregulare* se cultivó en medios de cultivo con  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol crudo adicionado con  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura, el rendimiento de EPA y la productividad alcanzaron  $90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $14.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}$ , respectivamente [38].

La producción de biomasa por microalgas, así como componentes bioquímicos empleando glicerol crudo fue estudiado por Kong et al. 2013 [43]. El microorganismo empleado fue *Chlorella vulgaris*, la cual pudo utilizar glicerol como única fuente de carbono, pero el efecto fue inferior al de la mezcla de glicerol y glucosa.

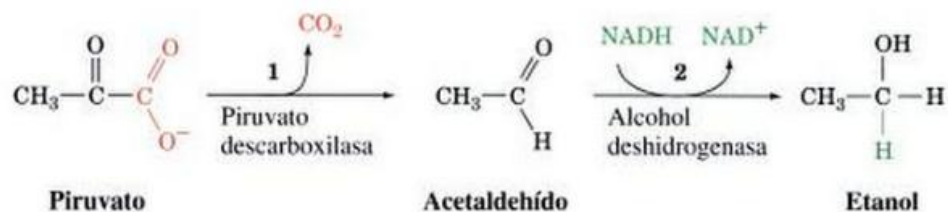
En procesos de gasificación el glicerol crudo se ha utilizado como un aditivo a la biomasa para mejorar los rendimientos de gas y fracción de hidrógeno. En procesos de pirólisis ocurre un fenómeno parecido y en el proceso de licuefacción se aumenta el rendimiento del bio-aceite debido a los efectos sinérgicamente positivos del metanol, glicerol, agua y algunos ácidos grasos [33].

## 2.5. Fermentación

Una fermentación, en términos biotecnológicos describe cualquier transformación química de compuestos orgánicos llevada a cabo mediante el uso de microorganismos y sus enzimas. La esencia de un proceso biotecnológico en la industria de la fermentación es combinar el organismo adecuado, sustrato económico y el ambiente apropiado para producir altos rendimientos de un proceso deseado [44].

La fermentación alcohólica es un proceso descubierto hace miles de años. La ruta de glucólisis está involucrada en este proceso donde la glucosa es convertida a piruvato y posteriormente a etanol, teniendo dos reacciones consecutivas [45] (Figura 2):

1. Descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y  $\text{CO}_2$  catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa.
2. La reducción del acetaldehído a etanol por  $\text{NADH}$  catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa que en consecuencia regenera  $\text{NAD}^+$  para ser utilizada en el proceso de la glucólisis.



**Figura 2.** Reacciones involucradas posteriores a la glucólisis en la fermentación alcohólica.

Factores como: el control en la concentración de oxígeno, pH, temperatura, agitación y concentración del sustrato, son condiciones que se varían para maximizar la eficiencia del proceso. Así mismo, la selección de cepas adecuadas es importante y depende de su capacidad para producir el producto deseado [44].

Durante la fermentación, el etanol puede ocasionar problemas cuando llega a concentraciones altas, impidiendo el crecimiento celular. El etanol inhibe el sistema de 3 maneras, es decir, inhibición del crecimiento celular, inhibición de la fermentación y muerte celular [11]; además de tener un efecto sobre la membrana plasmática ya que dificulta el transporte de nutrientes dentro y fuera del microorganismo y las enzimas en la primera etapa de fermentación de la glucólisis [11].

El glicerol es una molécula de alto poder reductor que puede usarse como fuente de energía en microorganismos [27, 46], presenta un grado de reducción por carbono ( $k$ ) de 4.67 veces mayor al que tienen los azúcares ( $k=4$ ) [5, 47]. El consumo de un mol de glicerol genera dos moles adicionales de NADH, mientras que el consumo de medio mol de glucosa (igualmente en una base de 3 carbonos) sólo genera un mol adicional de NADH [48, 49]; por lo tanto, se tienen rendimientos mayores en los compuestos generados [5]. Por ello es importante la investigación de este sustrato en procesos biotecnológicos.

## **2.6. Microorganismos productores de etanol**

### **2.6.1. Bacteria *Escherichia coli***

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) tiene una vía de asimilación casi completa para la utilización de hexosas y pentosas; se utiliza como microorganismo huésped para mejorar la producción de etanol. Cuando esta bacteria se modifica genéticamente, presenta desventajas como baja resistencia al etanol y la incapacidad de sobrevivir más allá de un estrecho rango de pH neutro, de 6.0-8.0 [50].

La importancia de estudiar a la bacteria *E. coli* se debe principalmente a que se puede usar en las aplicaciones industriales y a su alta tolerancia al etanol (hasta un 3%). Las mutaciones de *E. coli* pueden producir más etanol en presencia de triptona [51].

*Escherichia coli* puede fermentar glicerol cuando se mantienen las condiciones apropiadas: pH ácido-neutro, evitar la acumulación de H<sub>2</sub> y una composición apropiada del medio [1]. Los rendimientos de cepas salvajes pueden ser mejorados reconectando los flujos de carbono a los productos deseados [52].

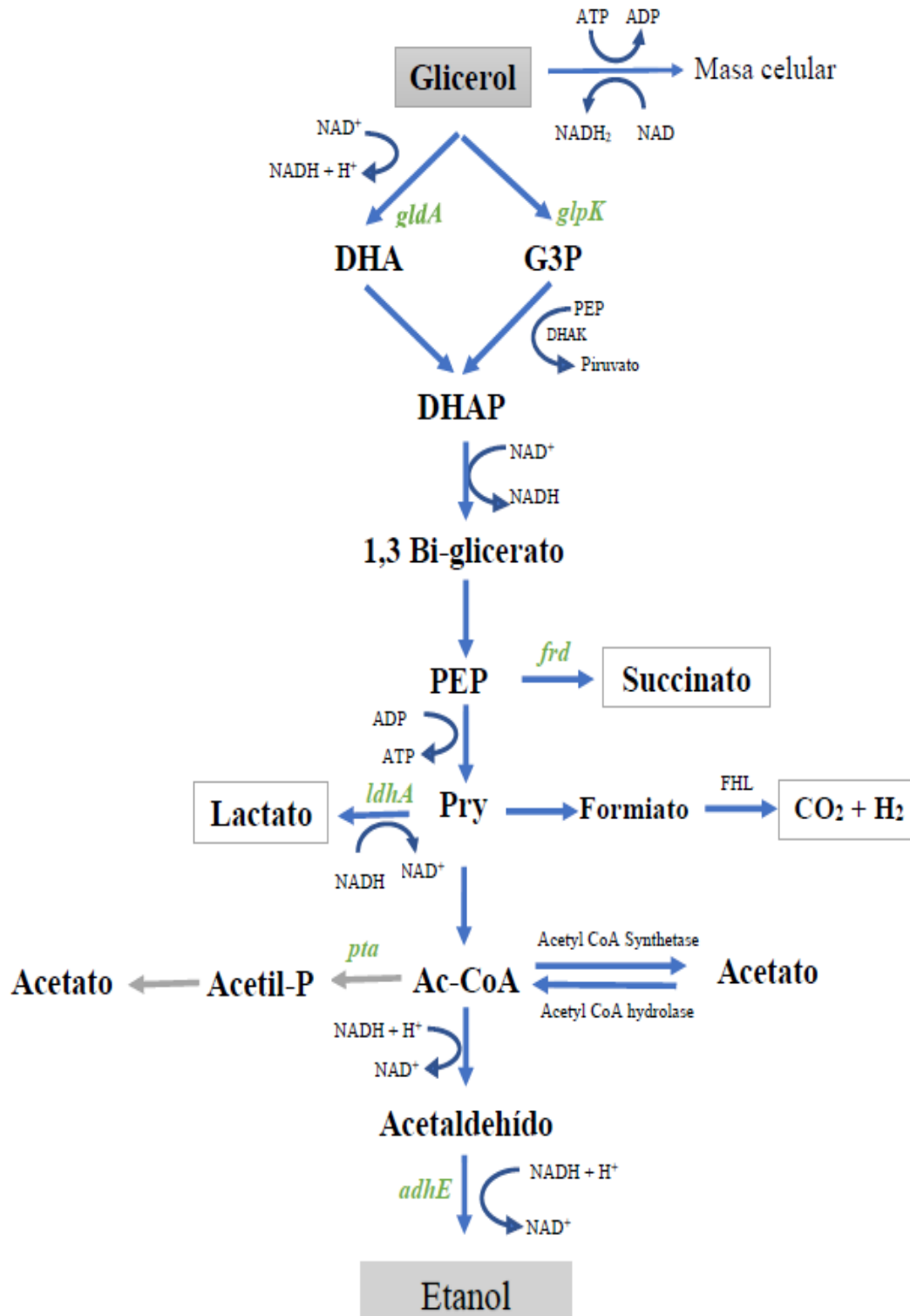
*E. coli* puede producir etanol a concentraciones superiores de 10 g·L<sup>-1</sup> de glicerol con rendimientos altos, también ha presentado tolerancia a concentraciones altas de sales [5], así como tolerancia a metales pesados en bajas concentraciones (<0.1 mM) [49]. Además la fermentación puede darse en condiciones anaerobias y microaeróbicas [31]. Las condiciones microaeróbicas se han justificado en términos de la incorporación de un aceptor de electrones (O<sub>2</sub>) para evitar la necesidad de añadir triptona o extracto de levadura [4, 32].

Durante la fermentación con *E. coli*, además del etanol se produce H<sub>2</sub>, acetato [49], succinato y pequeñas cantidades de formiato [47]. Cabe remarcar que con la generación de hidrógeno en condiciones microaeróbicas ácidas se deben de prever condiciones de seguridad [31].

#### **2.6.1.1. Ruta metabólica de *Escherichia coli***

El proceso de degradación del glicerol comienza con la incorporación de GlpF (proteína transportadora) en el citoplasma [30, 48]. El glicerol se canaliza a la glucólisis a través de dos rutas metabólicas; en una de ellas el glicerol se deshidrogena por una enzima dependiente de NAD glicerol deshidrogenasa (GLDA o DHAD) a dihidroxiacetona (DHA), que luego se fosforila por la enzima fosfoenolpiruvato (PEP) o por las enzimas quinasa dihidroxiacetona dependientes de ATP (Dhak, *dhaKLM*) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En la otra ruta, el glicerol es fosforilado por primera vez por la enzima dependiente de ATP glicerol quinasa (GLPK) a glicerol 3-fosfato, y este último se reduce aún más por la enzima dependiente de NAD deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato (glpD) a DHAP [27, 55], ver Figura 3.





**Figura 3.** Ruta metabólica en *E. coli*, adaptada de [48, 52, 54, 56]

DHAP se oxida aún más a través de la glucólisis para formar bloques de construcción como fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (PYR) y acetil-CoA. La molécula de alta energía PEP puede convertirse a oxalacetato por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y luego reducirse paso a paso a succinato en presencia de ciertas enzimas involucradas en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) [48].

El PYR puede reducirse a lactato por lactato deshidrogenasa (LDH). El acetil-CoA se puede convertir en acetato, tanto por fosfato acetiltransferasa (PTA) como por acetato quinasa (ACK), o se puede reducir a etanol por acetaldehído/alcohol deshidrogenasa (ALDH/ADH) [34, 48]. Dando un balance de dos NADH/NAD<sup>+</sup> durante la asimilación del glicerol [52]. Teniendo como principales productos al etanol e H<sub>2</sub>, pero también acetato, succinato y formiato [46, 52]. De estos compuestos, el succinato se puede considerar como el producto de competencia, ya que se genera al final de la rama reductora del ciclo TCA [52]. Durante la fermentación, la producción de etanol es preferible porque se genera una molécula de ATP de cada molécula de glicerol en etanol [46]. En condiciones aeróbicas el ácido acético es el principal producto que sale como ion acetato, el cual es un compuesto tóxico para el microorganismo [54].

Las vías reductoras actúan como un sumidero de electrones para la oxidación, consumiendo equivalentes reductores generados durante la oxidación gradual de glicerol para lograr el equilibrio redox. A diferencia de otros sustratos, el glicerol tiene un alto grado reductor, por lo tanto, un desafío particular para las especies de fermentación de glicerol es el consumo de exceso equivalente de reducción. Durante la vía reductiva, algunos de los electrones se pueden desviar para combinarse con protones y liberarse como gas de hidrógeno en condiciones anaeróbicas y baja presión parcial de hidrógeno. También se sugiere que ADH (alcohol deshidrogenasa) podría desempeñar un papel importante en la fermentación de glicerol para recuperar el equilibrio redox. El etanol se forma típicamente para cumplir los requisitos de energía de una célula bacteriana [48, 52].

### 2.6.1.2. Producción de etanol con *E. coli* en glicerol

En el estudio realizado por Adnan et al. 2014 [5] de las 6 variables estudiadas que podrían influir en el rendimiento de bioetanol, solo el pH, la concentración del sustrato, de sales y de nitrógeno orgánico tuvieron un efecto significativo. En dicho estudio las condiciones óptimas para la fermentación con *E. coli* SS1 fueron 34.5 g·L<sup>-1</sup> de glicerol un pH de 7.61 y una concentración de nitrógeno orgánico de 6.42 g·L<sup>-1</sup>, dando un rendimiento ( $Y_{p/s}$ ) aproximadamente de 1 mol·mol<sup>-1</sup>, siendo mayor que el rendimiento en glicerol puro (0.994 mol·mol<sup>-1</sup>).

Hasta el momento, el estudio realizado por Cofré et al. 2016 [4] es el que ha obtenido las concentraciones más altas de etanol trabajando tanto en cultivos batch como de régimen de alimentación exponencial. En este último caso, con una concentración de 37.7 g·L<sup>-1</sup> de glicerol crudo se obtuvo una generación de 7.58 g·L<sup>-1</sup> de etanol acompañada de la producción de hidrógeno con un rendimiento de 0.56 mol·mol<sup>-1</sup>. La productividad del hidrógeno fue mayor al trabajar con glicerol crudo (2.5 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) que en comparación con el glicerol puro (1.48 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>).

Además de etanol e hidrógeno, también se pueden generar otros productos, tal como lo investigaron Maru et al. 2016 [51], donde se detectó la obtención de distintos productos durante la fermentación oscura de glicerol puro y crudo. Se obtuvieron principalmente, etanol, lactato, 2,3 butanodiol, acetato, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y succinato. Además, en los cultivos con glicerol crudo se pudo observar la generación de propionato. La presencia de sales en este estudio tenía una concentración de 2.5 g·L<sup>-1</sup>, siendo una concentración mucho menor al empleado en los medios sintéticos.

Por su parte Suhaimi, et al, 2012 [46] evaluaron distintas cepas de *E. coli*, algunas de tipo salvaje y otras de laboratorio. Se determinó que la cepa salvaje identificada como *E. coli* SS1, produjo rendimientos bajos tanto para etanol como para hidrógeno (0.44 y 0.63 mol·mol<sup>-1</sup>, respectivamente). Dichos valores fueron muy similares a los determinados por la cepa de laboratorio *E. coli* BW25113: 0.37 y 0.67 mol·mol<sup>-1</sup> de etanol e hidrógeno, respectivamente. Mientras que otra cepa de laboratorio, la *E. coli* BL21, produjo rendimientos mayores: 0.99 mol·mol<sup>-1</sup> de etanol y 1.43 mol·mol<sup>-1</sup> de hidrógeno. Además, en todos los casos se detectó la presencia de otros metabolitos como el ácido succínico, ácido láctico y acético.

Chaudhary, et al. 2011 [53] estudiaron el efecto de la concentración del glicerol para la producción de etanol e hidrógeno. Se observó que el aumento de la concentración de glicerol aceleró la fermentación. Con una concentración de 10 g·L<sup>-1</sup> de glicerol se obtuvo el mayor rendimiento de etanol (0.40 g·g<sup>-1</sup>); mientras que la mayor producción de hidrógeno se presentó a una concentración de 25 g·L<sup>-1</sup> de glicerol.

En cepas de tipo salvaje suelen obtenerse bajos rendimientos. Por ello varias investigaciones se enfocan en incrementar los rendimientos por medio de la ingeniería genética. Como en Shah, et al. 2014 [54] donde se incorporaron las enzimas de aldehído reductasa (Aldr) y aldehído deshidrogenasa (AldH), con lo que se incrementó 2 veces la asimilación de glicerol crudo en condiciones aeróbicas. Aldr es una enzima oxidorreductasa dependiente de NADPH que reduce catalíticamente diversos aldehídos y carbonilos. Por su parte AldH cataliza la actividad oxidorreductasa dependiente de NADH, oxidando aldehídos a los correspondientes ácidos carboxílicos. Estas dos enzimas proporcionaron vías alternativas para la utilización de glicerol a través de la glucólisis y, además, establecieron la conversión del acetato, el producto final de la glucólisis, en etanol.

Otra investigación con cepas modificadas es de Thapa, et al. 2013 [34], donde las condiciones óptimas para la cepa modificada de *E. coli* BL21(DE3) fueron 34 °C y pH 7.6; produciendo 3.01 g·L<sup>-1</sup> de etanol, dos veces mayor que su homóloga del tipo salvaje (1.45 g·L<sup>-1</sup>) en condiciones aeróbicas. No hubo crecimiento en condiciones anaeróbicas. Las enzimas sobreexpresadas fueron glicerol deshidrogenasa, dihidroxiacetona quinasa y piruvato quinasa (pKAA).

En el estudio de Wong et al. 2014 [31] con ayuda de la ingeniería metabólica para redireccionar el flujo de carbono, se suprimieron genes para evitar la producción de otros metabolitos distintos al etanol, sin embargo, la cepa que mantuvo todos los genes suprimidos (*frdA*, *pta*, *ldhA* y *ackA*) presentó un rendimiento de producto de 0.43 g·g<sup>-1</sup> solo un poco mayor con su homoparental del tipo salvaje de 0.36 g·g<sup>-1</sup>.

Shams Yazdany & Gonzales 2008 [47] también modificaron la vía de síntesis de glicerol, minimizando la síntesis hacia succinato y acetato, inactivando las enzimas fumarato reductasa ( $\Delta$  *frdA*) y fosfato acetiltransferasa ( $\Delta$  *pta*), respectivamente. De esta manera crearon dos cepas: SY03 siendo el hidrógeno y el etanol los principales productos y SY04 con etanol y formiato; de esta última también se mantenía inactivada la enzima formiato-hidrógeno liasa ( $\Delta$  *fdhF*), para evitar que el formiato se convirtiera a CO<sub>2</sub> o hidrógeno.

Factores como la concentración del sustrato, pH, temperatura, potencial de oxidoreducción, entre otros, afectan al producto final en la fermentación con glicerol. En cuanto a la producción de etanol, el pH se debe mantener por arriba de 7, sin sobrepasar un valor de 8.2; en este rango la producción de etanol es mayor comparado a pH por debajo de 7 [34]. El consumo de glicerol por *E. coli* mejora a pH neutro-alkalino [52]. La temperatura es otro factor importante en la transformación microbiológica de glicerol; tal como lo muestra el estudio por Thapa, et al. 2013 [34], en el cual se determinaron distribuciones fraccionales de carbono a etanol de 27.45% a 30 °C, 40.62% a 34 °C y 21.27% a 37 °C. Mientras que la fracción de acetato a 34 °C fue del 50.23% y a 37 °C del 78.24%.

La inhibición se podría presentar con altas concentraciones del sustrato como lo reportan Adnan et al. 2014 [5]. Cuando se trabajó a concentraciones por arriba de  $48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  hubo inhibición, atribuyéndolo a problemas en la presión osmótica dentro de la célula. Otro efecto negativo en la producción de etanol es la presencia de sales. Por ejemplo *E. coli* SS1 puede tolerar concentraciones de hasta  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; mientras que *E. coli* BL21(DE3) presentó una tolerancia a sales de fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) de sólo  $3.018 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y cloruro de magnesio de  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , produciendo etanol a concentraciones por arriba de los  $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **2.6.2. Levadura *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es una levadura anaeróbica facultativa [11], es muy empleada en la producción de bebidas alcohólicas y en la producción de etanol como combustible, debido a su alta capacidad de producción de etanol [57]. Es ampliamente utilizada como microorganismo huésped [58] y es considerado como microorganismo seguro (GRAS) [59].

*S. cerevisiae* fue aislada por primera vez en 1883 por Emil C. Hansen, esta levadura puede convertir glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y sacarosa en etanol, pero no es capaz de convertir pentosas, lactosa y celobiosa. Produce dos moles de etanol y dos moles de dióxido de carbono por cada mol de glucosa por la vía de Embden- Meyerhof, algunas de sus ventajas son [50]:

1. Presenta mejor resistencia al etanol y a sustancias tóxicas, en comparación con las bacterias.
2. Al trabajar a pH bajos, reduce el riesgo de contaminación e impide la proliferación de microorganismos patógenos.
3. Se produce eficientemente etanol, aún en concentraciones altas a partir de glucosa y sacarosa.
4. Debido a que su genoma ha sido dilucidado completamente, se puede implementar en la investigación de ingeniería genética.

La desventaja de *S. cerevisiae* es la incapacidad de degradar pentosas, tales como xilosa [11] y arabinosa, que son abundantes en la biomasa lignocelulósica [50], además de no convertir directamente al glicerol en etanol [48, 60].

La mayor parte de las investigaciones en torno a *S. cerevisiae*, empleando glicerol como única fuente de carbono se dirigen más a su crecimiento y pocos son los que reportan la producción de etanol. El único reporte relacionado con el crecimiento de *S. cerevisiae* usando glicerol crudo es el de Yu et al. 2010 [61], donde los autores solo mencionan que creció, pero no se reportan los datos.

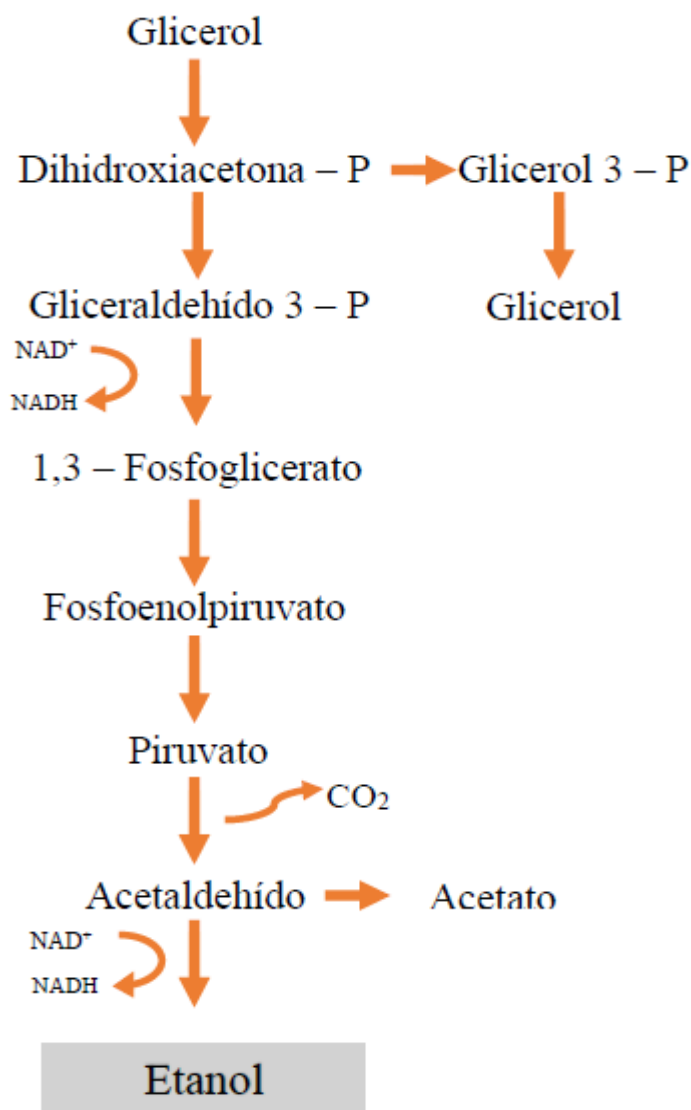
#### **2.6.2.1. Ruta metabólica de *Saccharomyces cerevisiae***

En *S. cerevisiae*, el glicerol entra en la célula por al menos dos mecanismos diferentes, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Cuando hay glucosa presente, el glicerol puede ingresar a las células mediante un transporte facilitado, probablemente a través del canal de glicerol, codificado por *Fps1*, mientras que, en células cultivadas con etanol, glicerol y acetato, un sistema de simulación de protones asegura la absorción de glicerol [61].

El glicerol se sintetiza en el citosol a partir de DHAP, en dos etapas catalizadas por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADH (GPDH) y una fosfatasa inespecífica, la cual no se ha comprendido completamente [66, 67]. La mayor parte del DHAP formado en la glucólisis se convierte posteriormente en etanol [67]. En la Figura 4 se observa a detalle la ruta metabólica de *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* la formación de glicerol se inicia mediante la reducción de DHAP a glicerol-3-fosfato (G3P), en una reacción catalizada por dos isoenzimas de NAD<sup>+</sup>, dependientes de glicerol-3P-deshidrogenasa (G3PDH), *Gpd1* y *Gpd2*. El G3P se hidroliza posteriormente a glicerol y fosfato inorgánico por Glicerol-3P fosfatasa, cuyas enzimas están codificadas por *GPP1* y *GPP2* [68].

El NADH que se forma en la glucólisis se oxida principalmente a través de la ruta de biosíntesis del etanol, presentando un 74% aproximadamente de la incorporación del carbono en condiciones anaerobias, empleando glucosa como sustrato. Sin embargo, también puede tomar la vía de glicerol, siendo necesaria para oxidar el exceso de NADH [58, 66, 68] con un flujo de carbono de aproximadamente de 8.5% [58].



**Figura 4.** Ruta metabólica *S. cerevisiae*, adaptada de [57, 67, 69]



El etanol es un producto que en condiciones anaeróbicas produce ATP. Además del etanol, otros compuestos orgánicos podrían acumularse como productos catabólicos del 1,3-bisfosfoglicerato que se sintetiza simultáneamente con NADH en la reacción de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH [67]. Entonces, se puede suponer que cuando las células de levadura acumulan anaeróticamente cantidades iguales de glicerol y etanol, el balance de ATP será cercano a cero [67].

#### **2.6.2.2. Producción de etanol con *S. cerevisiae* en glicerol.**

En la investigación realizada por Yu et al. 2010 [61] *S. cerevisiae* fue modificada para incrementar la tasa de utilización de glicerol, con la sobreexpresión simultánea de glicerol deshidrogenasa (Gcy) y dihidroxiacetona quinasa (Dak); que son las enzimas que convierten al glicerol en DHAP. Con ello, se obtuvo un incremento en la producción de etanol de 2.4 veces más que lo obtenido con la cepa salvaje. Con la adición de la proteína de absorción de glicerol (Gup1) la producción total resultó en un incremento de 3.4 veces ( $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). *Gup1* es esencial para el crecimiento adecuado de *S. cerevisiae* en glicerol, así como para la recuperación mediada por glicerol del estrés salino. En un estudio posterior [62] se eliminaron los genes FPS1 y GPD2 y la producción aumentó hasta una concentración de  $4.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . FPS1 controla parcialmente el flujo de salida de glicerol, codificando un canal facilitador que se cierra durante un estrés hiperosmótico y se abre durante el estrés hipoosmótico.

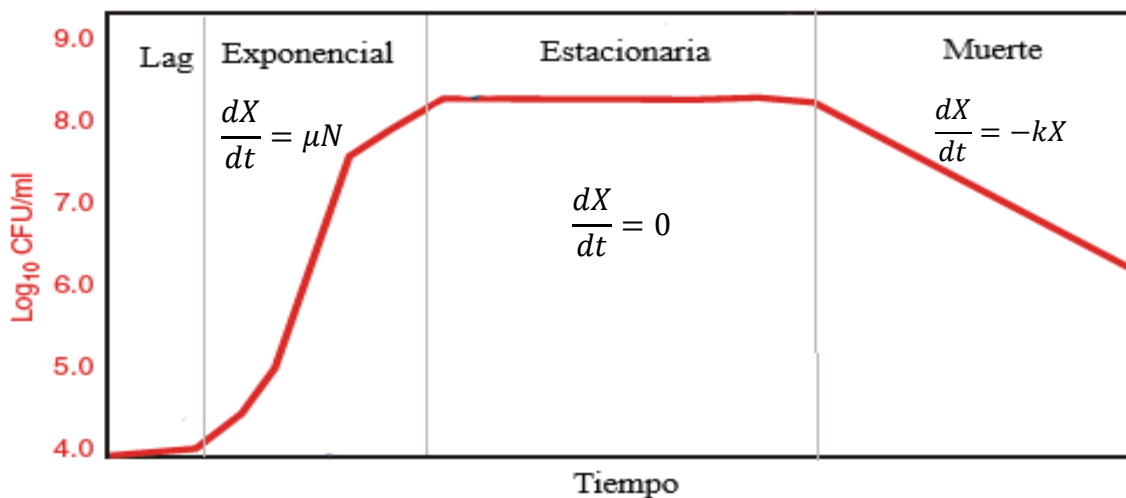
Otras investigaciones se han enfocado al incremento de la tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ), debido al poco o nulo crecimiento que presenta *S. cerevisiae* en glicerol. Un ejemplo es la cepa CBS6412 donde  $\mu_{\text{máx}}$  fue de alrededor de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  [63]. Klein et al. 2016 [64] incrementaron la rapidez específica de crecimiento de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  hasta  $0.18 \text{ h}^{-1}$  con un rendimiento de biomasa de  $0.56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , al sobreexpresar el facilitador de glicerol (homólogos de Fps1).

Por su parte Ochoa-Estopier et al. [42], adaptaron la cepa de *S. cerevisiae* CBS 8066 para usar glicerol como única fuente de carbono, usando una concentración de 60 g·L<sup>-1</sup>. Con esto se mejoró la  $\mu_{\text{máx.}}$  de 0.01 hasta 0.2 h<sup>-1</sup> después de 50 generaciones. En dicha investigación también se llegó a la conclusión de que la concentración de glicerol tiene un efecto sobre la tasa de crecimiento, ya que a una concentración de 150 g·L<sup>-1</sup> de glicerol la  $\mu_{\text{máx.}}$  fue de 0.10 h<sup>-1</sup>, la mitad a la obtenida con una concentración de 60 g·L<sup>-1</sup>.

Una investigación similar se realizó por Merico et al. 2011 [65] para modificar las cepas CEN.PK 113-7D y W303 haciendo uso de la ingeniería evolutiva. En un primer intento la cepa de *S. cerevisiae* no presentó crecimiento y la fase de adaptación duró de 3 a 5 semanas, a pesar de que las células se habían precultivado en medios sintéticos de glicerol. La fase de adaptación se redujo al adicionar peptona (0.05%) incrementando la tasa de crecimiento específico de 0.060 h<sup>-1</sup> a 0.110 h<sup>-1</sup> en la cepa CEN.PK 113-7D y de 0.008 h<sup>-1</sup> a 0.036 h<sup>-1</sup> en W303, debido a la presencia de aminoácidos que evitan que se genere un exceso de NADH. Es probable que la ineficaz reoxidación de NADH contribuya a la fase de latencia larga en el medio sintético de glicerol [65].

## 2.7. Cinética de crecimiento

El ciclo de crecimiento en microorganismos está representado por 4 fases e inicia a partir de la inoculación del medio de cultivo, tal como se aprecia en la Figura 5.



**Figura 5.** Fases del crecimiento celular, adaptación de [71]

La primera fase, denominada LAG, involucra un periodo de adaptación para el crecimiento del microorganismo en un medio nuevo y conlleva la síntesis de las enzimas requeridas para el desarrollo del microorganismo [70]. La fase LAG puede alargarse debido a una baja densidad celular que da como resultado la dilución de exoenzimas (enzimas liberadas de la célula) y de nutrientes que se filtran de las células de crecimiento, dando como resultado una transición lenta a la etapa exponencial [71].

En la fase exponencial, o LOG, la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares [70]. Este comportamiento puede expresarse matemáticamente por la Ecuación 1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $X$  es la biomasa o número de células ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\mu$  es la rapidez específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  representa el tiempo.

Resolviendo la Ecuación 1 se puede calcular el tiempo de generación, así como la tasa de crecimiento específica utilizando los datos obtenidos a partir de una curva de crecimiento [71].

A continuación se describe el procedimiento de solución de tal ecuación. Se realiza una reagrupación de términos comunes para obtener la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{X} = \mu dt$$

Posteriormente, se plantea la integración a ambos lados de la ecuación; el lado izquierdo desde un valor inicial de biomasa ( $x_0$ ) hasta el valor final ( $x$ ), mientras el lado derecho desde el tiempo inicial ( $t_0=0$ ) hasta el tiempo final ( $t$ ):

$$\int_{x_0}^x \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt$$

Una vez determinados los límites de integración, se realizan las operaciones correspondientes:

$$\ln X = \mu(t - t_0) + \ln X_0 \quad \text{o} \quad X = X_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

Finalmente, al despejar  $\mu$  se obtiene la expresión de la Ec. 1.1, a partir de la cual se puede calcular la rapidez específica de crecimiento del microorganismo.

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{(t - t_0)} \quad \text{Ec. 2.1}$$

La fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento neto, el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte celular [70]. Uno de los factores por los que disminuye el crecimiento de los microorganismos, es la disminución de la fuente de carbono o la falta de un nutriente esencial. Es importante mencionar que el crecimiento de las células no se detiene por completo, ya que las células muertas crecen llevando a cabo un metabolismo endógeno, el cual se puede medir por la absorción de oxígeno o evolución de dióxido de carbono. Una segunda razón para el crecimiento lento se debe a la acumulación de productos de desecho, los cuales comienzan a inhibir el crecimiento celular o son tóxicos para las células [71]; esto implica que la fase estacionaria está desequilibrada, ya que las células pueden sintetizar con facilidad otros compuestos más fáciles para ellas que otros de interés [71]. Como resultado de este estrés nutricional, las células de fase estacionaria son generalmente más pequeñas y redondas que las células en la fase exponencial [71]. Así, puesto que la variación de crecimiento celular tiende a cero, el comportamiento de la fase estacionaria está representado por la Ec. 2.

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad \text{Ec. 3}$$

En la fase de declinación o muerte, la rapidez de muerte ( $k$ ) puede volverse más rápida que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad de células [70], esta fase está representada por la Ec. 3:

$$\frac{dX}{dt} = -kX \quad \text{Ec. 4}$$

Uno de los factores por lo que ocurre la muerte celular es la inhibición microbiana, la cual se da cuando la concentración de algún químico que se produce durante la fermentación alcanza valores tóxicos para las células, provocando que la velocidad de reacción se dificulte [11].

Los principales factores que influyen en el crecimiento de un microorganismo son: la concentración de sustrato, la temperatura, el pH y la inhibición por producto. El efecto de la concentración en el crecimiento de un microorganismo fue estudiado inicialmente por Monod, quién propuso la siguiente ecuación [70].

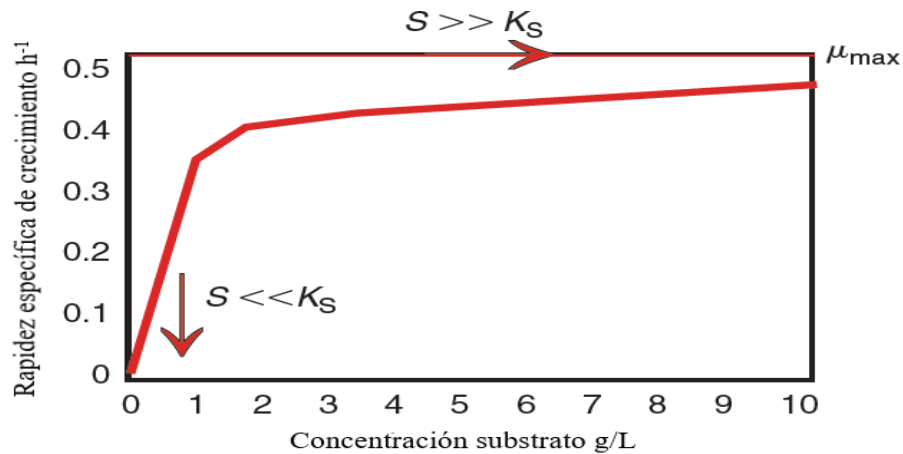
$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ec. 4}$$

donde  $\mu$  es la rapidez específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ),  $S$  es la concentración de sustrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\mu_m$  es la rapidez específica de crecimiento máxima y  $K_s$  es la constante de Monod o constante de saturación ( $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ ), que representa la concentración de sustrato que produce la mitad de  $\mu_m$  [70]. Las dos constantes ( $K_s$  y  $\mu_m$ ) dependen de las propiedades intrínsecas de un tipo de microorganismo, del sustrato que se utiliza y de la temperatura de crecimiento.

En la Figura 6 se representa la relación de la rapidez específica de crecimiento en función de la concentración del sustrato, tal como fue propuesto por Monod.

Entonces, la ecuación de Monod también se puede expresar como una función de la utilización del sustrato (Ecuación 5), dado que el crecimiento está relacionado con la utilización del sustrato mediante una constante llamada rendimiento celular:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{Y} \mu X \quad \text{Ec. 5}$$



**Figura 6.** Relación entre la concentración de sustrato con la rapidez específica de crecimiento

Así, las ecuaciones 1, 4 y 5 representan un modelo de crecimiento bacteriano, basado en la propuesta de Monod, que incluye de manera implícita la rapidez de crecimiento específica y la influencia del sustrato.

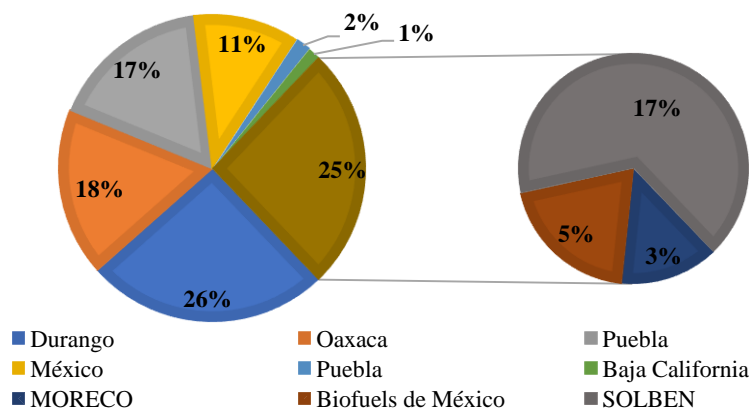
Este modelo tiene sus limitaciones ya que no considera algún otro nutriente aparte del sustrato y no considera la acumulación de subproductos tóxicos del metabolismo [71]. No obstante, es un sistema de ecuaciones que representa los fenómenos esenciales del crecimiento bacteriano de manera relativamente fácil.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México el sistema energético se basa en el uso de combustibles fósiles, ocupando el lugar número 14 de países emisores de GEI [14]. Por lo tanto, mejorar la seguridad energética, buscar la disminución tanto de GEI como de la contaminación atmosférica ocasionada por las fuentes móviles, son aspectos que conllevan a buscar alternativas más sustentables [72] que sean económicamente viables y puedan asegurar un desarrollo social continuo, como los biocombustibles [22].

El gobierno de México ha promovido el uso y producción de biocombustibles con la aprobación, en el año 2008, de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, donde se favorece el uso de biodiesel y bioetanol [16]. De igual manera, en 2014, la comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos aprobó la implementación de gasolina oxigenada (5.8% de etanol); dicho proyecto inicio a principios de 2016 y tiene una duración de 10 años [73]. Con estos precedentes es evidente la necesidad de opciones para la producción de etanol; opciones que sean factibles económicamente para cumplir con la demanda requerida y que contribuya a obtener beneficios sociales.

Al igual que el etanol, el biodiesel es una alternativa al uso de combustibles fósiles, sin embargo; la obtención de biodiesel conlleva la generación de glicerol crudo como coproducto. El glicerol crudo está representando un gran problema a las plantas procesadoras de biodiesel, ya que se requiere de una disposición final adecuada que evite la contaminación de recursos naturales (agua y suelo). Lo anterior es debido, principalmente, a la alta concentración de impurezas como el metanol, jabones y sales, presente el glicerol crudo. En México, para 2016 se tuvo una producción de 4,182 m<sup>3</sup> de biodiesel en plantas del gobierno y 1,248 m<sup>3</sup> por parte de empresas privadas, teniendo un total de 5,630 m<sup>3</sup> al año por lo que se obtuvieron alrededor de 563 m<sup>3</sup> de glicerol crudo. En la Figura 7 se ilustra la distribución de la producción de biodiesel en México [73]. Es notable que del total de la producción nacional de biodiesel nacional sólo el 25% está representado por el sector privado (con 3 empresas). Esta situación puede cambiar rápidamente debido a las reformas energéticas y la producción de glicerol crudo deberá ser atendida.



**Figura 7.** Producción de biodiesel en México [73]

El glicerol crudo no tiene una aplicación debido a las impurezas que presenta y sólo es confinado para su disposición final, por ello buscar productos de valor agregado, incrementaría los beneficios de la industria del biodiesel. Se han investigado principalmente procesos biológicos para la conversión de glicerol crudo hacia otros productos. Los procesos biológicos tienen varias ventajas en comparación con las químicas, entre ellas se presenta una mayor especificidad, tolerancia a impurezas y una mayor protección al medioambiente [55].

El etanol, es un metabolito que los microorganismos generan a través de la fermentación anaerobia. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es empleada en la industria de bebidas alcohólicas, sin embargo, su estudio en la producción de alcohol con glicerol como fuente de carbono se limita al uso de glicerol puro, por lo tanto, no se tiene precedentes de su uso en glicerol crudo, por otro lado, *Escherichia coli* ha demostrado tolerar concentraciones altas de glicerol crudo. La tendencia actual se dirige a la modificación de los microorganismos para obtener mejores rendimientos, pero con ello su utilización a nivel industrial presenta problemas debido a la sensibilidad del microorganismo a las condiciones extremas de los procesos reales, por ello, la adaptación de las cepas salvajes es un paso importante para poder emplear un nuevo sustrato como lo es el glicerol crudo, posteriormente con una optimización del proceso se incrementa el rendimiento.



#### **4. HIPÓTESIS**

El rendimiento en la producción de etanol estará en función de la ruta metabólica del organismo. *S. cerevisiae* tendrá un menor rendimiento porque requiere de rutas metabólicas adicionales para la fermentación de sustratos reducidos como el glicerol, por su parte *E. coli* utiliza el glicerol directamente.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivos General**

Evaluar la producción de etanol a partir de glicerol residual de la industria del biodiesel, empleando *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* en condiciones óptimas de fermentación reportadas en literatura para dar un valor agregado al glicerol crudo.

##### **5.2. Objetivos específicos**

- Valorar el rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* en la producción de etanol durante una fermentación anaerobia con temperatura, pH y agitación óptimas reportadas en literatura, para la selección del más eficiente.
- Escalar las condiciones de operación del organismo más eficiente a reactores de 7 L para la optimización de la fermentación.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Revisión bibliográfica, parámetros de operación durante la fermentación

Se revisó en literatura las condiciones óptimas de fermentación anaerobia de los microorganismos para la producción de etanol, las cuales se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Resumen de los parámetros de fermentación anaerobia de *S. cerevisiae* y *E. coli*.

Organismo	Temperatura °C	pH	Agitación (rpm)	Tiempo (h)
<i>S. cerevisiae</i>	30 [62, 69, 74]	4.5 [74]	200 [74]	
		5.0 [69]	800 [69]	
<i>E. coli</i>	34 [34]	7.6 [4, 34]	200 [34, 54]	48-72 [54]
		6.3 [4, 31]	50 [5]	120 [5]
			150 [4]	42 [34]

Para *E. coli*, la temperatura óptima reportada en la mayoría de los estudios es de 37 °C, sin embargo, en el presente estudio, la cepa K-12 SMG123 no exhibió crecimiento a 37 °C. Sólo en el estudio realizado por Thapa et al. 2013 [34] se menciona que la temperatura óptima fue de 34 °C. Considerando que en los estudios preliminares (readaptación de la cepa) realizados en el presente proyecto se observó un crecimiento de *E. coli* a 30 °C, y que no se apreció crecimiento a 37 °C, se decidió manejar la temperatura de 34 °C durante la experimentación.

En cuanto a *S. cerevisiae*, se trabajó a 30 °C, tal como lo reporta la literatura.

### 6.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial (2x3) con tres réplicas y un blanco en cada experimento, teniendo 48 unidades experimentales. Los factores fueron el tipo de microorganismo y la pureza del glicerol (crudo o puro). La concentración de glicerol ensayada fueron tres niveles (10, 20 y 30 g·L<sup>-1</sup>). Ver Tabla 6.

**Tabla 6.** Diseño experimental.

		Glicerol residual					
Glicerol	<i>S. cerevisiae</i>			<i>E. coli</i>			
	Concentración gL <sup>-1</sup>						
Puro	10	20	30	10	20	30	

### 6.3. Caracterización fisicoquímica

#### 6.3.1. Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad se obtuvo por gravimetría a través de la determinación de la diferencia de pesos entre una muestra de glicerol crudo sin tratamiento y la misma muestra después de someterse a calentamiento a 65 °C por 24 h.

La siguiente ecuación se empleó para obtener el porcentaje de humedad.

$$\%H = \left( \frac{a - b}{c} \right) * 100$$

donde *a* representa el peso del crisol con la muestra sin tratamiento, *b* peso del crisol con la muestra sometida a calentamiento a 65 °C y *c* es el peso de la muestra sin tratamiento.

#### 6.3.2. Obtención de cenizas

Posterior a la obtención del porcentaje de la humedad, las muestras se dejaron durante 3.5 horas en un horno a 550 °C. Después de la calcinación, las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente dentro del horno y posteriormente se pasaron al desecador y se pesaron. Una vez pesados se calculó el porcentaje de cenizas con la siguiente ecuación:

$$\%C = \left( \frac{d - e}{b - e} \right) * 100$$

donde *d* es el peso del crisol con la muestra calcinada, *e* el peso del crisol tarado y *b* peso del crisol con la muestra a 65 °C.

### **6.3.3. Obtención de grasas**

Primero se puso a peso constante un vaso de precipitado, se pesaron 5 gramos de glicerol crudo y se mezclaron con 5 mL de hexano. La mezcla se homogeneizó con ayuda de un agitador vortex y se transfirieron a un embudo de separación. La solución se dejó en reposo por 30 min y posteriormente se recuperó la fase de hexano, depositándolo en el vaso de precipitado; se volvieron adicionar 5 mL de hexano en la fase de glicerol crudo y se volvieron a separar las fases; este proceso se repitió dos veces adicionales para garantizar la máxima recuperación de grasas. Por último, se dejó el vaso en la estufa a 55 °C durante un día para evaporar al disolvente, el vaso se dejó en el desecador y después se pesó para calcular el porcentaje de grasa.

### **6.3.4. Determinación de pH**

Las mediciones de pH se obtuvieron empleando un medidor de pH (Thermo Scientific™ Orion™ Star A211). El pH metro se calibró cada vez que se realizó la determinación con tres puntos de referencia: buffer de 4, 7 y 10 y una vez calibrado se midió el pH de la muestra.

### **6.3.5. Análisis etanol y glicerol**

La cuantificación de glicerol y etanol se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), empleando un equipo Agilent Technologies 1200. La separación de analitos se realizó con una columna Agilent Hi-Plex H y la detección se hizo con un detector de índice de refracción (RID). La temperatura del detector y de la columna se mantuvo a 35 °C con un flujo de 0.7 mL·min<sup>-1</sup> de agua como fase móvil. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL. El tiempo total de la corrida fue de 25 minutos. Antes de analizarse, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Para cada analito se realizó la curva de calibración pertinente.

### **6.3.6. Análisis de Espectrofotometría Infrarroja**

La recolección del espectro de IR se realizó en pastilla de KBr con un equipo de la Marca NICOLET Modelo Avatar 320 y la evaluación se realizó utilizando el Software OMNIC. El barrido fue de 4000 a los 400  $\text{cm}^{-1}$ . Se analizó tanto al glicerol crudo como al glicerol grado reactivo.

### **6.3.7. Análisis Absorción atómica**

Para conocer la concentración de los metales en el glicerol crudo, se realizó un análisis de absorción atómica, para lo cual se utilizó el equipo de absorción atómica marca Thermo Scientific Modelo ICE 3300. Se cuantificó la concentración de potasio, calcio y magnesio.

## **6.4. Tratamiento glicerol crudo**

Debido a que el proceso de fermentación requiere condiciones ácidas, fue necesario acidificar al glicerol crudo. Sin embargo, esta acción provocó que la solución se transformara en una emulsión, la cual no permitió cuantificar la biomasa por densidad óptica. (DO) Por ese motivo, se decidió realizar un pretratamiento para separar los residuos de grasas sin transesterificar (Figura 8). Para ello, se realizó una hidrólisis ácida con HCl concentrado, disminuyendo el pH a 2; con lo que se dio una separación de fases: glicerol y sales en la parte inferior; mientras que los residuos de grasas se mantuvieron en la parte superior de la solución. Para una separación completa se centrifugó a 300 rpm durante 10 minutos. En la fase de glicerol permanecieron todas las impurezas ya que solo se retiraron los ácidos grasos sin reaccionar.



**Figura 8.** Separación de ácidos grasos sin transesterificar en glicerol crudo

## **6.5. Adaptación de microorganismos al glicerol crudo**

### **6.5.1. Adaptación de *E. coli* al glicerol**

La bacteria usada fue *E. coli* K-12 ATTC SMG123, la cual se aisló primero en cajas de agar EMB (Eosina azul de metileno) a partir del cultivo puro. Se preparó un medio de cultivo Luria Bertani modificado (LB-G), el cual contiene por cada litro 5 g de triptona, extracto de levadura y NaCl, suplementado con 10 g de glicerol. El medio de cultivo se esterilizó durante 15 min a 14.22 psi. Se usó una colonia para la inoculación, se dejó incubar por 24 horas a 105 rpm y 30 °C, posteriormente para la preservación de la bacteria se prepararon cajas con agar de LB-G, las cuales se estriaron con el cultivo antes mencionado. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron en incubación a 30 °C durante 24 horas y finalmente se transfirieron a refrigeración a 4 °C para su conservación hasta su uso.

Para la adaptación de la bacteria al glicerol, en primer lugar, se realizó una prueba de inhibición, para definir las concentraciones con las que se evaluaría la producción de etanol a partir de glicerol crudo. Para ello se probaron concentraciones de 60 a 5 g·L<sup>-1</sup>, tanto de glicerol crudo como grado reactivo. Se cortaron círculos de papel filtro industrial con un diámetro de 7 mm y se dejaron inmersos por 3 horas en las soluciones de glicerol crudo y glicerol grado reactivo. Se prepararon cajas de agar nutritivo a las cuales, con ayuda de un hisopo estéril, se colocó una capa del cultivo LB-G donde estaba presente la bacteria. Posteriormente, se colocaron los círculos de papel filtro embebidos en las soluciones de diferente concentración de glicerol (crudo y grado reactivo) y se dejaron en incubación durante 24 horas a 30 °C.

#### **6.6. Adaptación de *S. cerevisiae* al glicerol**

Se usó la levadura *S. cerevisiae* ATCC 4126, la cual se creció primero en un medio de cultivo empleando glucosa como fuente de carbono. El medio de cultivo contiene por litro: 50 g de glucosa, 5 g de extracto de levadura, 2.07 g de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 0.585 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.18 g de 0.368 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.045 g de CaCl<sub>2</sub> y 7.5 mL de solución de sales (g·L<sup>-1</sup>: 1.26 de NaCl, 0.26 de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25 de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.12 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y 0.16 de ZnCl<sub>2</sub>). El pH del medio se ajustó a 5.5. El sistema se mantuvo en incubación durante 24 horas a 30 °C y 130 rpm, se prepararon cajas de agar Sabouraud para mantener un stock.

Para la adaptación de la levadura en medio con glicerol, se realizó una disminución gradual de glucosa a glicerol con el medio descrito anteriormente, finalizando con una concentración de 50 g·L<sup>-1</sup> de glicerol. Del último cultivo se aisló a la levadura en cajas de agar Sabouraud y se inocularon medios con 10 y 50 g·L<sup>-1</sup> de glicerol para observar el efecto de la concentración de glicerol en el crecimiento de la levadura. Para el almacenamiento de la levadura se prepararon cajas de agar YPG (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glicerol y 1.5% de agar, pH 5).

## **6.7. Cuantificación de biomasa**

La determinación de biomasa se obtuvo a partir de la correlación del peso seco de la biomasa con la densidad óptica (DO), medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm para *E. coli* y 550 para *S. cerevisiae*.

Para el conteo de CFU (Unidades Formadoras de Colonias) se empleó el método de conteo extendido en placa. La biomasa se separó por centrifugación a 3500 rpm a 4 °C durante 15 minutos, repitiendo el procedimiento dos veces para después pasar las muestras a la estufa a 60 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente dentro de un desecador y finalmente se pesaron en una balanza analítica.

## **6.8. Curva de crecimiento**

### **6.8.1. Curva de crecimiento de *E. coli* K-12 SMG123**

Para adaptar la bacteria al glicerol, primero se preparó en medio LB-G, que cumple el papel de inóculo (10% v/v). Para ello se adicionó 2 colonias de bacteria al medio y se mantuvo en incubación durante 2 horas a 34 °C y 105 rpm.

La preparación del medio de fermentación siguió la metodología propuesta por Cofré et al. 2012 [75] que contiene por litro: 0.0806 g de NaSO<sub>4</sub>, 0.0152 g de NaCl, 0.0310 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 4.25 g de peptona de caseína.

Para la determinación de la curva de crecimiento de la bacteria, se trabajó con una concentración de 30 g·L<sup>-1</sup> de glicerol. A todos los medios de cultivos se le ajustó el pH a 7.6 adicionando HCl o NaOH 2M.

En los ensayos de fermentación se mezcló el inóculo y el medio fermentativo. La mezcla se traspasó a tubos esterilizados, dejándose en la incubadora a 34 °C y 105 rpm durante 72 horas. El seguimiento de la fermentación se hizo tomando muestras periódicamente para la medición de absorbancia, peso seco y conteo de CFU. Las muestras se dejaron en refrigerador después de las mediciones para detener el crecimiento microbiano. Tanto para glicerol grado reactivo como para el crudo se siguió la misma metodología.



### **6.8.2. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae***

Para la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* no se encontraron reportes relativos a la fermentación de glicerol crudo. Por ello, para observar el efecto del glicerol como fuente de carbono, solo se adicionó la fuente de nitrógeno (extracto de levadura a  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y glicerol ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ajustando el pH a 5.5. En este caso se inoculó con una sola colonia de las cajas de agar YPG. La fermentación se llevó a cabo durante 196 horas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y 105 rpm. Al igual que con *E. coli*, se hicieron muestreos periódicos y las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta la cuantificación de biomasa y CFU.

### **6.9. Etapa 1. Fermentación en microrreactores**

Se emplearon frascos de vidrio como reactores (Figura 9), las tapas fueron adaptadas para poder muestrear durante la fermentación, el volumen de trabajo fue de 100 mL, con un 10 % (v/v) de inóculo. Posterior a la inoculación, los reactores fueron burbujeados con nitrógeno para el desplazamiento de aire y crear las condiciones anaerobias.

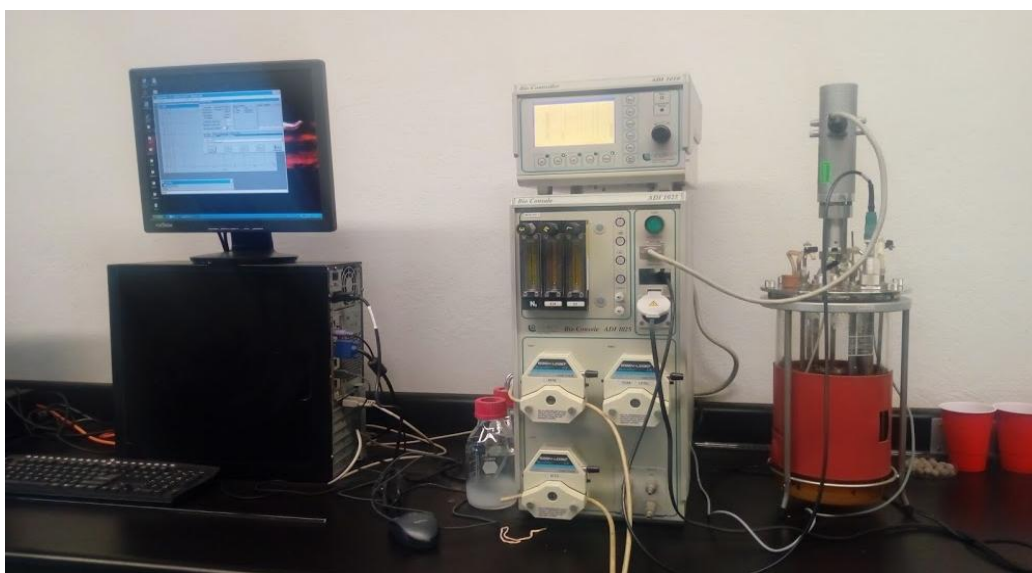
Para *E. coli* se usó medio LB-G para inocular los frascos con una colonia de bacterias y se mantuvo durante 12 horas en la incubadora con agitación; mientras que para *S. cerevisiae* se preparó un cultivo con una concentración de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol puro y de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura y se mantuvo en incubación durante 24 horas. Esto se repitió para la fermentación con glicerol crudo.



**Figura 9.** Fermentación en microrreactores

### **6.10. Etapa 2. Fermentación en reactor de 7 L**

Se empleó un biorreactor de la marca Applikon® modelo ZC8130HB07 de 7 litros de capacidad, con control de temperatura, pH y con agitación interna (Figura 10). El volumen de trabajo fue de 4 litros. Al igual que en los microrreactores el inóculo ocupó un 10% del volumen de trabajo. El reactor se esterilizó junto con el medio de cultivo con una concentración de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , posteriormente a la inoculación se purgó el reactor con nitrógeno. Las condiciones de operación fueron las mismas que en los microrreactores:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y 100 rpm.



**Figura 10.** Biorreactor de 7 L

Para el escalamiento sólo se realizaron tres pruebas en el biorreactor, en la primera no se controló el pH para observar su comportamiento. La razón de esto fue que en los microrreactores, después del periodo de fermentación, el pH sufrió un incremento. En la segunda fermentación se controló el pH; para lo cual se prepararon soluciones 1 M de HCl y 0.1 M de KOH para la regulación de pH; ambas soluciones se esterilizaron al igual que todo el material que mantuvo un contacto directo con el cultivo para evitar alguna contaminación. En el tercer experimento, el inóculo se dejó por 24 horas, con la diferencia de que en ese experimento se inóculó con 5 colonias de *S. cerevisiae* debido al poco crecimiento observado en el segundo experimento.

### 6.11. Análisis estadístico

Los valores presentados en los resultados son la media de tres réplicas por tratamiento  $\pm$  error. La realización de ANOVAs se realizó en Excel 2016, para la determinación de diferencias significativas de los experimentos.

### 6.12. Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos (rapidez específica de crecimiento, constante de saturación) se realizó con base en el modelo de Monod (ecuaciones 1, 4 y 5).

Por otro lado, los diferentes rendimientos se obtuvieron de la siguiente manera. El consumo de glicerol se representa por la siguiente ecuación [5]

$$S_{max} \left( \frac{g}{L} \right) = S_i - S_o \quad \text{Ec. 6}$$

donde  $S_{max}$  representa la concentración máxima de sustrato,  $S_i$  la concentración inicial del sustrato y  $S_o$  la concentración final del sustrato (en el tiempo donde ocurre la máxima producción del producto).

Así mismo, la producción de etanol obedece a la ecuación:

$$P_{max} \left( \frac{g}{L} \right) = P_{max} - P_i \quad \text{Ec. 7}$$

donde  $P_{m\acute{a}x}$  es la concentración máxima de etanol y  $P_i$  es la concentración inicial de etanol.

El rendimiento máximo teórico de producto ( $Y_{p/s}$ ) es de 0.5 g/g cuando el glicerol es la única fuente [4, 31] y se representa con la siguiente ecuación.

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{\text{gramos de producto producido}}{\text{gramos de glicerol consumido}} \quad \text{Ec. 8}$$

Por otro lado, el rendimiento de la biomasa respecto al glicerol consumido se obtiene con la relación expresada en la Ec. 9:

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{\text{gramos de biomasa producida}}{\text{gramos de glicerol consumido}} \quad \text{Ec. 9}$$

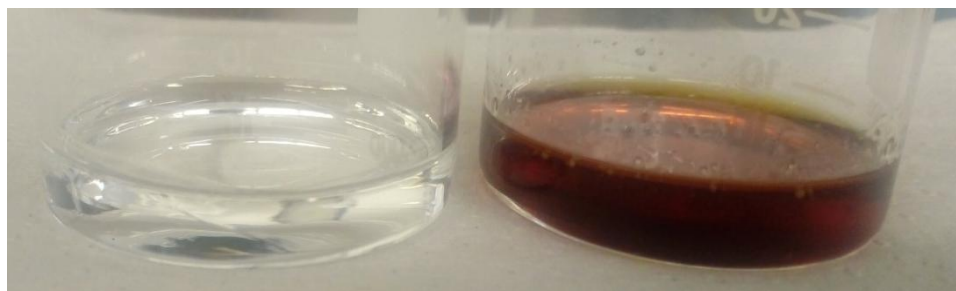
Finalmente, la velocidad del consumo del substrato se obtiene empleando la Ec. 10:

$$d_{\frac{s}{t}} = \frac{\text{consumo total del substrato} \left( \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} \right)}{\text{intervalo de tiempo}} \quad \text{Ec. 10}$$

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

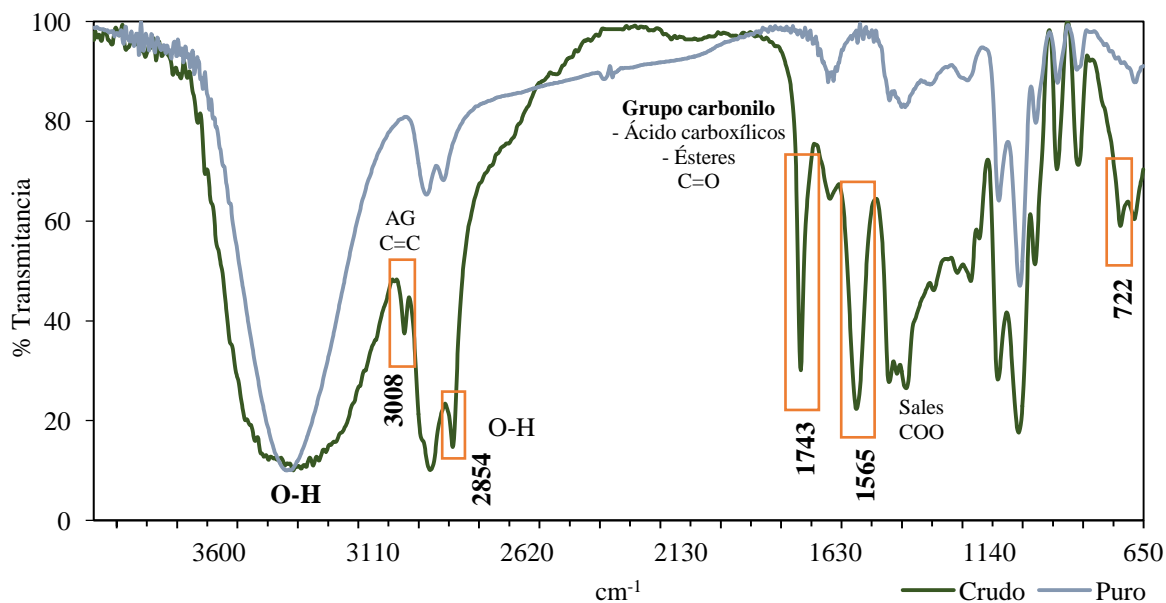
### 7.1. Caracterización de glicerol crudo

El glicerol crudo usado como materia prima para este trabajo, es un subproducto proveniente de la obtención de biodiesel de segunda generación. Es decir, la materia prima para la obtención de biodiesel y del coproducto (glicerol) fueron grasas residuales de la industria restaurantera. Por esa razón, el glicerol crudo con el que se trabajó en este proyecto contiene una gran cantidad de impurezas. El glicerol crudo empleado en este trabajo presenta un color marrón oscuro y su viscosidad es mayor en comparación con el glicerol puro, tal como se muestra en la Figura 11



**Figura 11.** Comparación entre muestras de glicerol crudo (derecha) y puro (izquierda)

En la Figura 12 se presenta una comparación del análisis por espectroscopía infrarroja del glicerol crudo y de glicerol puro. Ambos espectros presentan las señales características de glicerol puro reportadas en bibliografía, a saber, la banda de estiramiento de grupos O-H centrada a  $3350\text{ cm}^{-1}$  y la de los grupos C-H en  $2930\text{ cm}^{-1}$ . Así mismo, es posible observar las bandas en la región de  $800\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las flexiones C-O-H, C-O, O-H de alcoholes primarios [76, 77]. En el caso del glicerol crudo también se observa una señal a  $1565\text{ cm}^{-1}$  asociada a la flexión del grupo COO relacionada con sales disueltas provenientes de resto de catalizador y jabones, otra señal importante es la observada a  $1743\text{ cm}^{-1}$  que se asocia a grupos C=O de los ésteres residuales en el glicerol crudo y la señal a  $3008\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a estiramientos C=C de cadenas alquílicas de ácidos grasos sin reaccionar [76,77], la banda en  $722\text{ cm}^{-1}$  podría representar a la cadenas del tipo  $-(\text{CH}_2)_n-$ , en espectros de cadena larga y en grupos con terminales polares (ácidos grasos, ésteres). Este comportamiento en los espectros IR está en concordancia con lo reportado por [76,77,51].



**Figura 12.** Análisis IR de glicerol crudo y puro

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica. El glicerol crudo usado en este experimento como materia prima no fue sometido a ningún tratamiento para la caracterización, motivo por el cual el pH es alcalino. Esto es debido a la remanencia de catalizador en el glicerol, tal como ha sido reportado antes [5, 37]. El catalizador empleado en la obtención del biodiesel es hidróxido de potasio, lo que justifica la presencia de 3.13% p/p de potasio elemental en la muestra de glicerol. Otros elementos detectados fueron sodio con 0.021% y magnesio con sólo el 0.003%.

No se realizó la determinación de metanol, sin embargo, está incluido en el porcentaje de humedad con 24.39%, el cual es un porcentaje alto en comparación con los obtenidos por [3, 4, 78, 79]. El porcentaje de cenizas obtenido (8.12%) es uno de los mayores encontrados en literatura, sólo por debajo del estudio de Sivasankaran et al. 2016 [37], el cual es de 11.25%. El valor de las cenizas da una pauta para conocer el grado de la pureza del glicerol crudo, por lo que es evidente que el glicerol usado en este trabajo es de una pureza muy baja.

**Tabla 7.** Caracterización de glicerol crudo, (% p/p).

<b>% Humedad</b>	<b>% Cenizas</b>	<b>% Grasas</b>	<b>% Glicerol</b>	<b>% potasio elemental</b>	<b>% MONG</b>	<b>pH</b>	<b>Densidad g/cm<sup>3</sup></b>
24.39	8.12	10.76	36.3	*3.13	20.43	10.9	1.10

\*El porcentaje de potasio está incluido en las cenizas, no se contabilizó para la obtención de MONG

En la Tabla 8 se presenta una comparativa de la caracterización de glicerol crudo de varios estudios. El porcentaje de glicerol obtenido en esta investigación sólo es comparable con el estudio realizado por Aguzín 2015 [79] ya que en la mayoría de los estudios el contenido de glicerol es mayor al 50% y en el caso de [54] y [31] llega hasta un 80%.

En el estudio de Shah et al. 2014 [54], donde el glicerol crudo contiene un 80% de glicerol, la materia prima para la producción de biodiesel fueron aceites residuales de cocina. Tal vez en dicho estudio el glicerol crudo pasó por tratamientos preliminares, por ello, la concentración de glicerol reportada es alta. Esta suposición se basa en que posteriormente al proceso de separación del biodiesel del glicerol crudo, se suelen tener purzas del 40 al 50% y para una concentración mayor (80-88%) se requiere de algún proceso de purificación [29].

Como se ha mencionado antes, la composición del glicerol crudo depende de varios factores como: origen de la materia prima, método del proceso de transesterificación y de los procesos de separación y por ello la gran diferencia en el porcentaje de glicerol que reportan los estudios. El estudio que se acerca más al obtenido en esta investigación es el realizado por Maru et al. 2016 [51], en el cual la materia prima son residuos de aceites y grasas, sin embargo, los valores en la caracterización varían, principalmente en el pH.

**Tabla 8.** Caracterización glicerol crudo de diversas fuentes de materia prima.

Ref.	Glicerol	M-OH	Humedad	Cenizas	Jabones	Grasas	pH	ρ	MONG
[5]	50.0-80.0	-	2.0 - 20.0	-	3.0 - 5.0	-	9.0-11.0	-	-
[47] <sup>&amp;</sup>	84.00	0.02	-	-	-	-	-	-	-
[4]*	83.30	0.06	8.40	4.90	-	-	5.30	1.26	3.34
[31] <sup>&amp;</sup>	83.00	-	11.00	6.00	-	-	-	-	-
[54]	80.00	-	11.00	-	-	-	-	-	-
[27]	60.05	-	-	2.80	-	1.94	-	-	-
[51]*	47.50	-	40.50	4.80	-	-	6.80	1.12	7.20
[78]	41.00	-	2.80	3.40	21.20	-	-	-	-
[79]	32.00	-	2.00	2.0 - 3.0	49.00	-	-	-	-
[3]*	23.60	<1-0.5	5.75	3.20	-	-	3.40	-	67.56
[37]	10.00	-	-	11.25	-	-	9.60	1.29	-

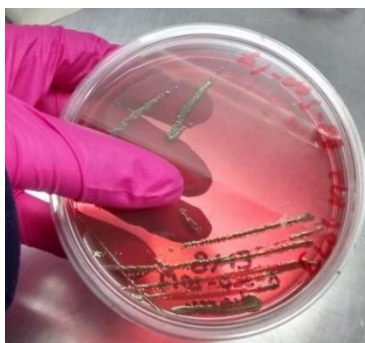
\* % p/p, <sup>&</sup>% v/v

## 7.2. Activación de microorganismos y adaptación a glicerol

### 7.2.1. *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* K-12 SMG123 se obtuvo comercialmente de la ATCC desde el año 2016. Por ese motivo fue necesario, como primer paso, la activación de la bacteria en caldo nutritivo durante 24 horas para asegurar su viabilidad y pureza. Posteriormente se tomó una asada para inocular cajas de agar selectivo EMB por 24 horas.

El crecimiento de *E. coli* en agar EMB se caracteriza por presentar colonias esféricas de color verde metálico, lo cual fue corroborado por observación simple (Figura 13). Este procedimiento sirvió para mantener un stock para los consecutivos experimentos y evitar la contaminación de la cepa madre.

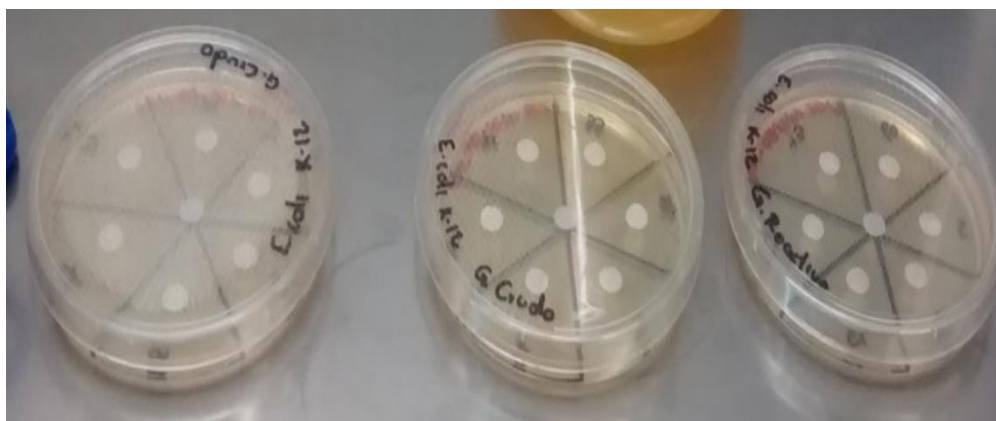


**Figura 13.** Crecimiento de *Escherichia coli* en agar EMB



### 7.2.1.1. Tolerancia de *E. coli* a glicerol

Para identificar las concentraciones límite a las cuales pudieran realizarse los ensayos, en primer lugar, se realizó un estudio de inhibición de crecimiento de la bacteria bajo la presencia de glicerol. Se manejaron concentraciones de 5 a 65 g·L<sup>-1</sup> tanto para glicerol crudo como para grado reactivo. Los resultados que se obtuvieron fueron favorables al no presentarse inhibición en ninguna de las concentraciones (Figura 14). En cuanto a la revisión bibliográfica, la máxima concentración con la que se ha trabajado fue de 37.7 g·L<sup>-1</sup> [4] y 34.5 g·L<sup>-1</sup> [5], la concentración óptima para la fermentación es de 10 g·L<sup>-1</sup> [34], por lo tanto, se decidió manejar las siguientes concentraciones 10, 20 y 30 g·L<sup>-1</sup>.



**Figura 14.** Evidencia de la ausencia de inhibición de crecimiento de *E. coli* en medio enriquecido con glicerol crudo y grado reactivo

### 7.2.1.2. Modificación de la temperatura de crecimiento

Se realizó un experimento de crecimiento bacteriano siguiendo la metodología descrita por Cofré et al, 2016 [4], que establece los siguientes parámetros: 37 °C, pH 7.6 y 100 rpm. Sin embargo, no fue posible observar un crecimiento adecuado, lo cual se atribuyó en primera instancia a la viabilidad de la cepa.

Sin embargo, en cajas de agar EMB se notó un crecimiento lento a 37 °C, por lo que se decidió bajar la temperatura de incubación a 30 °C. Esta temperatura había sido empleada en la reactivación de la bacteria. A 30 °C se notó un aceleramiento en el crecimiento de la bacteria en comparación cuando se creció a 37 °C. En bibliografía se encontró el estudio realizado por Thapa et al, 2013 [34] donde, a diferencia de la mayoría de los estudios encontrados, establecía una temperatura óptima de 34 °C, con este dato se decidió manejar una temperatura de 34 °C a lo largo de la experimentación. El pH se dejó igual (7.5) debido a que un pH ácido (por debajo de 7) provocaría que la ruta metabólica se incline hacia la formación de hidrógeno [34] y un pH básico a la inhibición del proceso.

### 7.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* se reactivó usando glucosa como fuente de carbono debido a la afinidad de la levadura por este tipo de compuesto. Posteriormente cada 24 horas se disminuyó la cantidad de glucosa y se aumentó la de glicerol, en cada disminución que se hacía, se preparaban cajas de agar Sabouraud para garantizar que el cultivo se mantuviera puro y evitar la contaminación durante el experimento. Este experimento ayudó a identificar hasta qué punto la levadura podía crecer en un medio en el cual se presenta estrés osmótico.

Del último experimento, de 50 g·L<sup>-1</sup> de glicerol, se inocularon cajas de agar YPG para emplearlas como inóculo en los experimentos consecutivos debido a que ya estaban adaptadas para consumir glicerol como fuente de carbono. Se observó que las cepas que ya estaban adaptadas para consumir glicerol mantenían la morfología de *S. cerevisiae*, pero el tamaño se veía reducido (Figura 15).



**Figura 15.** Morfología *S. cerevisiae* en glucosa (izquierda) y glicerol (derecha)

### 7.3. Crecimiento de los microorganismos en glicerol crudo

#### 7.3.1. Manipulación de glicerol crudo

En el primer intento para determinar la cinética de crecimiento con *E. coli* empleando como sustrato glicerol crudo, se presentó el problema de la formación de una emulsión blanquecina cuando se disminuyó el pH (7.6). Esta emulsión evitaba observar el crecimiento bacteriano (Figura 16). La emulsión del tipo aceite/agua que se generó se podría deber a la presencia de jabones, la cual fue evidenciada por el análisis IR de la muestra (ver apartado 7.1). Esto significa que durante la acidificación, el ácido rompe los enlaces, obteniendo sales y ácidos grasos libres [39]. Para solucionar este inconveniente se decidió adicionar un surfactante para evitar la separación de las fases.



**Figura 16.** Emulsificación del glicerol crudo al acidificar

Se probaron dos surfactantes: Tween 20 y Tween 80. a una concentración de  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , de acuerdo con Saenge et al, 2011 [80] quienes usaron Tween 20 ( $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para romper las emulsiones de glicerol crudo que se les formaban. Sin embargo, al probar dicha concentración la emulsión seguía produciéndose. Posteriormente se decidió probar relaciones mayores, de 1:2 y 1:1 (surfactante: glicerol crudo), encontrando que la relación 1:1 de Tween 20 mantuvo la solución estable, aun después del periodo de esterilización (Figura 17), mientras que con Tween 80, después de la esterilización la emulsión volvía a formarse. La razón de esto es el que HBL (Balance hidrofílico-lipofílico) de Tween 20 es mayor que Tween 80 y se recomienda para emulsiones lechosas.

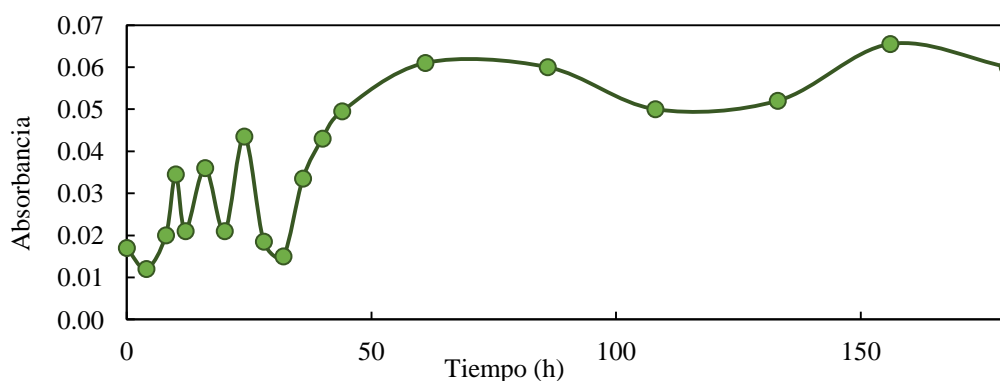


**Figura 17.** Glicerol crudo con Tween 20 después de la esterilización

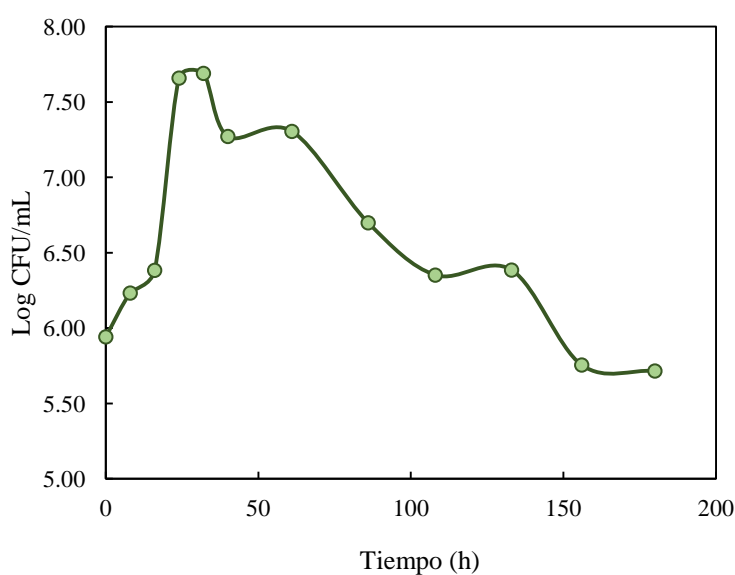
### **7.3.2. Crecimiento de *E. coli* en glicerol crudo adicionado con Tween 20**

En un primer intento para determinar la curva de crecimiento de *E. coli* usando una concentración de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol crudo, se observó un crecimiento lento y las mediciones de absorbancia presentaron una amplia variabilidad. Con este experimento se concluye que, a pesar de las condiciones adversas del medio de cultivo, como la alta concentración de sales, así como de la presencia del surfactante, la bacteria presentó crecimiento. Sin embargo, también fue evidente la presencia de contaminación por la toma de muestra, motivo por el cual para la curva de crecimiento se emplearon tubos BD Vacutainer®, los cuales se encuentran esterilizados y al vacío.

En la segunda cinética de crecimiento se monitoreó tanto el crecimiento celular como la absorbancia para observar si había correlación entre ambas mediciones. Como se puede observar en la Figura 18 la absorbancia medida no coincide con el crecimiento celular (Figura 19) debido que a las 24 horas se presenta el mayor crecimiento celular, mientras que en la absorbancia después de las 32 horas se observa un aumento uniforme, pero después de las 86 horas vuelven a fluctuar las mediciones. Esto se podría deber a la presencia de impurezas que alteran las mediciones, así como del surfactante, el cual precipitaba.



**Figura 18.** Medición de DO del crecimiento de *E. coli* en glicerol crudo adicionado con Tween 20

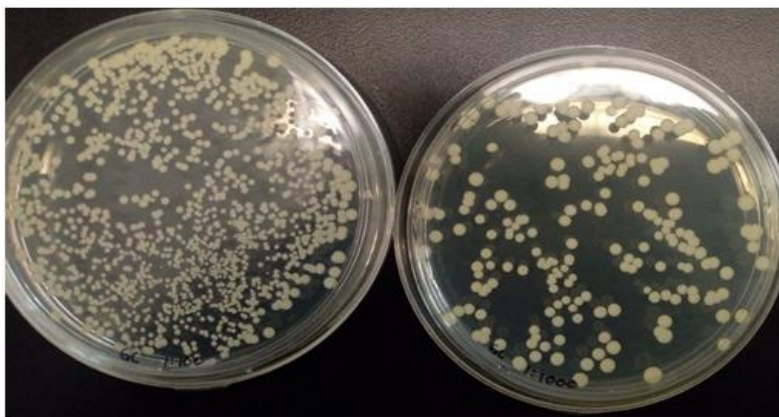


Horas	CFU/mL
0	8.76E+05
8	1.71E+06
16	2.42E+06
24	4.56E+07
40	1.87E+07
61	2.02E+07
86	5.00E+06
108	2.25E+06
133	2.43E+06
156	5.70E+05
180	5.20E+05

**Figura 19.** Crecimiento celular de *E. coli* en glicerol crudo con Tween 20

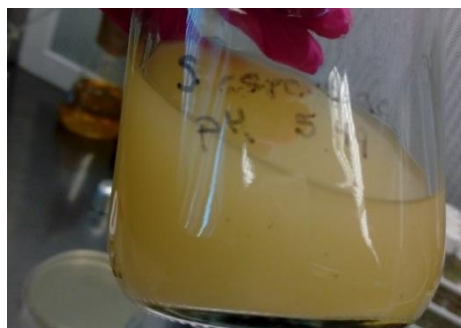
### 7.3.3. Crecimiento de *S. cerevisiae* en glicerol crudo y Tween 20

Para el crecimiento de *S. cerevisiae* en glicerol crudo, se inició con la misma formulación que se usaba para el glicerol puro, sin embargo, al adicionar los reactivos se presentaba la emulsión, motivo por el cual se decidió dejar sólo la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) siendo éste el factor que aporta el nitrógeno necesario para el metabolismo de las células. De igual manera se añadió Tween 20 y se ajustó el pH a 5.5. El resultado fue favorable al presentarse un crecimiento de la levadura (Figura 20), con un crecimiento celular de  $1.86 \times 10^6$  CFU/mL a las 24 horas. Cabe resaltar que no existen reportes del crecimiento de *S. cerevisiae* en glicerol crudo.



**Figura 20.** Crecimiento *S. cerevisiae* en glicerol crudo

Después del proceso de esterilización, en el cultivo en *S. cerevisiae* se siguió presentando la emulsión (Figura 21), motivo por el cual se decidió dar un pretratamiento de purificación al glicerol crudo.



**Figura 21.** Cultivo *S. cerevisiae* después del proceso de esterilización

#### 7.4. Purificación de glicerol crudo

Para disminuir la viscosidad del glicerol crudo primero se diluyó a la concentración deseada y se le adicionó ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente se dejó reposar un día para la separación de fases, pudiendo apreciarse tres fases. En la capa superior se mantuvieron los ácidos grasos libres (AGL), en medio se encontraba el glicerol y en la inferior las sales. Con la adición del ácido se separó la fase insoluble del jabón (Figura 22).



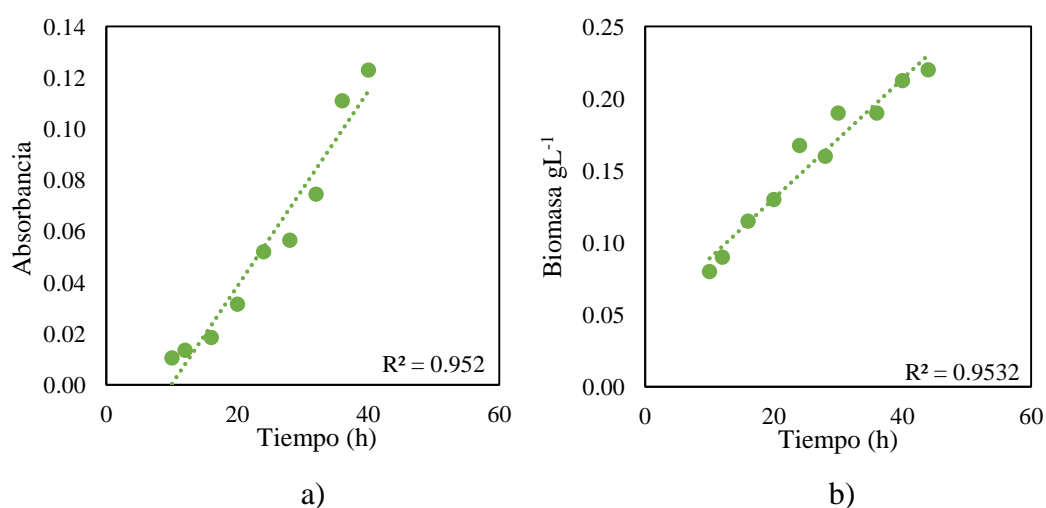
**Figura 22.** Separación de ácidos grasos del glicerol

En la composición de glicerol crudo además de glicerol existe una cantidad importante de jabones. Cuando se emplea hidróxido de potasio como catalizador, se tienen jabones blandos. Los jabones son surfactantes aniónicos, motivo por el cual el glicerol crudo es miscible en agua; sin embargo, al acidificar la solución para conseguir las condiciones adecuadas de crecimiento de la levadura, se forma una emulsión, resultado de la separación de los ácidos grasos libres y la sal correspondiente.

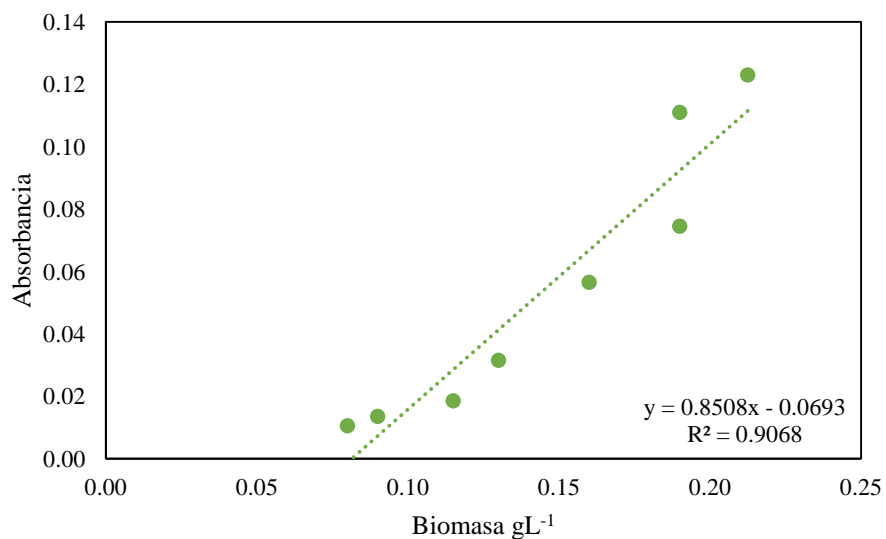
## 7.5. Curva de crecimiento glicerol puro

### 7.5.1. *Escherichia coli*

La curva de crecimiento se mantuvo en la fase exponencial de las ocho a las cuarenta horas, posteriormente la fase estacionaria permaneció hasta las 120 horas. Una vez obteniendo los puntos de biomasa (Figura 23b) y absorbancias (Figura 22a) estos se correlacionan (Figura 24) para tener la curva de crecimiento y poder emplearla durante la fermentación. La ecuación que se presenta en la Figura 20 se usó para los experimentos en microrreactores.



**Figura 23.** Crecimiento óptico y celular de *E. coli*, obtención de la curva de crecimiento glicerol puro

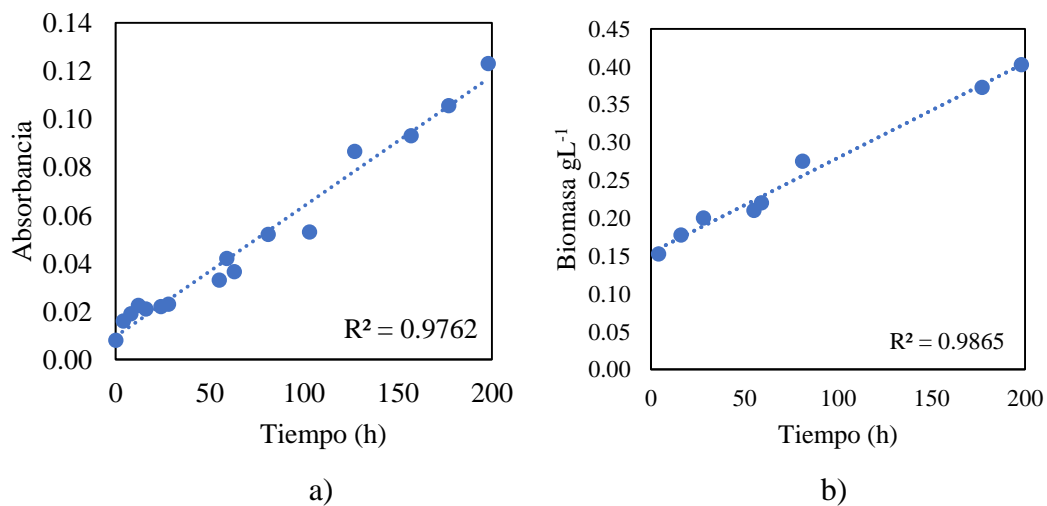


**Figura 24.** Correlación de biomasa y absorbancia

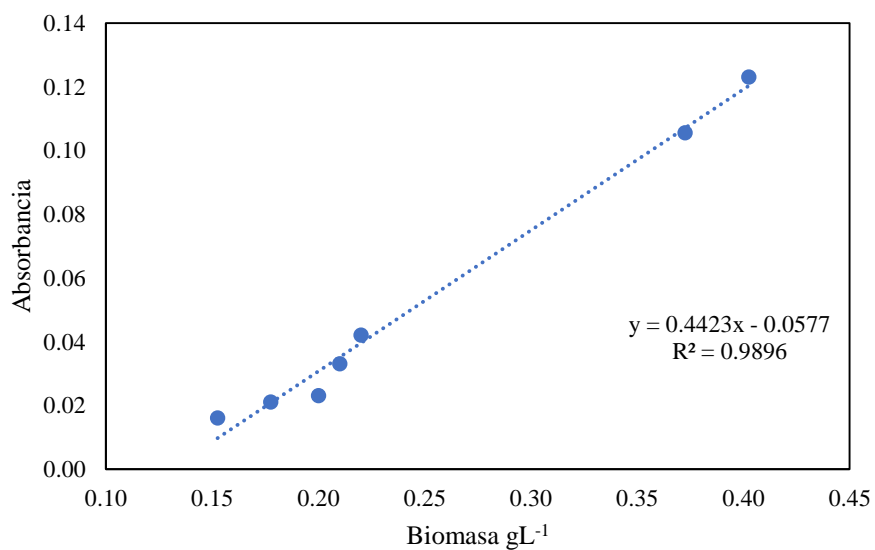


### 7.5.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en *E. coli* las siguientes figuras muestran las correlaciones de biomasa y absorbancia (Figura 26). La fase exponencial siguió a un después de las 198 horas, Figura 25.



**Figura 25.** Crecimiento óptico y celular de *S. cerevisiae* en glicerol puro



**Figura 26.** Curva de crecimiento para *S. cerevisiae* en glicerol puro

## 7.6. Fermentación en microrreactores con glicerol puro

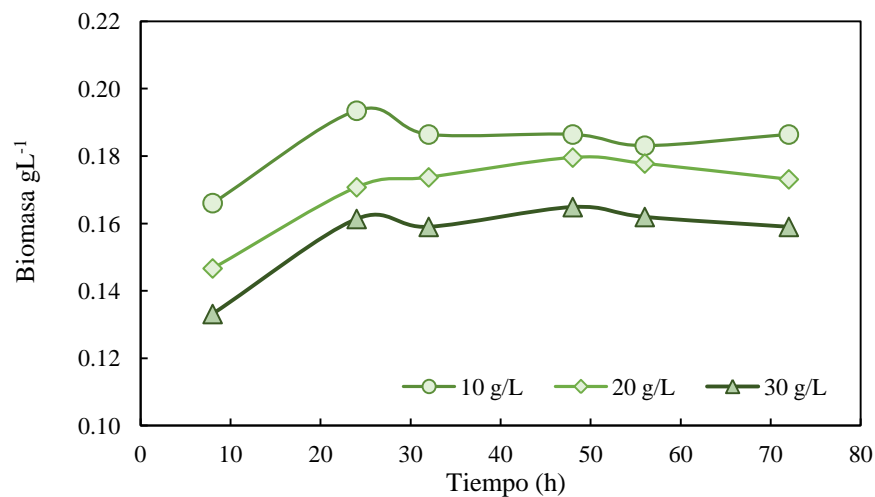
En la siguiente tabla se enlistan los experimentos y las nomenclaturas usadas a partir de este punto.

**Tabla 9.** Nomenclatura de experimentos en microrreactores

Experimento	Nomenclatura
Conc. 10 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>E. coli</i>	C <sub>1</sub> -EP
Conc. 20 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>E. coli</i>	C <sub>2</sub> -EP
Conc. 30 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>E. coli</i>	C <sub>3</sub> -EP
Conc. 10 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>E. coli</i>	C <sub>1</sub> -EC
Conc. 20 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>E. coli</i>	C <sub>2</sub> -EC
Conc. 30 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>E. coli</i>	C <sub>3</sub> -EC
Conc. 10 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>1</sub> -SP
Conc. 20 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>2</sub> -SP
Conc. 30 g·L <sup>-1</sup> glicerol puro <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>3</sub> -SP
Conc. 10 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>1</sub> -SC
Conc. 20 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>2</sub> -SC
Conc. 30 g·L <sup>-1</sup> glicerol crudo <i>S. cerevisiae</i>	C <sub>3</sub> -SC

### 7.6.1. *Escherichia coli*

La mayor cantidad de biomasa se produjo en C<sub>1</sub>-EP con 0.1864 g·L<sup>-1</sup> seguido de C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> con 0.1796 y 0.1649 g·L<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 27). Esta producción máxima se alcanzó a las 32 horas para C<sub>1</sub> y a las 48 h para C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Los valores de biomasa son menores a los que reporta Cofré et al. 2016 [4], de 0.235 g·L<sup>-1</sup>. Otra diferencia es el tiempo de la fase exponencial, en [4] termina a las 80 horas, mientras que en este estudio la fase exponencial termina antes de las 24 horas. De acuerdo con la curva de crecimiento en *E. coli*, la fase exponencial terminaba después de las 40 horas; esperando esta tendencia y de acuerdo con lo reportado, la toma de muestra se hizo cada doce horas para la determinación de la rapidez específica de crecimiento ( $\mu$ ).



**Figura 27.** Producción de biomasa *E. coli* en microrreactores

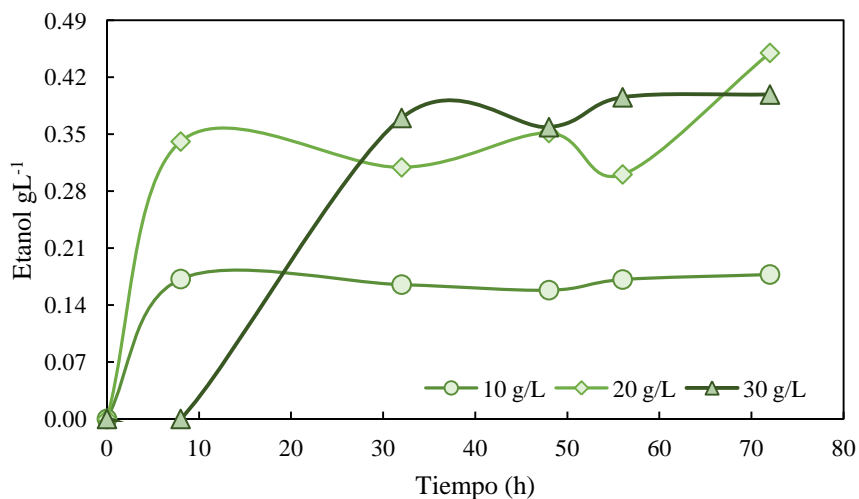
Al finalizar cada experimento se medía el pH de cada reactor (Tabla 10), de los resultados pudo observarse una relación en la producción de biomasa y el pH. Si bien el blanco también sufrió una disminución del valor de pH en los fermentados, cuando hubo mayor presencia de biomasa el pH disminuyó más. El pH inicial de cada experimento fue 7.6.

**Tabla 10.** Cambio de pH después de la fermentación glicerol puro

Experimento	pH Blanco	pH Fermentado
C <sub>1</sub>	7.50	6.97 ±0.059
C <sub>2</sub>	7.50	7.00 ±0.058
C <sub>3</sub>	7.49	7.05 ±0.095

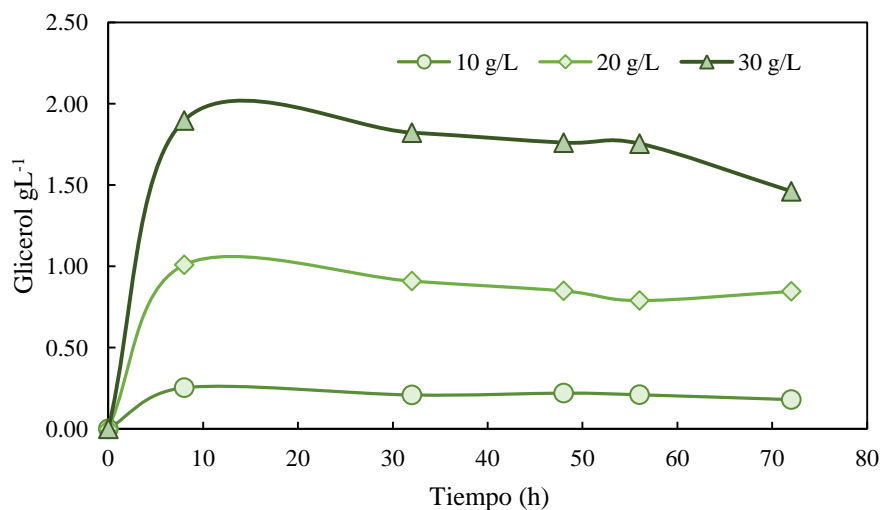
La máxima producción de etanol se presentó en C<sub>2</sub>-EP con 0.45 g·L<sup>-1</sup> (Figura 28). En C<sub>3</sub> no se detectó presencia de etanol hasta las 32 horas con 0.37 g·L<sup>-1</sup> teniendo sólo un incremento de 0.028 para la producción máxima, para C<sub>1</sub> el incremento fue de 0.0056 de un inicio de 0.172 g·L<sup>-1</sup>. Las concentraciones bajas, se podrían deber principalmente a la sobreexpresión (PTA) en la cepa de laboratorio; que como se describió antes (ruta metabólica), este gen había sido suprimido en el estudio de Wong, et al. 2014 [31] para incrementar el rendimiento de etanol de la cepa, ya que direcciona la fuente de carbono para la producción de acetato. La variación de pH también podría estar asociada a la producción de cantidades menores de hidrógeno. C<sub>1</sub>-EP muestra una mayor producción de biomasa y la producción de etanol es mínima, lo cual podría deberse al direccionamiento de la ruta metabólica hacia la respiración celular.

Las concentraciones de etanol están por debajo de lo reportado [4, 5], sin embargo, es comparable con [34] donde la cepa produjo 0.56 g·L<sup>-1</sup> antes de la optimización de la fermentación, que es el caso de esta primera parte del estudio. Posterior a la optimización de las condiciones se produjo etanol hasta 1.45 g·L<sup>-1</sup>[34].



**Figura 28.** Producción de etanol. *E. coli* en microrreactores

El consumo de glicerol aumentó a la par que la concentración de glicerol, teniendo para C<sub>3</sub> un máximo consumo con 1.90 g·L<sup>-1</sup> seguido de C<sub>2</sub> con 1.01 g·L<sup>-1</sup> y C<sub>1</sub> con 0.25 g·L<sup>-1</sup> posteriores a las 8 horas (Figura 29). El consumo de glicerol es muy bajo ya que no se consume ni el 5%, en investigaciones como la de Cofré et al. 2016 [4] se llega a consumir un 65% del glicerol puro y en [5] por arriba del 90%.



**Figura 29.** Consumo de glicerol *E. coli* en microrreactores en glicerol puro

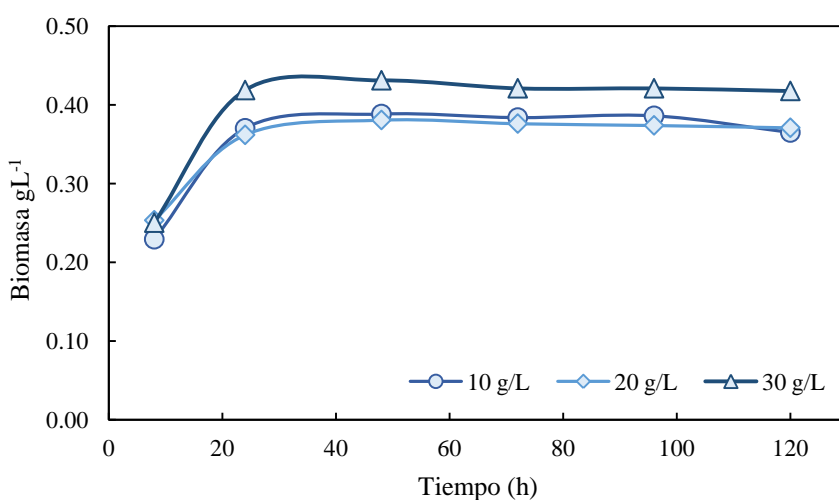
### 7.6.2. *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 ha sido reportada en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos [20]. En la tabla siguiente se muestra la variación de pH durante la fermentación en los microrreactores, donde se aprecia un incremento de los fermentados en comparación con el blanco.

**Tabla 11.** Cambio de pH durante la fermentación de glicerol puro con *S. cerevisiae*.

Experimento	pH Blanco	pH Fermentado
C <sub>1</sub>	5.53	5.64 ± 0.154
C <sub>2</sub>	5.51	5.67 ± 0.006
C <sub>3</sub>	5.50	5.67 ± 0.041

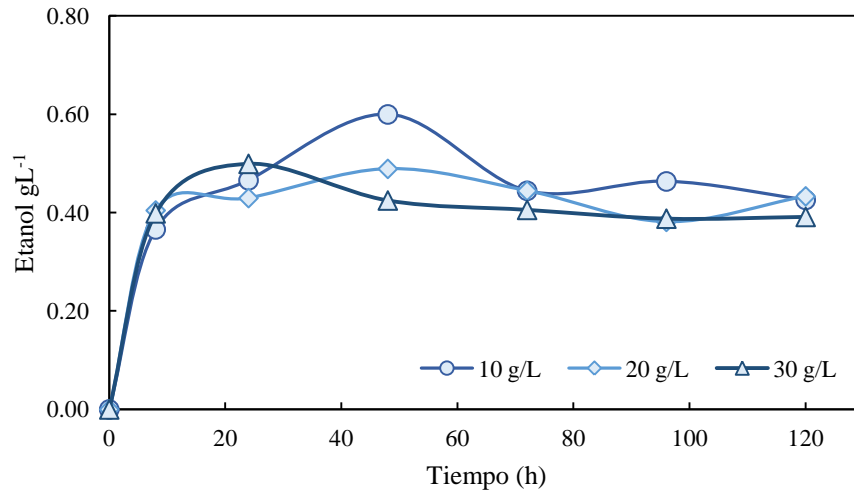
El tiempo de fermentación probado en *S. cerevisiae* fue de 120 horas, al igual que en *E. coli* se tiene un tiempo corto en la fase exponencial. Este dato es importante, ya que en la presente investigación el crecimiento máximo se alcanzó a las 24, contrario a lo reportado en fermentación con levaduras que presentan un crecimiento lento que alcanza la máxima producción de biomasa hasta las 48 horas [62]. Como se puede apreciar en la Figura 30 tanto  $C_1$  y  $C_2$  tienen un comportamiento similar, siendo el experimento  $C_3$  donde se produce la mayor concentración de biomasa de  $0.431 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y en  $C_2$  y  $C_1$  se presentan valores de  $0.381$  y  $0.388 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 30.** Producción de biomas en *S. cerevisiae* microrreactores glicerol puro

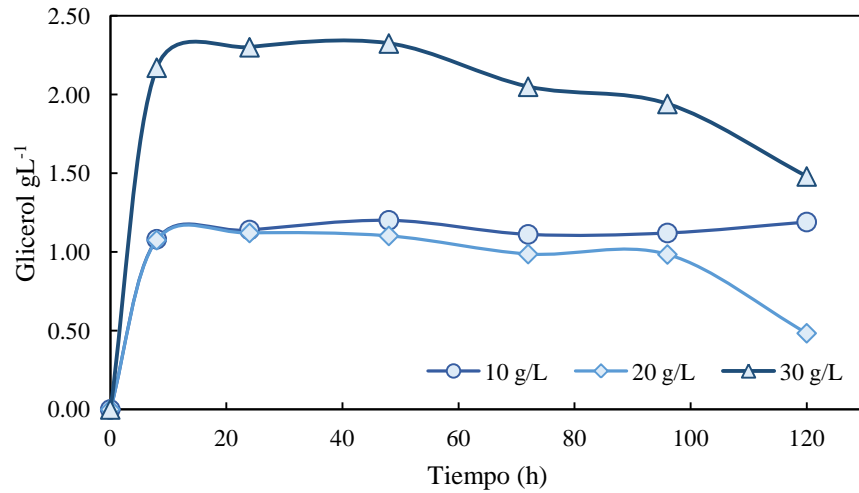
Para  $C_3$  la máxima producción de etanol se presentó a las 24 horas  $0.499 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en  $C_2$  y  $C_1$  se tiene una producción de  $0.489$  y  $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente (Figura 31), siendo este último donde se produjo la mayor cantidad; esto es comparable con lo obtenido por Yu et al. 2010 [61], sin embargo, en dicho reporte, la producción de etanol ( $0.69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se debe a modificaciones genéticas realizadas a la cepa.

En el estudio de Yu et al. 2012 [81] la cepa salvaje llegó a producir  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , lo cual esto se puede comparar con lo obtenido en las fermentaciones  $C_3$  y  $C_2$ .



**Figura 31.** Producción de etanol por *S. cerevisiae*

Se sabe que uno de los metabolitos en la fermentación con levaduras es el glicerol, por ello a las 48 horas hay un punto de quiebre donde, en vez de consumir glicerol, se está produciendo. En  $C_3$  es donde se aprecia mejor este comportamiento, si bien en este experimento se tiene el mayor consumo de glicerol de 2.32 g, también se producen 0.84 g al término de las 120 horas (Figura 32). En  $C_1$  el máximo consumo fue de 1.20 g a las 48 horas, produciendo 0.011 g, teniendo una concentración final de glicerol de  $8.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En este experimento el comportamiento fue más estable ya que la variación fue mínima. En  $C_2$  el consumo neto fue de 0.48 g de glicerol, ya que a las 24 horas se había consumido 1.12 g, pero se produjeron 0.64 g al final de la corrida (120 h), antes de esto sólo se habían producido 0.14 g.



**Figura 32.** Consumo de glicerol en glicerol puro por *S. cerevisiae*

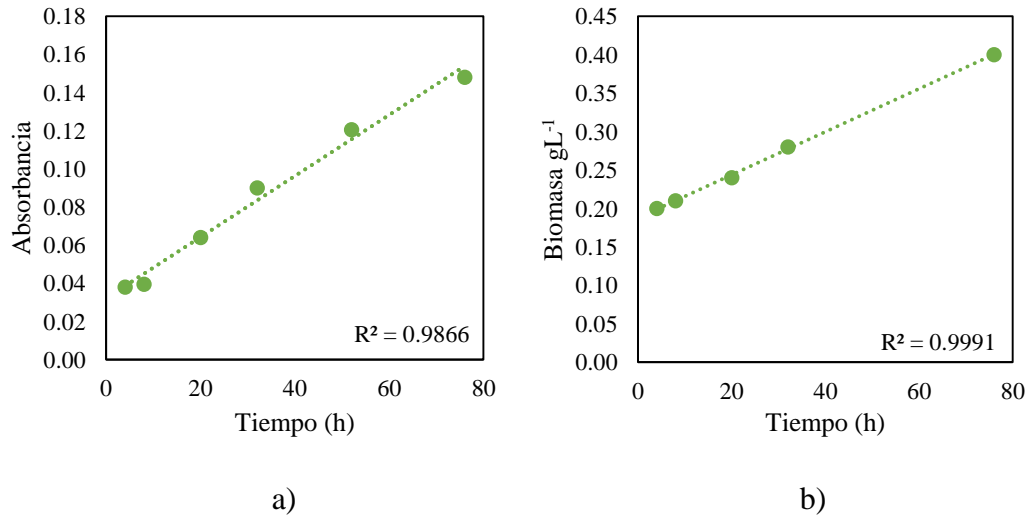
## 7.7. Curva de crecimiento glicerol crudo tratado

Una vez removidas las grasas del glicerol crudo se prosiguió a hacer la curva de crecimiento pertinente. Se considerando que las impurezas remanes tienen un efecto positivo y pueden ser complemento de los nutrientes necesarios que requieren las células para llevar a cabo su metabolismo.

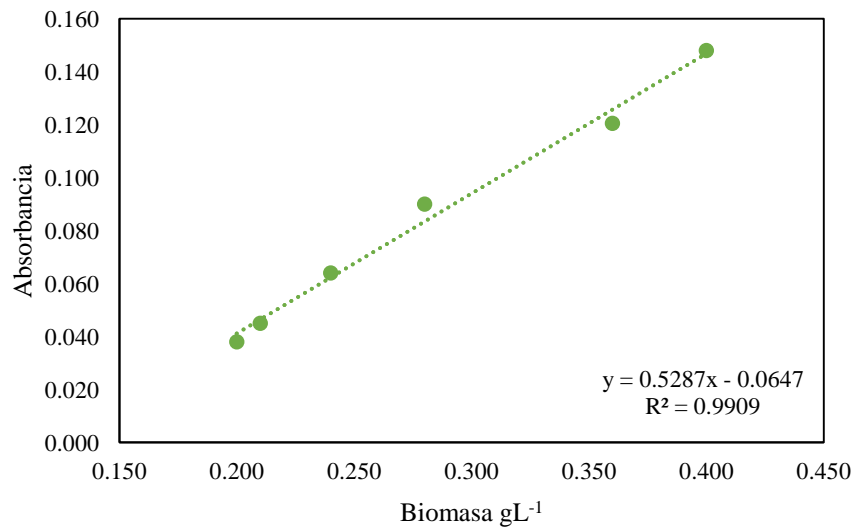
### 7.7.1. *Escherichia coli*

Al igual que en glicerol puro, los datos obtenidos tanto de biomasa como de absorbancia (Figura 33) se usaron para determinar la curva de crecimiento para *E. coli*. Figura 34.





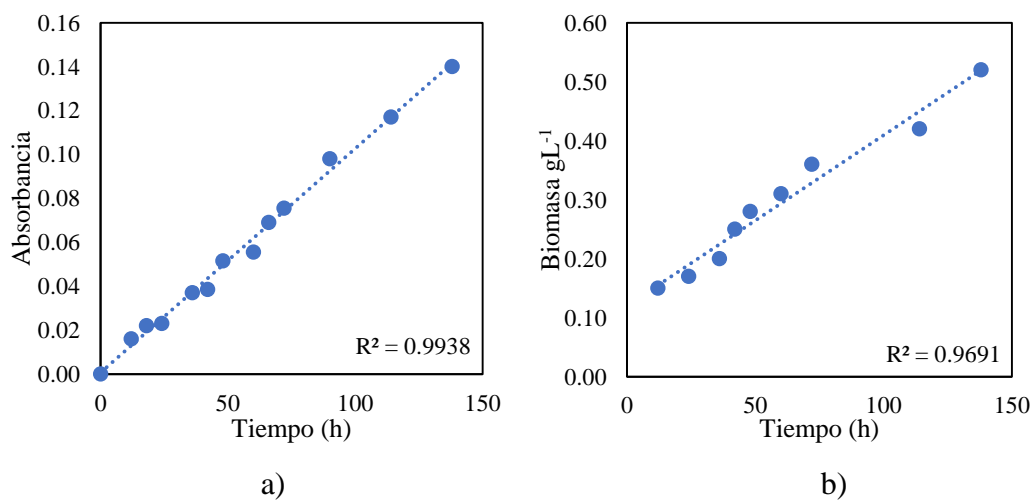
**Figura 33.** Obtención de datos, curva de crecimiento *E. coli* en glicerol crudo tratado. a) absorbancia y b) peso seco de biomasa



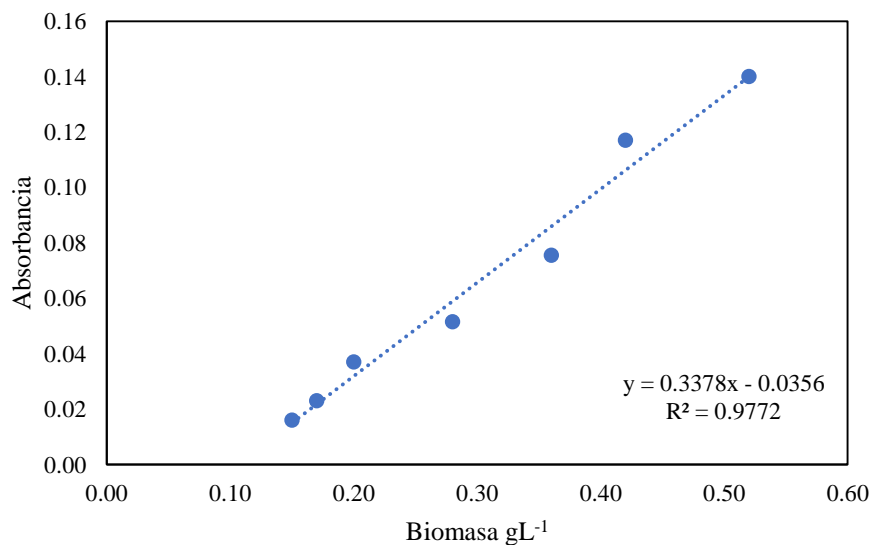
**Figura 34.** Curva de crecimiento de *E. coli* en glicerol crudo tratado

### 7.7.2. *Saccharomyces cerevisiae*

El tiempo que duró la curva de crecimiento para *S. cerevisiae* fue de 138 horas y al igual que en glicerol puro no se llegó a la fase estacionaria, sugiriendo que el proceso es más lento que en *E. coli* (Figuras 35 y 36).



**Figura 35** Crecimiento óptico a) y celular b) para *S. cerevisiae* en glicerol crudo tratado



**Figura 36.** Curva de crecimiento *S. cerevisiae* en glicerol crudo tratado

## 7.8. Fermentaciones en glicerol crudo tratado

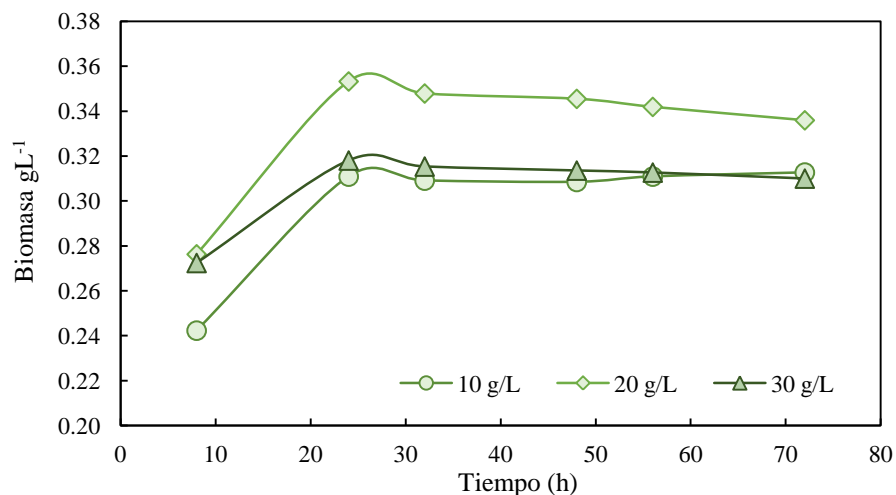
### 7.8.1. *Escherichia coli*

El pH al término de la fermentación para todas las concentraciones terminó en 6.8. Se esperaba que las sales presentes en glicerol crudo tratado tuvieran un efecto tampón [3], sin embargo, en este experimento no se dio el caso. La generación de ácido acético podría responder a la caída de pH en el medio [54].

**Tabla 12.** Variación de pH en glicerol crudo tratado con *E. coli*.

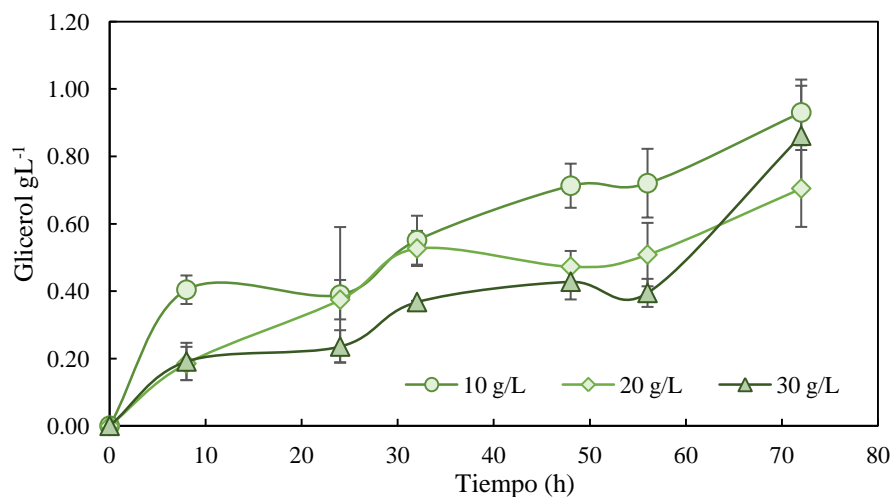
Experimento	pH Blanco	pH Fermentado
C <sub>1</sub>	7.56	6.85 ± 0.077
C <sub>2</sub>	7.54	6.83 ± 0.050
C <sub>3</sub>	7.55	6.87 ± 0.035

El crecimiento de la biomasa, al igual que en el caso de glicerol puro, tuvo una fase exponencial que duró sólo 24 horas después de la inoculación, siendo C<sub>2</sub>-EC donde se produjo una mayor cantidad de biomasa, con  $0.353 \pm 0.015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que en C<sub>3</sub>-EC fue de  $0.3181 \pm 0.012 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 37). En C<sub>1</sub>-EC, en dos de las tres réplicas la fase exponencial finalizó a las 24 horas, sin embargo, la tercera réplica aun después de las 72 horas de la fermentación siguió creciendo, motivo por el cual el valor final de biomasa en dicho experimento fue de  $0.3127 \pm 0.026 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En C<sub>2</sub>-EC posterior a las 56 horas se empezó a notar la fase de muerte, mientras que en C<sub>3</sub>-EC se mantuvo la fase estacionaria.



**Figura 37.** Producción de biomasa por *E. coli* en glicerol crudo tratado

El consumo de glicerol en todos los experimentos mantuvo la tendencia de seguir incrementándose posterior a las 72 horas (Figura 38). Contrariamente en los fermentados con glicerol puro, donde posteriores a las 8 horas el consumo se detuvo. En C<sub>1</sub>-EC el consumo finalizó con 0.93 g de glicerol seguido de C<sub>3</sub>-EC y C<sub>2</sub>-EC, con 0.86 y 0.70 g, respectivamente. Con esto se podría decir que a pesar de estar en fase estacionaria las bacterias seguían consumiendo glicerol.



**Figura 38.** Consumo de glicerol crudo tratado por *E. coli*

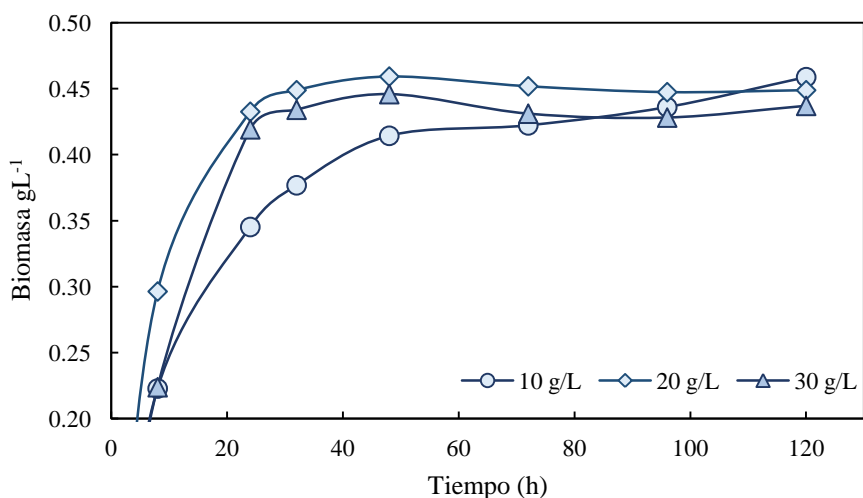
### 7.8.2. *S. cerevisiae*

Contrariamente a *E. coli* en *S. cerevisiae* se presentó un incremento de pH al final de la fermentación y en el caso de C<sub>1</sub>-SC el pH casi llegó a 6 (Tabla 13). El incremento de pH se podría deber a la generación de glicerol en el medio, lo cual está en concordancia con lo observado en la ruta metabólica de esta levadura.

**Tabla 13.** pH fermentación *S. cerevisiae* en glicerol crudo tratado

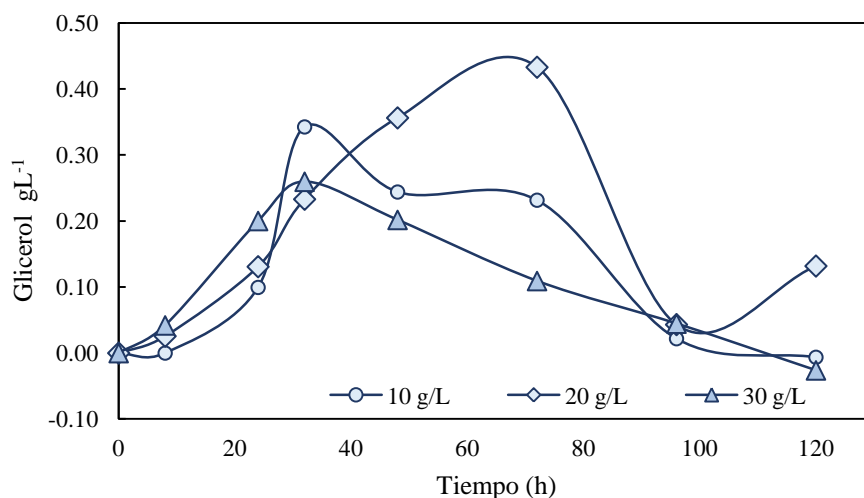
Experimento	pH Blanco	pH Fermentado
C <sub>1</sub>	5.52	5.98 ± 0.090
C <sub>2</sub>	5.51	5.68 ± 0.108
C <sub>3</sub>	5.53	5.57 ± 0.116

Tanto C<sub>1</sub>-SC y C<sub>2</sub>-SC presentaron una máxima producción de biomasa de 0.459 g·L<sup>-1</sup>, la diferencia fue el tiempo, mientras que para C<sub>2</sub>-SC fue a las 48 horas en C<sub>1</sub>-SC fue al finalizar la fermentación a las 120 horas (Figura 39). Mientras que para C<sub>3</sub>-SC, la máxima producción de biomasa fue de 0.446 g·L<sup>-1</sup> a las 48 horas. Tanto en glicerol puro como en el crudo a las 48 horas se entró a la fase estacionaria. En glicerol crudo se tuvo un mayor crecimiento en comparación al crecimiento en glicerol puro, lo cual puede deberse a la presencia de impurezas.



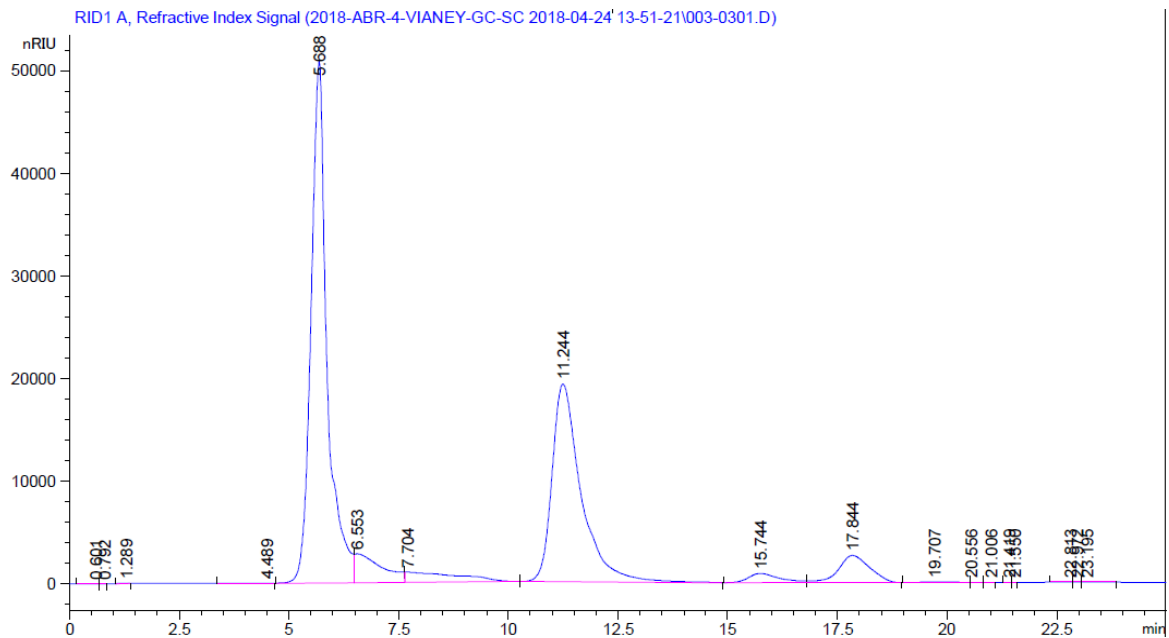
**Figura 39.** Producción de biomasa por *S. cerevisiae* en glicerol crudo

En el caso del consumo de glicerol (Figura 40), éste fue mucho menor en comparación con los fermentados de glicerol puro donde se obtuvieron concentraciones de hasta de 2 g. El consumo máximo de glicerol crudo se presentó en C<sub>2</sub>-SC con 0.43 g seguido de C<sub>1</sub>-SC con 0.34 y por último C<sub>3</sub>-SC con apenas 0.26 g; estos dos últimos experimentos terminaron con concentraciones más altas de glicerol que en un inicio, las condiciones de estrés en los fermentados con glicerol crudo pudieron haber afectado el consumo del sustrato por la levadura.



**Figura 40.** Consumo de glicerol crudo por *S. cerevisiae*

En el análisis por cromatografía, el etanol tiene un tiempo de retención de 18 minutos, en las corridas de glicerol crudo con *S. cerevisiae* se presentó la interferencia de algún compuesto desconocido, el cual aparecía a los 17 minutos con una señal de gran intensidad; por lo que debido a la baja concentración de etanol no fue posible confirmar la presencia de etanol (Figura 41). En los experimentos con *E. coli*, no se presentó tal caso, sin embargo, solo en algunas unidades experimentales se tuvo la presencia de etanol. Por lo tanto, se determinó que *E. coli* en glicerol crudo no produjo etanol bajo las siguientes condiciones: pH 7.6, temperatura de 34 °C.



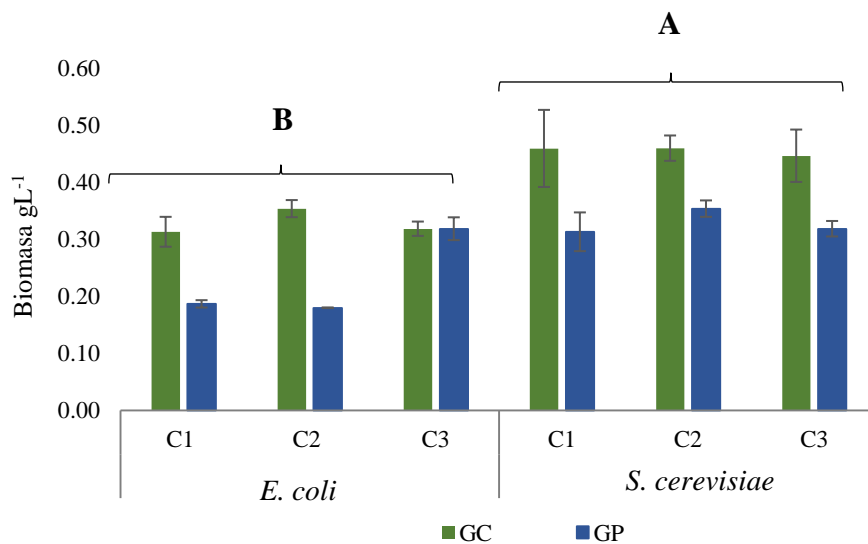
**Figura 41.** Análisis cromatográfico, fermentado con *S. cerevisiae* en glicerol crudo tratado

### 7.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó para evaluar el efecto de los dos microorganismos usados (*S. cerevisiae* y *E. coli*) en la fermentación anaerobia de glicerol puro o crudo para la producción de etanol, como principal metabolito, en tres niveles ( $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_3$ ). Sólo se emplearon los valores máximos de cada determinación: biomasa, etanol y glicerol consumido; los cuales se asumen son las variables dependientes de los factores.

El análisis parte con la hipótesis nula, la cual indica que la media de distintas poblaciones es igual.

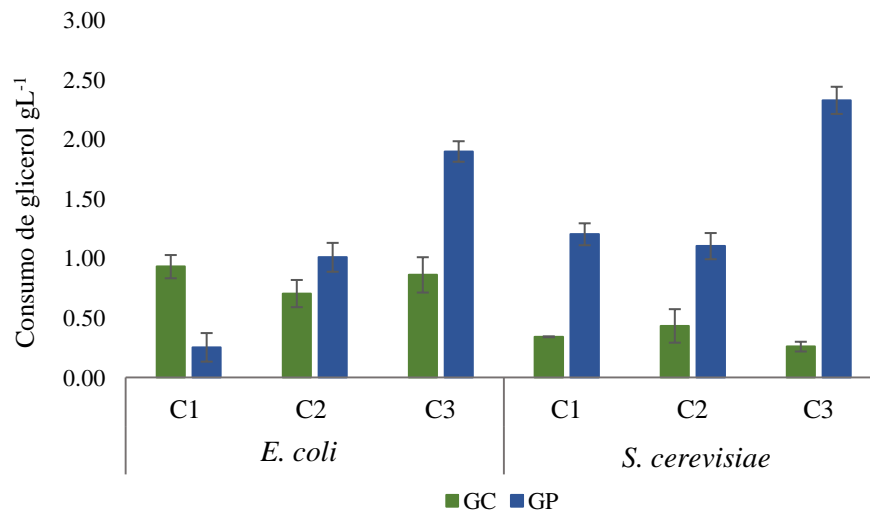
El factor microorganismo tiene un efecto sobre la producción de biomasa, *S. cerevisiae* es significativamente mayor a *E. coli* tanto en las fermentaciones con glicerol crudo como con glicerol puro (Figura 42). El factor sustrato no presenta efecto sobre la fermentación con *E. coli*, ya que no hay diferencias significativas al usar glicerol crudo o puro, contrariamente a *S. cerevisiae*, donde sí hay un efecto, siendo las fermentaciones con glicerol crudo significativamente mayores que con glicerol puro.



**Figura 42.** Efectos sobre la generación de biomasa

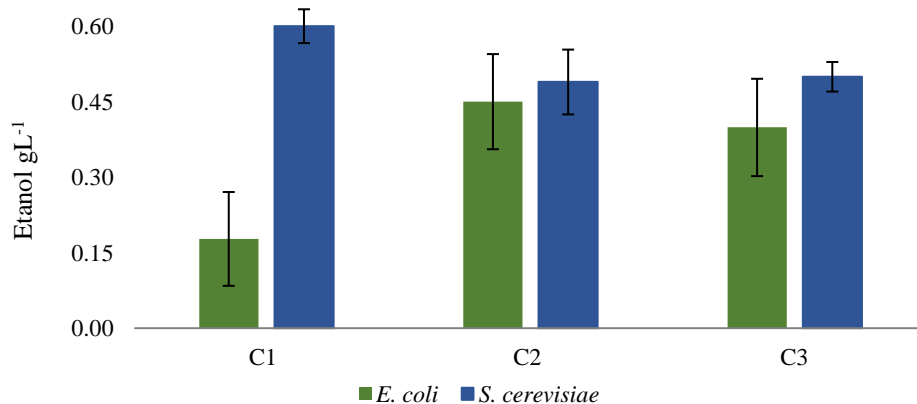
En cuanto al consumo de glicerol (Figura 43), el factor microorganismo sí tiene un efecto sobre éste. En *E. coli* el consumo de glicerol crudo es significativamente mayor que en *S. cerevisiae*, sin embargo, en glicerol puro no hay efecto sobre el consumo de glicerol por los microorganismos. Al igual que en la biomasa el factor sustrato no tiene efecto sobre la fermentación con *E. coli* y no hay diferencias significativas al usar glicerol puro o crudo. Por otro lado, en *S. cerevisiae* sí se presenta un efecto al usar glicerol puro o crudo, la fermentación en glicerol puro el efecto es significativamente mayor que en glicerol crudo.





**Figura 43.** Análisis consumo de glicerol

En *E. coli* no hay diferencias al usar glicerol puro o crudo en la producción de biomasa ni en el consumo de glicerol, esto podría suponer que *E. coli* es tolerante a las impurezas presentes en el glicerol crudo, sobre toda a la concentración de sales, recordando que la formulación de LB-G contiene hasta  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl, lo que pudo haber ayudado a la bacteria desde un inicio. Contrariamente, en *S. cerevisiae* se observa que el glicerol crudo tuvo un efecto negativo en el consumo de glicerol, atribuido posiblemente a la salinidad que resulta en la inhibición de la utilización del glicerol [5]; sin embargo, en la producción de biomasa el efecto fue positivo ya que fue mayor que en glicerol puro, pero no se podría decir que son células viables, ya que en la biomasa también se encuentran las células muertas. A lo que respecta a la producción de etanol en glicerol puro, en esta investigación, no se presentan diferencias significativas al emplear la levadura *S. cerevisiae* o a la bacteria *E. coli* (Figura 44).



**Figura 44.** Análisis producción de etanol

#### 7.10. Determinación de los Parámetros cinéticos en microrreactores

Con los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos, los cuales se resumen en la Tabla 14.

La cepa *S. cerevisiae* ATCC 4126, presentó rendimientos altos en glicerol puro, comparada con *E. coli* K-12 SMG123, siendo esta última la más estudiada para la generación de etanol a partir de glicerol crudo. Contrariamente a lo que se ha mencionado en las investigaciones con *S. cerevisiae*, que indican que esta levadura requiere de modificaciones genéticas para mejorar los rendimientos, en este estudio sólo fue necesaria la adaptación al medio con glicerol.

El rendimiento de biomasa en *S. cerevisiae* obtenido por Klein et al. 2016 [64] de 0.56 g·g<sup>-1</sup>, está por arriba de lo que se obtuvo al trabajar con glicerol puro, por otro lado, los rendimientos con la biomasa en glicerol crudo son mayores, esto podría deberse a que hay presencia de algún otro compuesto que contribuya al crecimiento de la biomasa y no sea el glicerol la única fuente de carbono, ya que como se indicó anteriormente, la levadura después de un tiempo dejó de consumir glicerol y por el contrario lo produjo, por ello también se tienen valores bajos en el consumo de glicerol.

**Tabla 14.** Parámetros cinéticos en microrreactores.

Experimento	[X] Biomasa (g·L <sup>-1</sup> )	[S] <sub>máx.</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	[P] <sub>máx.</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/x</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	d <sub>s/t</sub>
C <sub>1</sub> -EP	0.1864	0.253	0.178	*0.70	0.95	0.74	0.004
C <sub>2</sub> -EP	0.1796	1.008	0.450	0.45	2.51	0.18	0.014
C <sub>3</sub> -EP	0.3181	1.896	0.399	0.21	2.42	0.09	0.026
C <sub>1</sub> -SP	0.3882	1.202	0.600	0.50	1.54	0.32	0.010
C <sub>2</sub> -SP	0.3807	1.102	0.489	0.44	1.28	0.35	0.009
C <sub>3</sub> -SP	0.4312	2.325	0.499	0.21	1.16	0.19	0.019
C <sub>1</sub> -EC	0.3127	0.930	-	-	-	0.34	0.013
C <sub>2</sub> -EC	0.3533	0.704	-	-	-	0.50	0.010
C <sub>3</sub> -EC	0.3181	0.861	-	-	-	0.37	0.012
C <sub>1</sub> -SC	0.4587	0.342	-	-	-	1.34	0.003
C <sub>2</sub> -SC	0.4592	0.433	-	-	-	1.06	0.004
C <sub>3</sub> -SC	0.4459	0.260	-	-	-	1.72	0.002

Para el cálculo de la rapidez específica de crecimiento ( $\mu$ ) se trazó una línea de inicio a fin de la etapa exponencial de cada experimento, sin embargo, como la fase exponencial sólo duró, en algunos casos de 24 a 32 horas, en el caso de *E. coli* se tienen pocos datos, por lo tanto, existe incertidumbre en el valor de  $\mu$  (Tabla 15).

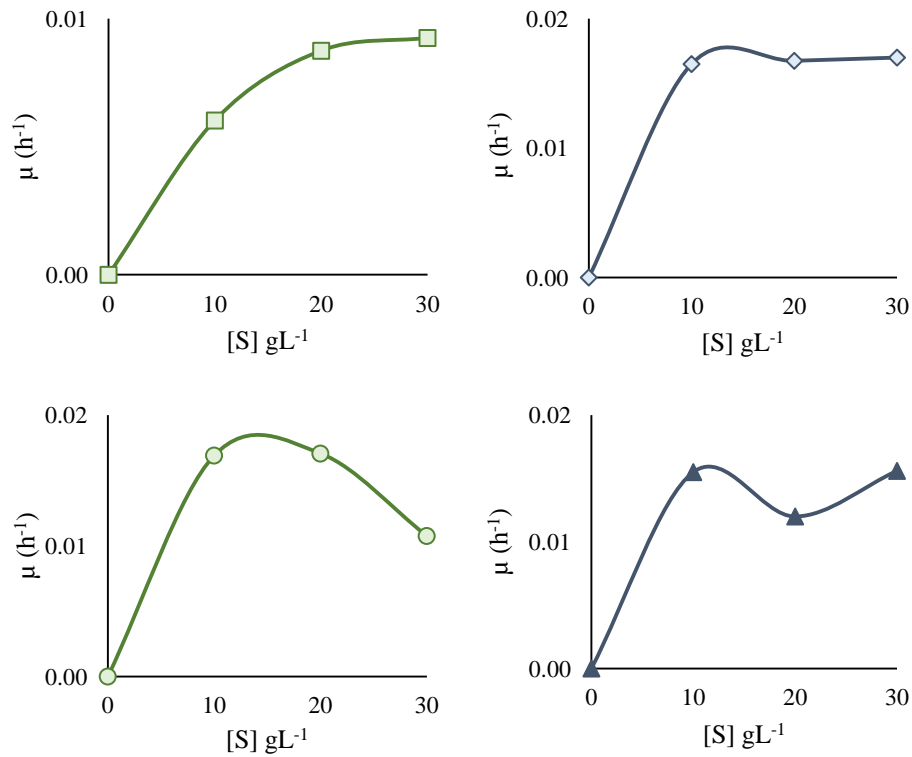
**Tabla 15.** Rapidez específica de crecimiento ( $\mu$ ) en microrreactores (h<sup>-1</sup>).

	<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	GP	GC	GP	GC
C <sub>1</sub>	0.0048	0.0152	0.0132	0.0155
C <sub>2</sub>	0.0070	0.0154	0.0134	0.0120
C <sub>3</sub>	0.0074	0.0097	0.0136	0.0156

Los valores de  $\mu$  para *S. cerevisiae* en glicerol puro se asemejan a lo obtenido por Merico et al. 2011 [65] que al adicionar peptona creció la rapidez de un valor de 0.06 a 0.110 h<sup>-1</sup>, lo cual fue atribuido a la presencia de aminoácidos, que evitan que se genere un exceso de NADH. El adicionar algún suplemento al medio, como peptona o extracto de levadura, ayuda al crecimiento celular. Los valores de  $\mu$  obtenidos de la fermentación de glicerol puro con *E. coli* no son comparables con los obtenidos por Cofré et al. 2016 [4] quien obtuvo un valor de 0.03 h<sup>-1</sup>.

El extracto de levadura tiene elementos como Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, que son cofactores importantes en las vías metabólicas de los microorganismos e influyen en la absorción del sustrato [5], esto podría explicar por qué en glicerol crudo se tiene un rendimiento de biomasa mayor para ambos microorganismos, ya que hay presencia de los elementos que se mencionaron anteriormente, así como de otros compuestos

La rapidez específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) en los experimentos de glicerol crudo no se pudo calcular debido a los valores atípicos obtenidos (Figura 45). Con las gráficas del efecto de la concentración del sustrato con glicerol puro se obtuvo  $\mu_{\text{máx}}$  y la constante de Monod ( $K_s$ ).



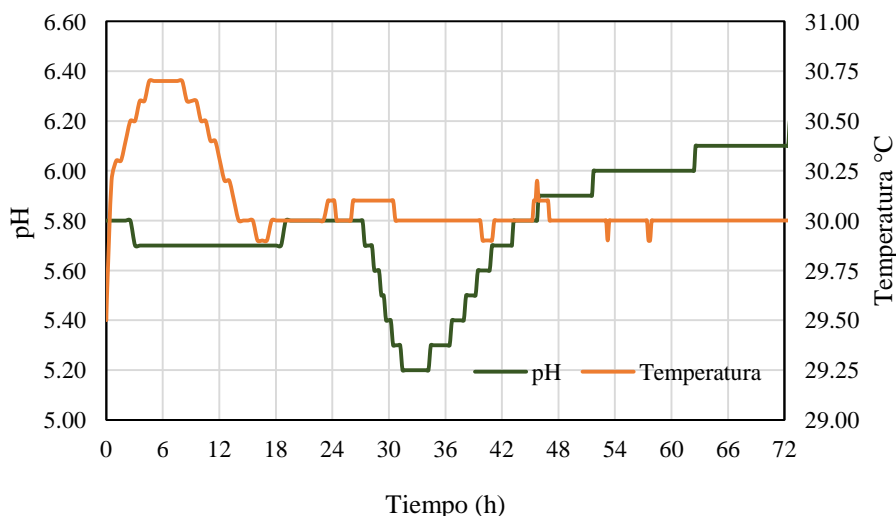
**Figura 45.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la tasa específica de crecimiento. □ *E. coli* GP, ◇ *S. cerevisiae* GP, ○ *E. coli* GC, ▲ *S. cerevisiae* GC

El valor de  $\mu_{\text{máx}}$  para *S. cerevisiae* fue de  $0.014 \text{ h}^{-1}$ . Este valor es comparable con el obtenido en el estudio realizado por Merico et al. 2011 [65] con  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , en esa investigación, el valor de  $\mu_{\text{máx}}$  creció hasta un valor de  $0.19 \text{ h}^{-1}$  posterior a un largo proceso de adaptación de cepas al glicerol en una concentración de  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En *E. coli*  $\mu_{\text{máx}}$  resultó con  $0.011 \text{ h}^{-1}$ . Siendo *S. cerevisiae* ATCC 4126 quien presentó una capacidad mayor que *E. coli* K-12 ATCC SMG123 en la producción de biomasa.

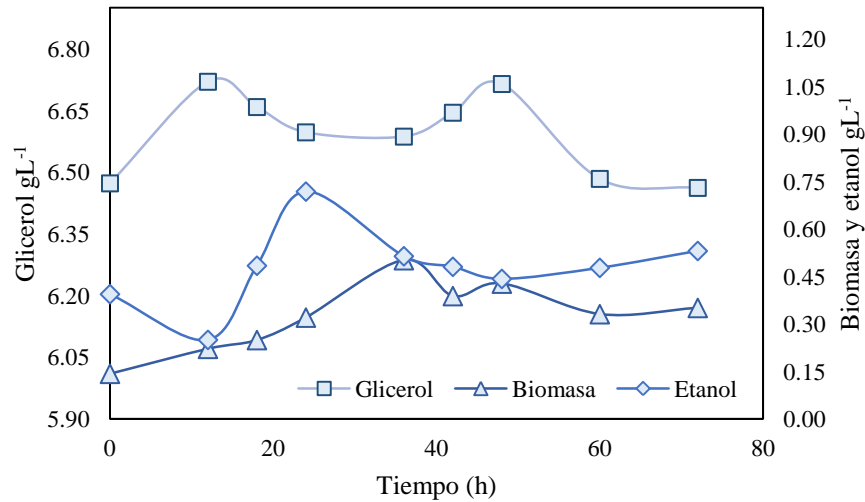
### 7.11. Escalamiento en reactor controlado

Se escogió *S. cerevisiae* para trabajar en el reactor de 7 litros, teniendo la precedencia de que creció en glicerol crudo sin tratar y con Tween 20 (Apartado 7.3.3); además de que presentó mejores rendimientos de producto en glicerol puro. Si bien no se logró garantizar la generación de etanol en glicerol crudo tratado, se percibió un ligero aroma a alcohol en los fermentados.

Durante el proceso de fermentación se estuvo monitoreando el pH, la temperatura y la agitación, esta última se mantuvo constante durante todo el tiempo, mientras que la temperatura no excedió los 31 °C (Figura 46). El pH presentó un incremento de 5.8 posterior a las 27 horas, después descendió hasta 5.2, posteriormente el pH aumentó a 6.4 hasta el término del experimento. Este incremento de pH se puede deber a la contaminación que surgió al muestrear durante el proceso, ya que con el aumento de pH se rompe el escudo que tiene la levadura en contra de los microorganismos oportunistas que se encuentran en el medio ambiente [50]. El olor característico de *S. cerevisiae* ya no se percibía al finalizar el experimento que en esta ocasión duró 72 horas. Todas las variantes (biomasa, glicerol y etanol) fluctuaron durante la fermentación, sin embargo, se presentó producción de etanol a pesar de no haber consumo de glicerol. Contrariamente, las concentraciones de glicerol son mayores al final que al inicio (Figura 47).



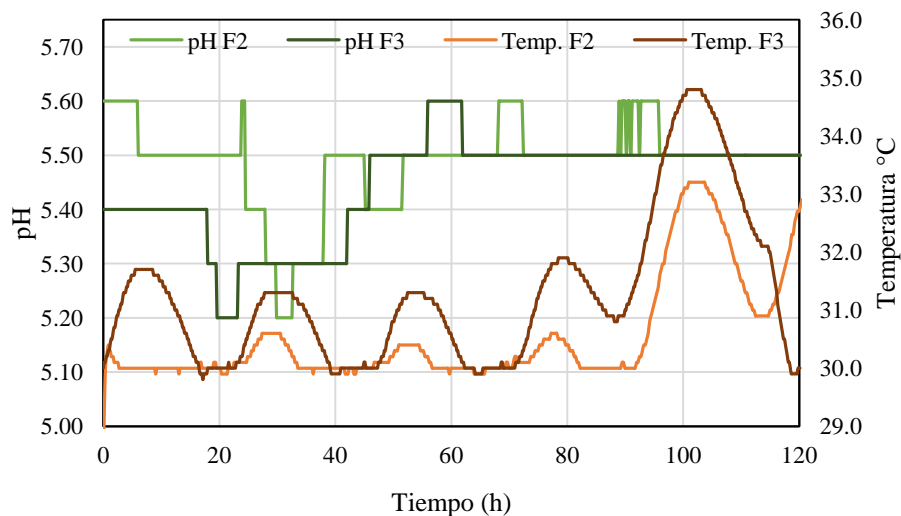
**Figura 46.** Parámetros de control de fermentación de glicerol crudo con *S. cerevisiae*



**Figura 47.** Producción de etanol en glicerol crudo con *S. cerevisiae*

En la segunda réplica el control de pH se llevó a cabo, pero al igual que los demás experimentos el pH sufrió un decremento después de la esterilización, eso debido a las sales presentes en el glicerol crudo. En el primer experimento se observó la generación de una capa en la parte superior del cultivo, la cual no se presentó en el segundo experimento.

En cuestiones operacionales, la temperatura mantuvo fluctuaciones durante el proceso de fermentación, siendo la tercera réplica (F3) la que sobrepasó más a la temperatura de cultivo, siendo la máxima de 35.9 °C, mientras que en la segunda fermentación (F2) fue de 33 °C. El pH siempre se mantuvo por debajo de 5.6. Para evitar la contaminación al muestrear se colocó un filtro de 0.45µm a la salida del puerto, aún a pesar de mantenerlo cerrado (Figura 48).

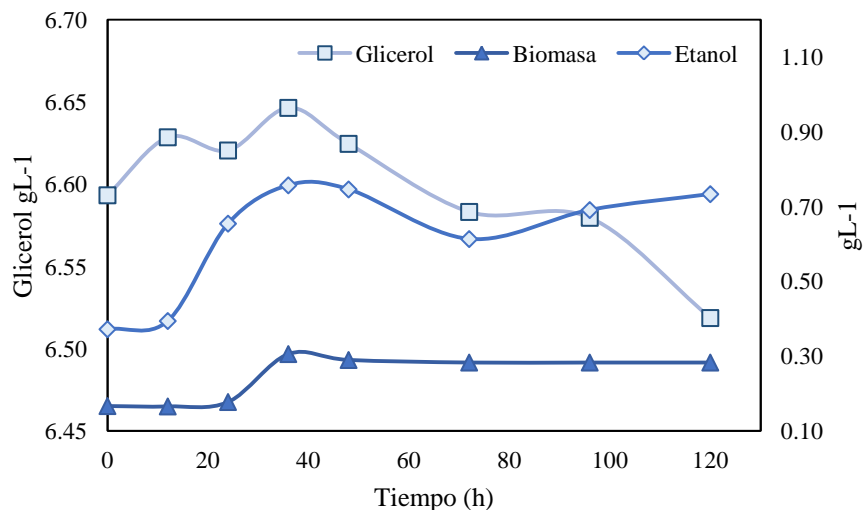


**Figura 48.** Control de pH y temperatura en la fermentación de glicerol crudo por *S. cerevisiae*

En la Figura 49 se observa el comportamiento de producción máxima de etanol ( $0.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de la segunda réplica con un consumo de  $0.07 \text{ g}$  de glicerol. Contrariamente a lo que sucedió en los microrreactores, en donde la concentración incrementó hasta un máximo de  $0.05 \text{ g}$  a las 36 horas y posteriormente a este tiempo la concentración empezó a disminuir. En el reactor de  $7 \text{ L}$ , la máxima producción de biomasa, de  $0.306 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se dio a las 36 horas, que fue el tiempo en que empezó a notarse un declive en el consumo de glicerol y se tuvo la máxima producción de glicerol. El valor de la biomasa es menor a la generada en los microrreactores ( $\text{C}_2\text{-SC}$ ).

El glicerol no es la única fuente de carbono presente en el glicerol crudo y podría ser lo que ocasione que se esté generando etanol y no sea necesariamente el glicerol la principal fuente de carbono. Posiblemente el extracto de levadura también se este empleando como fuente de carbono por la levadura [64]. El glicerol sería una fuente secundaria de carbono, por ello, posterior a las 36 horas se empieza a notar el consumo de glicerol. Otra posible explicación podría darse al estrés, en el que se encuentra la levadura en el medio de glicerol crudo, debido a algún grado de inhibición por la baja concentración celular del inóculo, resultando en una concentración menor de biomasa que su homólogo en los microrreactores.

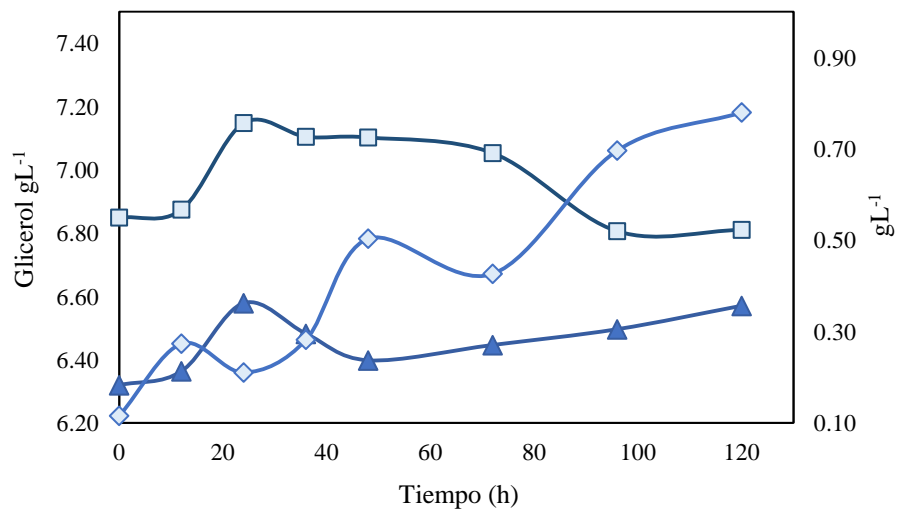




**Figura 49.** Producción de etanol F2 en glicerol crudo por *S. cerevisiae*, glicerol (□), Biomasa (▲), Etanol (◇)

Para tener una mayor concentración celular, se emplearon 3 CFU en el inóculo para F3, sin embargo, el tamaño del inóculo fue de  $7.3 \times 10^6$ , normalmente se sugiere un inóculo de  $1 \times 10^8$  para una fermentación adecuada. En esta réplica si se generó la capa superior que se había presentado en F1 y también se observó la aglomeración en el reactor y una leve precipitación, aún a pesar de estar en agitación.

La biomasa no incrementó mucho en comparación con F2 y se obtuvieron  $0.362 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a las 24 horas y posteriormente se notó un decaimiento y al finalizar el experimento (120 h) la concentración fue de  $0.352 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  con tendencia a seguir incrementando (Figura 50). Este comportamiento también lo presentó la producción de etanol, el cual al final tuvo  $0.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y al igual que en F2 hubo producción de glicerol. Se produjeron 0.26 g teniendo una concentración de  $7.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a las 24 horas donde posteriormente empezó a disminuir finalizando con una concentración de  $6.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; el consumo neto fue de 0.05 g. Esto último sugiere que la levadura mantiene en un balance de consumo de glicerol y sólo lo emplea para mantener regulada la osmosis en la célula [62, 69].



**Figura 50.** Producción de etanol F3 en glicerol crudo por *S. cerevisiae*, glicerol (□), Biomasa (▲), Etanol (◇)-

## 8. CONCLUSIONES

*S. cerevisiae* presentó mejores rendimientos en comparación con *E. coli* en este estudio, sabiendo que la cepa *E. coli* SMG123 tiene cierta mutación con el gen PTA, que podría estar modificando la ruta metabólica y explicaría los bajos rendimientos, en comparación con los obtenidos en literatura. Por otra parte, la adaptación que se le hizo a la levadura podría haber tenido un impacto positivo el haber disminuido gradualmente la glucosa por glicerol, ya que de esa manera la absorción de glicerol por la levadura es mejor, comparada al crecimiento que se presenta cuando la fuente de carbono es glicerol desde el inicio.

Al evaluar a *E. coli* y *S. cerevisiae* para la producción de etanol, no se presentaron diferencias significativas al hacer uso de una levadura o una bacteria en glicerol puro. El consumo de glicerol por *E. coli* fue mayor en glicerol puro que en glicerol crudo tratado, pero en glicerol crudo tratado la tendencia de consumo iba en aumento al paso del tiempo, a diferencia del glicerol puro el cual posteriores a las 8 horas se detuvo el consumo. Por su parte, *S. cerevisiae*, también hubo un consumo mayor en glicerol puro. *S. cerevisiae* generó mayor biomasa que *E. coli* tanto en glicerol crudo como puro, de estos últimos, en glicerol crudo presento una cantidad mayor de biomasa. Con estos resultados se puede concluir que el glicerol crudo tiene efectos positivos en la producción de biomasa, pero negativos en el consumo de glicerol, sobre todo en *S. cerevisiae*.

En el escalamiento a reactor de 7 L con *S. cerevisiae* se logró tener concentraciones de 0.78 y 0.73 g·L<sup>-1</sup> en F3 y F2, respectivamente, con el cual se confirmó la producción de etanol a partir de esta levadura. Las concentraciones bajas podrían aumentar, al optimizar la fermentación. Considerando que se trabajo con cepa del tipo salvaje en condiciones de fermentación reportadas en literatura y no las específicas del microorganismo.

*S. cerevisiae* resultó capaz de fermentar glicerol crudo en condiciones anaerobias, anulando la hipótesis inicial. La cual indicaba que sería *E. coli* quien daría mejores resultados en glicerol crudo.

Esto abre un paso hacia delante para continuar investigando alternativas al glicerol crudo para la producción de productos de valor agregado.

## 9. PERSPECTIVAS

El desarrollo de este proyecto dio una pauta a la posibilidad de usar *S. cerevisiae* en la obtención de productos de valor agregado a partir del glicerol crudo. Si bien la producción de etanol no llega a concentraciones en las que se pueda comercializar, la optimización del proceso específico para *S. cerevisiae* contribuiría al incremento en la concentración de etanol, el cual sería el paso siguiente en esta área de investigación.

Emplear *S. cerevisiae* sería beneficioso por las ventajas descritas en la sección 2.6.2, además de la optimización la investigación de *S. cerevisiae* en glicerol crudo tendría resultados relevantes, ya que hasta el momento no se tienen registros de estudios que empleen a *S. cerevisiae* y mucho menos en fermentaciones con glicerol crudo si tratar.

El pretratamiento desarrollado ofrece ventajas ya que la recuperación de metanol se recircularía al proceso al igual que las grasas sin transesterificar, en este aspecto *S. cerevisiae* tiene otra ventaja en comparación con *E. coli* ya que requiere un pH bajo en el cual de cualquier forma se tendría que separar las grasas si se quisiera llevar a una escala mayor. Considerando que la mayoría de los estudios que se compararon el glicerol crudo o bien ya tenía un pretratamiento en planta o se realizaba durante el experimento

El problema de trabajar con una matriz tan compleja se observó en la cuantificación de etanol en glicerol crudo ya que se presentaron interferencias que impidieron su cuantificación.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. S. Yazdani y R. Gonzalez. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 213-9.
- [2] M. S. Ardi, M. K. Aroua y N. A. Hashim. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 42 (2015) 1164-1173.
- [3] V. L. Pachapur, S. J. Sarma, S. K. Brar, Y. Le Bihan, G. Buelna y M. Verma. Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Renew Energ.* 95 (2016) 542-551.
- [4] O. Cofré, M. Ramírez, J. M. Gómez y D. Cantero. Pilot scale fed-batch fermentation in a closed loop mixed reactor for the biotransformation of crude glycerol into ethanol and hydrogen by *Escherichia coli* MG1655. *Biomass Bioenergy.* 91 (2016) 37-47.
- [5] N. a. A. Adnan, S. N. Suhaimi, S. Abd-Aziz, M. A. Hassan y L.-Y. Phang. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renew Energ.* 66 (2014) 625-633.
- [6] M. Wang, Y. Chen, X. Xia, J. Li y J. Liu. Energy efficiency and environmental performance of bioethanol production from sweet sorghum stem based on life cycle analysis. *Bioresour. Technol.* 163 (2014) 74-81.
- [7] L. T. Phi Trinh, J.-W. Lee y H.-J. Lee. Acidified glycerol pretreatment for enhanced ethanol production from rice straw. *Biomass Bioenergy.* 94 (2016) 39-45.
- [8] M. Ebrahimi, O. B. Villaflores, E. E. Ordoneo y A. R. Caparanga. Effects of acidified aqueous glycerol and glycerol carbonate pretreatment of rice husk on the enzymatic digestibility, structural characteristics, and bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 228 (2017) 264-271.
- [9] F. Cotana, G. Cavalaglio, A. Nicolini, M. Gelosia, V. Coccia, A. Petrozzi y L. Brinchi. Lignin as Co-product of Second Generation Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. *Enrgy Proced.* 45 (2014) 52-60.
- [10] K. A. Jung, S.-R. Lim, Y. Kim y J. M. Park. Opportunity and challenge of seaweed bioethanol based on life cycle CO<sub>2</sub> assessment. *Environ Prog Sustain.* 36 (2017) 200-207.

- [11] J. Baeyens, Q. Kang, L. Appels, R. Dewil, Y. Lv y T. Tan. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*. 47 (2015) 60-88.
- [12] W. Antonio Bizzo, P. C. Lenço, D. J. Carvalho y J. P. S. Veiga. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. *Renew Sust Energ Rev*. 29 (2014) 589-603.
- [13] A. Gupta y J. P. Verma. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 41 (2015) 550-567.
- [14] C. A. García, E. Riegelhaupt, A. Ghilardi, M. Skutsch, J. Islas, F. Manzini y O. Masera. Sustainable bioenergy options for Mexico: GHG mitigation and costs. *Renew Sust Energ Rev*. 43 (2015) 545-552.
- [15] J. A. Rosas-Flores. Elements for the development of public policies in the residential sector of Mexico based in the Energy Reform and the Energy Transition law. *Energy Policy*. 104 (2017) 253-264.
- [16] I. Barrera, M. A. Amezcua-Allieri, L. Estupiñan, T. Martínez y J. Aburto. Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses. *Chem. Eng. Res. Des.* 107 (2016) 91-101.
- [17] A. Elizondo y R. Boyd. Economic impact of ethanol promotion in Mexico: A general equilibrium analysis. *Energy Policy*. 101 (2017) 293-301.
- [18] L. A. Becerra Pérez. La industria del etanol en México. *Economía UNAM*. 6 (2009) 82-98.
- [19] P. E. Murillo-Alvarado, G. Guillén-Gosálbez, J. M. Ponce-Ortega, A. J. Castro-Montoya, M. Serna-González y L. Jiménez. Multi-objective optimization of the supply chain of biofuels from residues of the tequila industry in Mexico. *J Clean Prod*. 108 (2015) 422-441.
- [20] L. J. Rios-Gonzalez, T. K. Morales-Martinez, M. F. Rodriguez-Flores, J. A. Rodriguez-De La Garza, D. Castillo-Quiroz, A. J. Castro-Montoya y A. Martinez. Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresour. Technol*. 242 (2017) 184-190.

- [21] J. L. Sawin, F. Sverrisson, K. Seyboth, R. Adib, H. E. Murdock, C. Lins, I. Edwards, M. Hullin, L. H. Nguyen y S. S. Prillianto. Renewables 2017 Global Status Report. (2013).
- [22] C.-C. Kung, L. Zhang y F. Kong. How government subsidy leads to sustainable bioenergy development. *Technological Forecasting and Social Change*. 112 (2016) 275-284.
- [23] Z. Chen, Z. Zheng, C. Yi, F. Wang, Y. Niu y H. Li. Intracellular metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and promotion of ethanol tolerance during the bioethanol fermentation process. *RSC Advances*. 6 (2016) 105046-105055.
- [24] D. Sarris y S. Papanikolaou. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Eng Life Sci*. 16 (2016) 307-329.
- [25] K. Sundseth, S. Lopez-Aparicio y I. Sundvor. Bioethanol vehicle transport in Oslo as climate policy: what are the social economic costs resulting from acetaldehyde pollution effects? *J Clean Prod*. 108 (2015) 1157-1167.
- [26] B. Zhang y S. M. Sarathy. Lifecycle optimized ethanol-gasoline blends for turbocharged engines. *Appl Energ*. 181 (2016) 38-53.
- [27] J. A. Posada y C. A. Cardona. Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. *Energy*. 35 (2010) 5286-5293.
- [28] H. W. Tan, A. R. Abdul Aziz y M. K. Aroua. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 27 (2013) 118-127.
- [29] A. Singhabhandhu y T. Tezuka. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. *Energy*. 35 (2010) 2493-2504.
- [30] F. Bauer y C. Hulteberg. Is there a future in glycerol as a feedstock in the production of biofuels and biochemicals? *Biofuel Bioprod Bior*. 7 (2013) 43-51.
- [31] M. S. Wong, M. Li, R. W. Black, T. Q. Le, S. Puthli, P. Campbell y D. J. Monticello. Microaerobic conversion of glycerol to ethanol in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. 80 (2014) 3276-3282.
- [32] T. Suzuki, C. Nishikawa, K. Seta, T. Shigeno y T. Nakajima-Kambe. Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *N Biotechnol*. 31 (2014) 246-53.

- [33] Q. He, J. McNutt y J. Yang. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renew Sust Energ Rev.* 71 (2017) 63-76.
- [34] L. P. Thapa, S. J. Lee, H. Y. Yoo, H. S. Choi, C. Park y S. W. Kim. Development of glycerol-utilizing *Escherichia coli* strain for the production of bioethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 53 (2013) 206-15.
- [35] X. Zhang, S. Yan, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli y J. R. Valero. Energy balance of biofuel production from biological conversion of crude glycerol. *J. Environ. Manage.* 170 (2016) 169-76.
- [36] F. Yang, M. A. Hanna y R. Sun. Value-added uses for crude glycerol a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels.* 5 (2012) 1-10.
- [37] C. Sivasankaran, P. K. Ramanujam, S. Shanmugam, K. Govindaraji y J. Mani. Purification and characterization of waste stream glycerol derived from biodiesel industry. *J. Environ. Biol.* 37 (2016) 1529.
- [38] S. K. Athalye, R. A. Garcia y Z. Wen. Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. *J. Agric. Food. Chem.* 57 (2009) 2739-2744.
- [39] A. Chatzifragkou y S. Papanikolaou. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 13-27.
- [40] B. K. Uprety, B. Venkatesagowda y S. K. Rakshit. Current Prospects on Production of Microbial Lipid and Other Value-Added Products Using Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Industries. *Bioenerg Res.* 10 (2017) 1117-1137.
- [41] A. Romaní, H. A. Ruiz, J. A. Teixeira y L. Domingues. Valorization of *Eucalyptus wood* by glycerol-organosolv pretreatment within the biorefinery concept: An integrated and intensified approach. *Renew Energ.* 95 (2016) 1-9.
- [42] A. Ochoa-Estopier, J. Lesage, N. Gorret y S. E. Guillouet. Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 1521-7.



- [43] W.-B. Kong, H. Yang, Y.-T. Cao, H. Song, S.-F. Hua y C.-G. Xia. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Food Technology and Biotechnology*. 51 (2013) 62.
- [44] R. Gupta y K. G. Mukerji, *Microbial Technology*. 2001, A.P.H.
- [45] D. Voet, J. G. Voet y C. W. Pratt, *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. 2007, Médica Panamericana.
- [46] S. N. Suhaimi, L.-Y. Phang, T. Maeda, S. Abd-Aziz, M. Wakisaka, Y. Shirai y M. A. Hassan. Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1. *Braz J Microbiol*. 43 (2012) 506-516.
- [47] S. Shams Yazdani y R. Gonzalez. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng*. 10 (2008) 340-51.
- [48] C. Li, K. Lesnik y H. Liu. Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products. *Energies*. 6 (2013) 4739-4768.
- [49] K. Trchounian, A. Poladyan y A. Trchounian. Optimizing strategy for *Escherichia coli* growth and hydrogen production during glycerol fermentation in batch culture: Effects of some heavy metal ions and their mixtures. *Appl Energ*. 177 (2016) 335-340.
- [50] H. Ishizaki y K. Hasumi, *Ethanol Production from Biomass Chapter 10. Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, San Diego 2014, Elsevier Academic Press Inc. pp. 243-258.
- [51] B. T. Maru, F. López, S. W. M. Kengen, M. Constantí y F. Medina. Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter sp*. *Fuel*. 186 (2016) 375-384.
- [52] A. Valle, G. Cabrera, H. Muhamadali, D. K. Trivedi, N. J. Ratray, R. Goodacre, D. Cantero y J. Bolivar. A systematic analysis of TCA *Escherichia coli* mutants reveals suitable genetic backgrounds for enhanced hydrogen and ethanol production using glycerol as main carbon source. *Biotechnol J*. 10 (2015) 1750-61.
- [53] N. Chaudhary, M. O. Ngadi, B. K. Simpson y L. S. Kassama. Biosynthesis of Ethanol and Hydrogen by Glycerol Fermentation Using; *Escherichia coli*. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 01 (2011) 83-89.

- [54] P. Shah, F. S. Chiu y J. C. Lan. Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol. *J Biosci Bioeng.* 117 (2014) 343-50.
- [55] Z. Chen y D. Liu. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. *Biotechnol Biofuels.* 9 (2016) 205.
- [56] Y. Patil, M. Junghare y N. Muller. Fermentation of glycerol by *Anaerobium acetethylicum* and its potential use in biofuel production. *Microb Biotechnol.* 10 (2017) 203-217.
- [57] T. Hirasawa, Y. Ida, C. Furuasawa y H. Shimizu. Potential of a *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain lacking ethanol and glycerol biosynthesis pathways in efficient anaerobic bioproduction. *Bioengineered.* 5 (2014) 123-8.
- [58] Y. Ida, T. Hirasawa, C. Furusawa y H. Shimizu. Utilization of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain incapable of both ethanol and glycerol biosynthesis for anaerobic bioproduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 4811-4819.
- [59] A. B. Kogje y A. Ghosalkar. Xylitol production by genetically modified industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as co-substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44 (2017) 961-971.
- [60] N. Stepanov y E. Efremenko. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. *N Biotechnol.* 34 (2017) 54-58.
- [61] K. O. Yu, S. W. Kim y S. O. Han. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4157-61.
- [62] K. O. Yu, S. W. Kim y S. O. Han. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *J. Biotechnol.* 150 (2010) 209-14.
- [63] S. Swinnen, M. Klein, M. Carrillo, J. Mcinnes, H. T. T. Nguyen y E. Nevoigt. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnol Biofuels.* 6 (2013) 157.

- [64] M. Klein, Z.-U. Islam, P. B. Knudsen, M. Carrillo, S. Swinnen, M. Workman y E. Nevoigt. The expression of glycerol facilitators from various yeast species improves growth on glycerol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*. 3 (2016) 252-257.
- [65] A. Merico, E. Ragni, S. Galafassi, L. Popolo y C. Compagno. Generation of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high freeze tolerance and an improved ability to grow on glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2011) 1037-44.
- [66] W. He, S. Ye, T. Xue, S. Xu, W. Li, J. Lu, L. Cao, B. Ye y Y. Chen. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol. *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 523-529.
- [67] M. V. Semkiv, K. V. Dmytruk, C. A. Abbas y A. A. Sibirny. Metabolic engineering for high glycerol production by the anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 4403-4416.
- [68] I. Papapetridis, M. Van Dijk, A. J. A. Van Maris y J. T. Pronk. Metabolic engineering strategies for optimizing acetate reduction, ethanol yield and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 10 (2017) 107.
- [69] I. Papapetridis, M. Van Dijk, A. P. Dobbe, B. Metz, J. T. Pronk y A. J. Van Maris. Improving ethanol yield in acetate-reducing *Saccharomyces cerevisiae* by cofactor engineering of 6-phosphogluconate dehydrogenase and deletion of ALD6. *Microb Cell Fact.* 15 (2016) 67.
- [70] A. H. Scragg, *Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*, ed. Limusa, México. 2002.
- [71] R. M. Maier, I. L. Pepper y C. P. Gerba, *Environmental microbiology*. Vol. 397. 2009, Academic press.
- [72] W.-R. Chang, J.-J. Hwang y W. Wu. Environmental impact and sustainability study on biofuels for transportation applications. *Renew Sust Energ Rev.* 67 (2017) 277-288.
- [73] SENER. *Prospectiva de Energías Renovables 2016-2030*. Secretaría de Energía. 2016

- [74] C. E. Oshoma, D. Greetham, E. J. Louis, K. A. Smart, T. G. Phister, C. Powell y C. Du. Screening of Non- *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Tolerance to Formic Acid in Bioethanol Fermentation. PLoS One. 10 (2015) e0135626.
- [75] O. Cofré, M. Ramírez, J. M. Gómez y D. Cantero. Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. Biomass Bioenergy. 37 (2012) 275-281.
- [76] D. Muhammad, W. M. Muhammad, F. Mahpara y R. Umer. Response Surface Methodology based Optimized Purification of the Residual Glycerol from Biodiesel Production Process. Chiang Mai J. Sci. 43 (2016) 1-13.
- [77] N. F. Nasir, M. F. Mirus y M. Ismail. Purification of crude glycerol from transesterification reaction of palm oil using direct method and multistep method. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 243 (2017) 012015
- [78] A. J. Ferrero, I. M. Rosa y E. Veneciano, en: Libro de Actas IV Jornadas de Ciencia y Tecnología para Alumnos 2010, Proceso de purificación de la glicerina obtenida del biodiesel a pequeña escala, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María, Argentina, 2010, pp. 1-7.
- [79] F. L. Aguzín, G. A. Bedogni, N. B. Okulik y C. L. Padró, en: VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química, Purificación de glicerol crudo y sus usos en catálisis, Buenos Aires Argentina 2015, pp. 1-12.
- [80] C. Saenge, B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge y T. Bourtoom. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochem. 46 (2011) 210-218.
- [81] K. O. Yu, J. Jung, A. B. Ramzi, S. H. Choe, S. W. Kim, C. Park y S. O. Han. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. Enzyme Microb. Technol. 51 (2012) 237-43.