

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INGENIERÍA QUÍMICA**



TRABAJO FINAL DE GRADO

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA
PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO
COMO SUSTRATO GLICEROL DE BODIESEL EN
REACTOR AIR-LIFT**

LUIS ESTEBAN VÁZQUEZ VILLALBA

San Lorenzo – Paraguay – Marzo – 2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INGENIERÍA QUÍMICA**



**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA
PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO
COMO SUSTRATO GLICEROL DE BIODIESEL EN
REACTOR AIR-LIFT**

LUIS ESTEBAN VÁZQUEZ VILLALBA

ORIENTADOR

Prof. Ing. Quím. **JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ, PhD.**

CO-ORIENTADORA

Prof. Ing. Quím. **KAREN PATRICIA MARTÍNEZ JARA**

Trabajo de grado presentado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

San Lorenzo – Paraguay – Marzo – 2022

Vázquez Villalba, Luis Esteban

Producción de biomasa de levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* utilizando como sustrato glicerol de biodiesel en reactor air-lift. / Luis Esteban Vázquez Villalba. - - San Lorenzo: El Autor, 2022.

XV, 97 p.: fig.; 30 cm.

Trabajo de grado presentado a la Facultad de Ciencias Químicas - UNA para optar al Título de Ingeniero Químico.

1. GLICEROL DE BIODIESEL. 2. SACCHAROMYCES BOULARDII.

I. Título.

CDD: 665

V393p



Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Químicas

LA PROF. ING. QUÍM. MARÍA ANTONELLA ELIZUR, MSc., COORDINADORA DE TRABAJO DE GRADO DE LA CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

CERTIFICA: Que el presente documento, titulado “**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO COMO SUSTRATO GLICEROL DE BODIESEL EN REACTOR AIR-LIFT**”, constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta el estudiante **LUIS ESTEBAN VÁZQUEZ VILLALBA** para aspirar al Título Universitario de Ingeniero Químico bajo la dirección de los profesores **PROF. ING. QUÍM. JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ, DSc.** y **PROF. ING. QUÍM. KAREN PATRICIA MARTÍNEZ JARA.**

Considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 25 días del mes de marzo de 2022.

Prof. Ing. Quím. María Antonella Elizaur, MSc.



Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Químicas

EL PROF. ING QUÍM. JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ, DSc., DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN, Y **LA PROF. ING. QUÍM. KAREN PATRICIA MARTÍNEZ JARA**, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

CERTIFICAN: Que el presente documento, titulado “**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO COMO SUSTRATO GLICEROL DE BIODIESEL EN REACTOR AIR-LIFT**”, constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta el estudiante **LUIS ESTEBAN VÁZQUEZ VILLALBA** para optar al Título Universitario de Ingeniero Químico, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 25 días del mes de marzo del 2022.

Prof. Ing. Quím. Juan Daniel Rivaldi, DSc

Prof. Ing. Quím. Karen Martínez



Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Químicas

El trabajo titulado “**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO COMO SUSTRATO GLICEROL DE BIODIESEL EN REACTOR AIR-LIFT**”, presentado por Luis Esteban Vázquez Villalba, en cumplimiento de los requisitos para optar al Título de Ingeniero Químico, fue evaluado y aprobado con calificación ____ (_____) por el Tribunal Examinador conformado por:

Presidente:

- Prof. Ing. Quím. MARIO SMIDT, Mg. FCQ-UNA

Miembros

- Prof. Ing. Quím. LAURA CORREA, MSc. FCQ-UNA
- Prof. Ing. Alim. FÁTIMA DÍAZ, MSc. FCQ-UNA

Según consta en el Acta N° _____ De fecha _____

*Dedicado este trabajo a mis padres, Noemi y Alberto,
pilares de mi vida.*

A mis hermanos Gabriela e Ivan.

*A mi abuela Antonia,
a quien siempre recuerdo con cariño.*

*A mi abuela Catalina y mis padrinos Gladys y Carlos,
que estarán por siempre en mi corazón.*

Agradecimientos

A Dios, por darme las fuerzas y fe para seguir adelante.

A mis padres y hermanos, por acompañarme en todos estos años de estudio y darme ánimos en todo momento, ayudándome a salir adelante, mostrándome que todo sacrificio tiene su recompensa, siendo los pilares de mi vida.

A mis amigos y compañeros, con los que compartí tantos momentos que me llenaron de alegría y fuerzas cuando más lo necesitaba.

A mis compañeras de laboratorio, por el apoyo, colaboración y las risas durante la elaboración de la tesis.

A mi tutor, Prof. Juan Daniel Rivaldi por toda la ayuda y apoyo durante este trabajo, por su orientación y los conocimientos dados.

Al Departamento de Aplicaciones Industriales, por el espacio y los recursos para la elaboración de la investigación.

A la Itaipu Binacional por la ayuda financiera durante toda la carrera.

Al Programa Universitario de Becas para la Investigación “Andrés Borgognon Montero” (PUBIABM) y Ganadera 13 de Mayo S.A por el apoyo económico significativo para llevar a cabo la tesis de grado.

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO COMO SUSTRATO GLICEROL DE BODIESEL EN REACTOR AIR-LIFT

Autor Luis Esteban Vázquez Villalba¹

Tutor Juan Daniel Rivaldi Chavez²; Co-Tutora Karen Patricia Martínez Jara²

¹Estudiante de la Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

²Docente investigador del Departamento de Aplicaciones Industriales, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

El glicerol es el principal subproducto del proceso de transesterificación de triglicéridos con alcohol para la obtención de biodiesel, representando el 10% (p/p) del total del biocombustible producido. A pesar de su bajo valor de mercado, el glicerol crudo contiene impurezas que limitan su utilización en la industria química, requiriendo operaciones de elevado costo para su purificación. En este sentido, pequeñas industrias del sector acumulan o descartan este producto al ambiente, afectando su equilibrio. Una alternativa para su aprovechamiento consiste en su uso como sustrato alternativo para la obtención de biomasa de microorganismos y bioproductos de interés comercial, como probióticos. En este trabajo, glicerol crudo, de concentración inicial de 430 g/L, fue sometido a pretratamiento con H₃PO₄ (85%, p/p) hasta pH 2 para remoción de jabones, ácidos grasos libres y otras impurezas, obteniendo glicerol de 610 g/L. Posteriormente, fue evaluada la capacidad de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en medio formulado con glicerol tratado en un reactor tipo air-lift de 500 mL, y se evaluó la influencia de la concentración inicial de glicerol tratado (20, 60 y 100 g/L) y la aireación (0,5, 1,0 y 1,5 vvm) en la producción de biomasa. Alícuotas fueron obtenidas en intervalos regulares por un periodo máximo de 30 h. La máxima producción de biomasa (8,13 g/L) fue alcanzada a las 30 h, en medio conteniendo la menor concentración de glicerol y aireación de 1,0 vvm, con una productividad volumétrica (Q_p) de 0,59 g/L.h y factor de conversión ($Y_{x/s}$) de 0,49 g biomasa/g glicerol. Los resultados revelan que el glicerol de biodiesel representa un sustrato potencial para la producción de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Palabras-claves: glicerol de biodiesel, *Saccharomyces boulardii*, biomasa, reactor air-lift.

**BIOMASS PRODUCTION OF PROBIOTIC YEAST
Saccharomyces boulardii USING GLYCEROL FROM BIODIESEL AS A
SUBSTRATE IN AN AIR-LIFT REACTOR**

Author Luis Esteban Vázquez Villalba¹

Advisor Juan Daniel Rivaldi Chavez²; Co-Advisor Karen Patricia Martínez Jara²

¹Student of the Chemical Engineering Degree, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción

²Research professor of the Department of Industrial Applications, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción

SUMMARY

Glycerol is the main by-product of the transesterification process of triglycerides with alcohol to obtain biodiesel, representing 10% (w/w) of the total biofuel produced. Despite its low market value, crude glycerol contains impurities that limit its use in the chemical industry, requiring high-cost operations for its purification. In this sense, small industries in the sector accumulate or discard this product into the environment, affecting its balance. An alternative for its use consists of its use as an alternative substrate for obtaining biomass of microorganisms and bioproducts of commercial interest, such as probiotics. In this work, crude glycerol, with an initial concentration of 430 g/L, was subjected to pretreatment with H₃PO₄ (85%, w/w) up to pH 2 to remove soaps, free fatty acids and other impurities, obtaining 610 g glycerol /L. Subsequently, the growth capacity of *Saccharomyces boulardii* was evaluated in a medium formulated with glycerol treated in a 500 mL air-lift type reactor, and the influence of the initial concentration of treated glycerol (20, 60 and 100 g/L) was evaluated. and aeration (0,5, 1,0 and 1,5 vvm) in biomass production. Aliquots were obtained at regular intervals for a maximum period of 30 h. The maximum biomass production (8,13 g/L) was reached at 30 h, in the medium containing the lowest concentration of glycerol and aeration of 1,0 vvm, with a volumetric productivity (Q_P) of 0,59 g/Lh. and conversion factor ($Y_{X/S}$) of 0,49 g biomass/g glycerol. The results reveal that biodiesel glycerol represents a potential substrate for the production of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*.

Key words: biodiesel glycerol, *Saccharomyces boulardii*, biomass, air-lift reactor.

ÍNDICE

	Pág.
1. CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	3
1.1. Objetivos	5
1.1.1. Objetivo general:	5
1.1.2. Objetivos específicos:.....	5
2. CAPÍTULO II - REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
2.1. Generalidades del glicerol	6
2.2. Purificación del glicerol	9
2.3. Usos del glicerol	10
2.4. Asimilación del glicerol	11
2.5. Microorganismos probióticos	12
2.6. <i>Saccharomyces boulardii</i>	13
2.7. Reactores air-lift	15
2.8. Antecedentes.....	16
3. CAPÍTULO III - MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	19
3.1. Materia prima.....	19
3.1.1. Sustrato.....	19
3.1.2. Microorganismo	19
3.2. Tratamiento del glicerol.....	19
3.3. Preparación de inóculo	20
3.4. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento en reactor air-lift .	20
3.5. Métodos analíticos.....	23
3.5.1. Determinación de concentración celular	23
3.5.2. Determinación de concentración de glicerol	23

3.5.3. Análisis de Resultados	23
4. CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Tratamiento del glicerol crudo.....	26
4.2. Evaluación de las condiciones de crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> en glicerol.....	28
4.3. Análisis estadístico	34
4.4. Optimización.....	51
4.5. Velocidad específica de crecimiento máxima y tiempo de generación.....	52
5. CAPÍTULO V - CONCLUSIONES.....	55
6. CAPÍTULO VI - SUGERENCIAS	56
ANEXOS.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del glicerol a 20° C.	7
Tabla 2. Composición de varias muestras de glicerol crudo.....	9
Tabla 3. Niveles de las variables del proceso de cultivo.	22
Tabla 4. Matriz experimental del diseño central compuesto 2 ² con tres réplicas en el punto central.....	22
Tabla 5. Valores resultantes de concentración celular y concentración de sustrato en los ensayos realizados.....	31
Tabla 6. Parámetros bioquímicos medidos en los distintos ensayos.	33
Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos con la literatura.....	33
Tabla 8. Análisis de varianza de los factores estudiados en la producción de biomasa probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i>	34
Tabla 9. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la producción de biomasa posterior a la selección de los términos significativos.	37
Tabla 10. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i>	39
Tabla 11. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa posterior a la selección de los términos significativos.	41
Tabla 12. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente al factor de conversión de la levadura <i>Saccharomyces boulardii</i>	43
Tabla 13. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente factor de conversión de la levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> posterior a la selección de los términos significativos.....	45
Tabla 14. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato.....	47

Tabla 15. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato posterior a la selección de los términos significativos.	49
Tabla 16. Velocidad específica de crecimiento máxima y tiempo de generación para los distintos ensayos.....	52
Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos para μ_{max} con la literatura.	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura molecular del glicerol.	6
Figura 2. Reacción de transesterificación de triglicéridos.....	8
Figura 3. Reactor air-lift y sus componentes	15
Figura 4. Estructura de los air-lift	16
Figura 5. Sistema de cultivo.....	21
Figura 6. Separación de glicerol después del tratamiento con ácido fosfórico.....	27
Figura 7. Glicerol crudo y glicerol tratado.....	27
Figura 8. Curvas de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo.....	30
Figura 9. Superficie de respuesta correspondiente a la biomasa producida en función de las variables independientes.....	35
Figura 10. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la producción de biomasa	36
Figura 11. Superficie de respuesta correspondiente a la producción de biomasa en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos	38
Figura 12. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la producción de biomasa posterior a la selección de los términos significativos.....	38
Figura 13. Superficie de respuesta para la productividad volumétrica de biomasa en función de las variables independientes.....	40
Figura 14. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la productividad volumétrica de biomasa	40
Figura 15. Superficie de respuesta correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos	42

Figura 16. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la productividad volumétrica de biomasa en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos	42
Figura 17. Superficie de respuesta correspondiente al factor de conversión en función de las variables independientes.....	44
Figura 18. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para el factor de conversión de biomasa.....	44
Figura 19. Superficie de respuesta correspondiente al factor de conversión en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos	46
Figura 20. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para el factor de conversión de biomasa posterior a la selección de los términos significativos	46
Figura 21. Superficie de respuesta correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato en función de las variables independientes	48
Figura 22. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la velocidad volumétrica de consumo de sustrato	48
Figura 23. Superficie de respuesta correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos.....	50
Figura 24. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos	50
Figura 25. Velocidad específica de crecimiento máxima y tiempo de generación para los diferentes ensayos.	53

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Figura A1. Vías del metabolismo del glicerol.	57
Figura B1. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 1.....	58
Tabla B1. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 1).	58
Figura B2. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 2.....	59
Tabla B2. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 2).	59
Figura B3. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 3.....	60
Tabla B3. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 3).	60
Figura B4. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 4.....	61
Tabla B4. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 4).	61
Figura B5. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 5.....	62
Tabla B5. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 5).	62
Figura B6. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 6.....	63
Tabla B6. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 6).	63
Figura B7. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharoyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 7.....	64

Tabla B7. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 7).	64
Figura B8. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 8.....	65
Tabla B8. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 8).	65
Figura B9. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 9.....	66
Tabla B9. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 9).	66
Figura B10. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 10.....	67
Tabla B10. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 10).	67
Figura B11. Curva de crecimiento celular de <i>Saccharomyces boulardii</i> y concentración de glicerol en función del tiempo para el ensayo 11.....	68
Tabla B11. Resultados de los análisis del cultivo de levadura <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 11).	68
Figura C1. Preparación de medio en el reactor air-lift.	69
Figura C2. Reactor luego de 30 h de cultivo.	69
Figura C3. Reactor en funcionamiento.....	69

Capítulo I

1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles, en particular el petróleo, constituye la fuente de energía principal que impulsa el desarrollo del planeta. Se estimó una demanda promedio de 91 millones de barriles diarios en 2020, con aumento del 4% previsto para 2026 (IEA, 2021), encaminándose al agotamiento de esta fuente energética en un mediano plazo, generando un impacto en la economía a nivel mundial, elevando el precio de los mismos a cantidades mayores a los últimos años (Morrow, 2021).

Además, la situación alarmante del medio ambiente y los problemas para la salud que ocasiona la emisión de gases de efecto invernadero provenientes de estos combustibles (Lelieveld et al., 2019; Martins et al., 2019), ha llevado a distintos países al desarrollo de nuevas fuentes de energía que puedan reemplazarlos gradualmente, buscando que estas cumplan con las exigencias de rendimiento y al mismo tiempo con las reglamentaciones medioambientales que regulan el uso de los mismos (Abas et al., 2015; Casóla et al., 2018).

Entre las fuentes de energía alternas se encuentra el biodiesel, que en los últimos años su producción en aumento, reportándose 48.800 millones de litros producidos en el 2020, 1% más con respecto al año anterior, siendo Indonesia el país productor de la mayor cantidad (17% de la producción mundial), superando a Estados Unidos (14,4%) y Brasil (12,7%) (REN21, 2021).

Este biocombustible al ser quemado produce 78% menos de CO₂, además de menor cantidad de partículas (Mishra et al., 2018), presentando una gran ventaja medioambiental en comparación a los combustibles fósiles. Países como Brasil, Argentina, Paraguay, entre otros, exigen que los combustibles distribuidos posean un pequeño porcentaje de biodiesel, promoviendo el uso de los mismos, con el fin de resolver las problemáticas energéticas, ambientales y socioeconómicas.

El biodiesel es obtenido por transesterificación de aceites vegetales o grasa animal, y alcohol (metanol o etanol) en presencia de catalizadores básicos o ácidos, siendo el glicerol el principal sub-producto del proceso (Melero et al., 2012). Este glicerol crudo es un compuesto con innumerables aplicaciones industriales y posee precio de

mercado bajo por el elevado volumen ofertado, entre 0,04 y 0,33 \$/kg (Anitha et al., 2016; Mota et al., 2017).

Debido a la presencia de agua, sales, ésteres, alcohol y aceite residual, el glicerol crudo debe ser sometido a tratamientos de purificación a fin de obtener glicerol de grado técnico (pureza > 99%) que pueda ser utilizado como materia prima para la producción de compuestos de interés industrial. No obstante, la purificación del glicerol para uso farmacéutico y alimenticio requiere de operaciones unitarias de costo estructural y energético elevados (Ardi et al., 2015), que inviabilizan la inversión a pequeñas y medianas industrias que operan en Paraguay.

Consecuentemente, debido al exceso y acumulación de glicerol en el mercado, existe el riesgo de que una fracción sea descartada directamente al ambiente llevando a la misma problemática que se desea evitar. Es por ello que actualmente se buscan la manera de utilizar el glicerol crudo para la obtención de compuestos de mayor valor agregado como, por ejemplo, probióticos como suplemento alimenticio de animales, que constituyen una alternativa potencialmente factible de aplicación en nuestro país, siendo una opción interesante y económica.

Los probióticos son organismos que, cuando son administrados en cantidades específicas, promueven el bienestar y estimulan el sistema inmunológico del hospedero (FAO, 2013). En rumiantes (vacunos, ovinos, caprinos) y no rumiantes (equinos, porcinos), estos organismos tienen efectos positivos sobre la producción de carne (Suárez-machín et al., 2017; Castillo Baron, 2016), al tiempo de constituir una alternativa a uso excesivo de antibióticos (Hossain et al., 2017; Mingmongkolchai et al., 2018).

Entre los probióticos destacados por sus efectos benéficos para la salud tanto humana como animal se encuentran las levaduras como la *Saccharomyces boulardii*, microorganismo muy estudiado en los últimos años sobre todo por su potencial como alternativa al uso antibióticos y su capacidad de evitar y controlar malestares intestinales provocada por estos (Feizizadeh et al., 2014; Moré, 2015; Manafi et al., 2018; Lee et al., 2019).

Estos microorganismos son capaces de asimilar glicerol y otros compuestos orgánicos como substrato (Gaboardi et al., 2018; de Paula et al., 2019; Du, 2012).

No obstante, no hay información sobre las condiciones y características de crecimiento de esta levadura en glicerol descritas en la literatura científica. Establecer procesos que permitan el uso de sustrato de bajo costo para la producción de probióticos podría ser atractivo como oportunidad de negocio.

Dentro del costo para la producción de microorganismos probióticos también se debe de considerar al reactor a ser utilizado. El reactor de tipo air-lift, en comparación al reactor común de pistón, presenta características ideales para el crecimiento de microorganismos, como un sistema de recirculación de aire que permite una mayor transferencia de masa con menor consumo de energía (Guieysse et al., 2011).

Una variable de operación dentro del reactor es el caudal de aire, por lo que conocer la condición de aireación óptima para la producción de microorganismos es de vital importancia a la hora de trabajar con ellos, para lograr procesos más eficientes y con menor costo energético.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de glicerol crudo, la necesidad de buscar estrategias para su aprovechamiento y los beneficios del uso de levaduras probióticas, en este trabajo se evaluará la producción de biomasa de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* utilizando glicerol de biodiesel como sustrato de cultivo, evaluando principalmente, la influencia de la concentración de glicerol y la aeración en reactor air-lift para la maximización de la producción de biomasa celular.

1.1. Justificación

En los últimos años se ha observado un aumento considerable en el volumen de producción de biodiesel Latinoamérica, principalmente gracias a la aplicación de políticas de obligatoriedad de la adición de este al diésel común y búsqueda de fuentes de energía alterna (FAO, 2013), con el fin de resolver la problemática energética, ambiental y socioeconómica.

De acuerdo con la Cámara Paraguaya de Biodiesel, el volumen de producción de biodiesel en Paraguay en 2020 fue de 28.470.704 litros, con previsión de aumento en función del reciente Decreto 3500/20 que reglamenta la Ley No. 6389/19 "Que establece el régimen de promoción para la elaboración sostenible y utilización

obligatoria del biocombustible apto para utilización en motores diésel”, que prevé la adición de hasta 5%. Actualmente la adición obligatoria en Paraguay alcanza 2% ¹.

El glicerol es uno de los principales subproductos de la producción de biodiesel, donde se obtiene 10 kg por cada 100 kg del biocombustible mencionado (Melero et al., 2012). Como la producción anual de biodiesel va en aumento, también incrementa la cantidad de glicerol, convirtiéndose esto en un obstáculo, amenazando los beneficios ambientales de reemplazar los combustibles fósiles con recursos renovables.

Este subproducto se descartaría directamente al ambiente y se acumularía, afectando el equilibrio ecológico de suelos y recursos hídricos, sobre todo por las impurezas presentes en este (Aguilar et al., 2016). Por este motivo, es fundamental la búsqueda de alternativas para utilización de este subproducto con miras a su valorización, garantizando la sostenibilidad de su producción, teniendo en cuenta su gran potencial para aplicaciones industriales.

Como también en Paraguay la producción de biodiesel va en aumento, según los datos de la Cámara Paraguaya de Biodiesel, en unos años la cantidad de glicerol se acumularía en el ambiente, ya que no hay informes que indiquen el aprovechamiento del mismo a nivel país. Es por ello que en este trabajo se evaluará el uso de este subproducto como sustrato para la obtención de levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, con el fin de encontrar un uso que sea factible, con procesos económicos de purificación del glicerol, dando a este un valor agregado.

¹ Información suministrada por el Ingeniero Marcelo dos Santos, Secretario General de la Cámara Paraguaya de Biodiesel.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general:

Evaluar el potencial del glicerol proveniente de la fabricación de biodiesel como sustrato para el cultivo de levadura probiótica.

1.1.2. Objetivos específicos:

- Analizar el crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* en glicerol químicamente tratado en reactor air-lift.
- Determinar la influencia de las variables concentración del glicerol y flujo de aire sobre los parámetros bioquímicos producción de biomasa, productividad volumétrica en biomasa, factor de conversión de glicerol a biomasa, velocidad volumétrica de consumo de sustrato, velocidad específica de crecimiento máxima y tiempo de generación, mediante la aplicación de un diseño experimental.
- Determinar la máxima productividad volumétrica de biomasa por medio de una optimización numérica por el método de la función de deseabilidad.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Generalidades del glicerol

Glicerol ($C_3H_8O_3$) es la denominación común para el compuesto orgánico 1,2,3-propanotriol (Figura 1), aislado por primera vez por Carl W. Scheele en Suecia en 1779 mediante la destilación del líquido dulce sobrenadante obtenido al calentar aceite de oliva con PbO y agua. Componente principal de los triglicéridos y se puede encontrar en grasas animales, aceites vegetales o materias primas petroquímicas, obteniéndose como subproducto de la producción de biodiesel o jabón (Salimon et al., 2012).

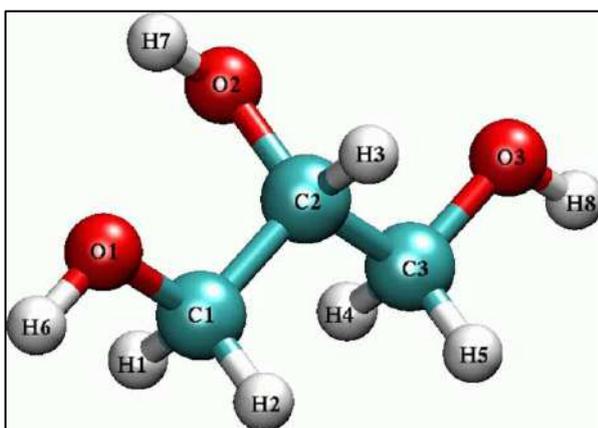


Figura 1. Estructura molecular del glicerol (Blieck et al., 2005).

En su estado puro el glicerol es un líquido viscoso, inodoro, incoloro, de sabor dulce, no tóxico, soluble en agua, higroscópico y con un punto de ebullición de $290^{\circ} C$ (Quispe et al. 2013). Su pH es neutro, no presenta inconvenientes a la hora de almacenar y transportar debido a su estabilidad química bajo condiciones normales y su nivel de toxicidad con el medio ambiente es muy bajo (Aguilar et al., 2016). En la Tabla 1 se pueden observar otras propiedades fisicoquímicas del glicerol.

Al glicerol también se lo llama comúnmente “glicerina”, esto es aplicado a productos comerciales purificados que contienen más del 95% de glicerol. Este puede ser clasificado en tres tipos, dependiendo principalmente del grado de pureza: glicerol crudo, glicerol purificado/refinado y glicerol sintetizado comercialmente, con

porcentajes de peso entre 60-80%, 99,1-99,8% y 99,2-99,8% respectivamente (Quispe et al., 2013).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del glicerol a 20° C (Quispe et al., 2013).

Propiedades	Valor
Masa molar	92,09382 g/mol
Densidad	1,261 g/cm ³
Viscosidad	1,5 Pa.s
Punto de fusión	18,2° C
Punto de ebullición	290° C
Punto de inflamación	160° C
Calor específico	2,386 J/kg.°C
Tensión superficial	64,00 mN/m

El glicerol crudo es aquel obtenido como subproducto del biodiesel producido por transesterificación. Esta reacción se lleva a cabo cuando triglicéridos presentes en grasas animales o aceites vegetales reaccionan con un alcohol, generalmente metanol o etanol, en presencia de un catalizador, los cuales pueden ser básicos como KOH o NaOH, o ácidos como el ácido clorhídrico, sulfúrico o sulfónico, obteniendo tres moléculas de biodiesel y una de glicerol como productos (Figura 2). Se estima una relación de 1 kg de glicerol por cada 10 kg de biodiesel producido (Melero et al., 2012).

En la transesterificación ocurren tres reacciones, formándose di y monoglicéridos como productos intermedios. Estequiométricamente hablando, esta reacción está dada por tres moles de alcohol por cada mol de triglicéridos, pero generalmente es necesario utilizar un exceso del alcohol para que la reacción se lleve a cabo y con esto aumentar el rendimiento, siendo un exceso del 100% el utilizado en las industrias (Bharathiraja et al., 2014).

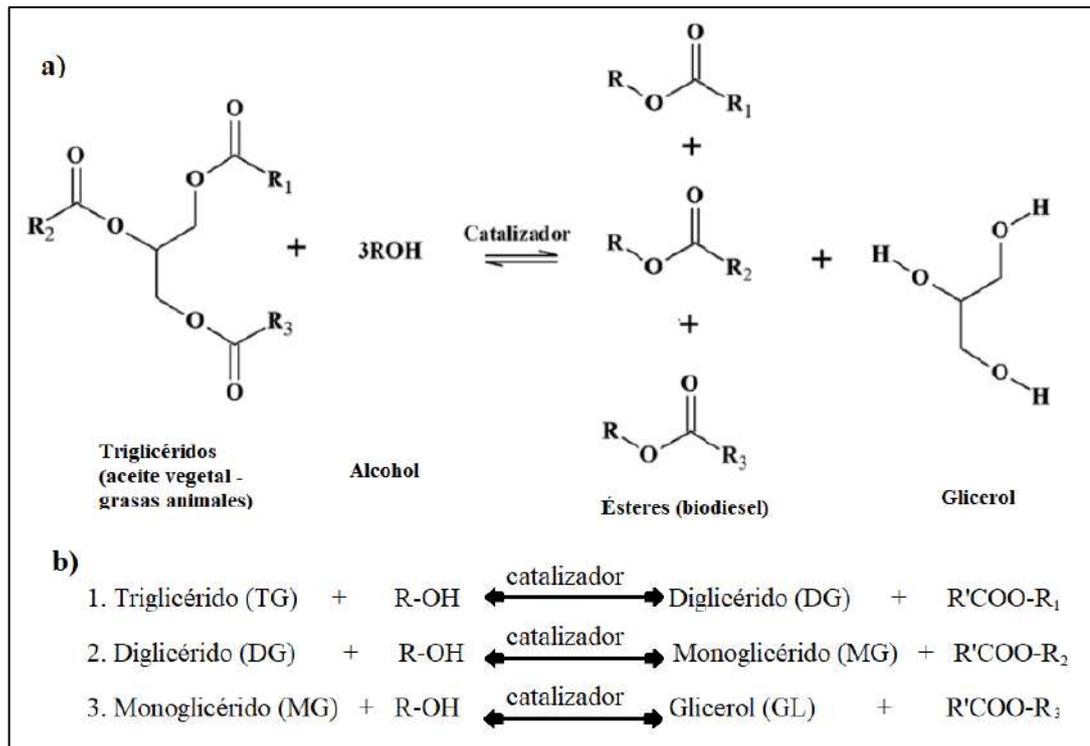


Figura 2. a) Reacción global y b) Reacciones consecutivas de transesterificación de triglicéridos. Adaptado de Rivaldi et al. (2008).

El glicerol crudo, el cual presenta un color oscuro, a diferencia del glicerol puro, es en realidad una mezcla de glicerol, alcohol, agua, sales inorgánicas (como residuos de catalizadores), ácidos grasos libres, mono, di y triglicéridos, ésteres metílicos y otros materiales orgánicos distintos del glicerol. Estas impurezas pueden variar del 20% al 60%, dependiendo de la materia prima, la eficiencia del proceso catalítico y las etapas de preparación y purificación del biodiesel (Schwengber et al., 2016). Esta es la causa principal del bajo precio del glicerol crudo en el mercado, pudiendo ser tratado para separarlo de los demás compuestos.

Para encontrar alternativas de uso al glicerol derivado de la producción de biodiesel, es necesario conocer sus características, especialmente su composición. Hu et al. (2012) caracterizó 5 muestras de glicerol crudo de distintas fuentes, comparando sus propiedades físicas y composición de los mismos, en donde los valores de densidad iban desde 1,01 a 1,31 g/cm³, el pH 6,4 a 10 y su viscosidad de 15 a 1213 mPa.s, siendo este valor más alto para glicerol a partir de aceite vegetal desecho.

Los mismos autores reportaron el análisis elemental del glicerol crudo, siendo carbono el principal componente, alcanzando valores superiores a 40% (p/p),

seguido del nitrógeno, además de contar con magnesio, calcio, sodio fósforo y hierro en cantidades inferiores. Con respecto a la composición de glicerol libre, fueron observadas concentraciones de 22,9 a 63% (p/p), seguido de metanol, agua, jabones y ésteres metílicos de ácidos grasos, en cantidades de hasta 30% (p/p), además de glicéridos, ácidos grasos libres y cenizas, en cantidades inferiores al 7% (p/p) (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de varias muestras de glicerol crudo. Adaptado de (Hu et al., 2012).

Muestra	GC-Bas 1	GC-Bas 2	GC-Bas 3	GC-AVD	GC-MIX
Glicerol libre (p/p %)	63,0 ± 0,3	22,9 ± 0,2	33,3 ± 0,1	27,8 ± 0,2	57,1 ± 0,0
Metanol (p/p %)	6,2 ± 0,0	10,9 ± 0,2	12,6 ± 0,1	8,6 ± 0,0	11,3 ± 0,0
Agua (p/p %)	28,7 ± 0,3	18,2 ± 0,1	6,5 ± 0,1	4,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Jabón (p/p %)	DLD	26,2 ± 0,2	26,1 ± 0,1	20,5 ± 0,1	31,4 ± 0,1
EMAG (p/p %)	DLD	21,3 ± 0,2	19,3 ± 0,3	28,8 ± 1,1	0,5 ± 0,1
Glicéridos (p/p %)	DLD	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,3	7,0 ± 0,5	0,4 ± 0,1
AGL (p/p %)	DLD	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1	DLD
Ceniza (p/p %)	2,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,0	7,7 ± 0,2

GC-Bas: Glicerol Crudo a base de aceite de soja

GC-AVD: Glicerol Crudo a base de aceite vegetal de desecho

GC-Mix: Glicerol Crudo a base de la mezcla de aceites anteriores

DLD: Por debajo del límite de detección

EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos

AGL: ácidos grasos libres

Los usos más comunes que se le da al glicerol, como en la industria farmacéutica y de cosméticos (Cornejo et al., 2017), son dependientes del grado de pureza del mismo, que debe ser igual o superior al 95%, debido que al contener impurezas sus propiedades físicas, químicas y biológicas cambian de acuerdo a la cantidad de las mismas, por lo que debe pasar por un proceso de purificación para poder ser empleado (Posada-Duque et al., 2010).

2.2. Purificación del glicerol

Los procesos para la purificación del glicerol crudo dependen de la materia prima utilizada para su producción y del grado de pureza requerida para su posterior aprovechamiento. Generalmente la purificación inicia con una precipitación acompañada de una neutralización para eliminar jabones y sales, evaporación al

vacío para eliminar alcoholes y agua y un refinado final (destilación) para aumentar la pureza (Luo et al., 2016).

La neutralización consiste en agregar un ácido concentrado como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, promoviendo la reacción con los jabones y formación de ácidos grasos libres insolubles en el glicerol, mientras que por el otro lado, al reaccionar con el catalizador básico utilizado, se formarán sales y agua, obteniéndose una mezcla con una fase superior formada por los ácidos grasos libres, una fase intermedia rica en glicerol, con sales inorgánicas en la fase inferior (Ardi et al., 2015).

La segunda etapa de purificación consiste en evaporación al vacío para eliminar el alcohol (metanol o etanol) y agua. En laboratorio, generalmente es utilizado un evaporador rotatorio en condiciones de vacío entre 50 y 90° C durante 2 horas (Xiao et al., 2013). La recuperación de alcohol, especialmente metanol, es importante para la economía del proceso y para la preservación del medio ambiente.

Por último, el glicerol puede pasar por distintas etapas con el fin de obtener un productor con la pureza mínima para su uso en industrias alimentarias y farmacéutica. Dichos procesos pueden incluir destilación al vacío, adsorción por intercambio iónico y, por último, adsorción con carbón activado para eliminar compuestos que dan color al glicerol, ácidos grasos y otras impurezas (Ardi et al., 2015).

El aumento de la producción de biodiesel y el elevado costo del proceso de purificación para industrias pequeñas, ha incrementado la búsqueda de alternativas económicas y viables de aprovechamiento del glicerol crudo (Christy et al., 2018; Monteiro et al., 2018). Tratamientos simples y económicos con ácidos concentrados y calentamiento han arrojado resultados favorables en lo que a purificación se refiere (Nanda et al., 2014).

2.3. Usos del glicerol

Este subproducto del biodiesel puede llegar a usarse como combustible para la misma caldera de operación de la fábrica, por su alto contenido de carbono, pero trae consigo varios problemas desde el punto de vista tecnológico, como su bajo poder calorífico, cerca de 16 MJ/kg, alta temperatura de autoignición, aproximadamente de

370° C, emisión de material particulado y dióxido de azufre (Coronado et al., 2014), siendo necesario el control de las emisiones atmosféricas.

El glicerol también puede ser aprovechado para la producción de biocombustibles, entre los cuales se destacan el hidrógeno (Schwengber et al., 2016; Leoneti et al., 2012) y el metano (Siles et al., 2010). Otro uso alternativo sería la producción de aditivos para combustibles, mejorando sus propiedades en frío, reduciendo su viscosidad y la emisión contaminantes (Hernández et al., 2012).

Debido a la cantidad de carbono presente en el glicerol, este podría ser utilizado como sustrato en la asimilación por bacterias o levaduras para obtener compuestos de valor agregado, siendo una alternativa viable para este subproducto (Rivaldi et al., 2008; Ochoa-Estopier et al., 2011; Mayorga et al., 2012; Rivaldi et al., 2013). También los elementos como fósforo, magnesio, calcio, nitrógeno y sodio podrían potenciar el crecimiento del microorganismo una vez asimilados.

Sin embargo, las impurezas como los ácidos grasos, alcoholes, jabones, sales y metales pesados pueden actuar como inhibidores para el crecimiento de los microorganismos (Chatzifragkou et al., 2012). Según Venkataramanan et al. (2012) los ácidos grasos libres son los de mayor efecto inhibitor a la hora de usar el glicerol como sustrato para cultivo, a diferencia del metanol y las sales, que presentan efectos casi nulos.

2.4. Asimilación del glicerol

Para ser metabolizado, el glicerol debe primeramente entrar en la célula, atravesando la membrana plasmática por medio de transporte pasivo (simple y facilitado) y/o transporte activo (Klein et al., 2017). El transporte pasivo simple consiste en el paso de glicerol a través la capa lipídica de la membrana plasmática por difusión simple impulsada por un gradiente de concentración (Konings, 2006). El transporte pasivo facilitado es mediado por proteínas con actividad biológica (permeasas) localizadas en las capas internas de la membrana plasmática. En ambos casos no se requiere de gasto energético celular. Las permeasas Fps1 son encontradas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas específicas para el transporte de glicerol (Luyten et al., 1995).

El transporte activo necesita de una fuente de energía para que este se lleve a cabo. El glicerol se transporta activamente mediante el simportador glicerol/H⁺ y glicerol/Na⁺ (dependientes de ATP), fueron descritas en distintas levaduras altamente osmotolerantes como *Debaryomyces hansenii* (Prista et al., 2005), *Pichia sorbitophila* (Lages et al., 1995) y *Zygosaccharomyces rouxii* (van Zyl et al., 1990).

La asimilación del glicerol puede ocurrir mediante dos vías metabólicas en condiciones aeróbicas, entre los cuales puede mencionarse un sistema de deshidrogenación de glicerol y un sistema de fosforilación del mismo (Anexo A). Las enzimas glicerol deshidrogenasas catalizan la deshidrogenación del glicerol para producir dihidroxiacetona (DHA), que luego es fosforilada por la DHA quinasa. Por otro lado, la fosforilación del glicerol por la enzima glicerol quinasa forma glicerol-3-fosfato, que es reducido por la enzima glicerol-3-P-deshidrogenasa, obteniendo DHA fosfato en ambas vías (Klein et al., 2017). Este producto actúa como intermediario en la glucogénesis, con lo que se generan diversos productos, entre ellos el etanol.

En condiciones anaeróbicas actúa la enzima glicerol deshidratasa, provocando la deshidratación del glicerol y obteniendo 3-hidroxi propionaldehído, actuando posteriormente la enzima 1,3 – propanodiol oxidoreductasa, lo cual genera el compuesto 1,3 – propanodiol, el cual puede ser usado en la industria de polímeros, pinturas, lubricantes y más (Mayorga et al., 2012).

Siendo utilizado como fuente de carbono, el glicerol crudo también puede ser asimilado por distintos tipos de microorganismos probióticos (Rivaldi et al., 2013), produciendo biomasa con características propia de los microorganismos mencionados. Mediante este tipo de procesos biotecnológicos, el glicerol puede ser aprovechado para obtener productos de valor agregado, logrando disminuir el impacto ambiental de las industrias del biodiesel.

2.5. Microorganismos probióticos

Los probióticos son complementos alimenticios a base de microorganismos vivos, que confieren beneficios a la salud del huésped si son administrados en cantidades adecuadas (FAO/WHO, 2001). Comprende algunas especies de bacterias y levaduras que pueden utilizarse para la obtención de alimentos funcionales (Sharma et al., 2020).

Los probióticos ayudan en la recomposición de la flora intestinal mediante tres mecanismos. Primeramente, estos se adhieren a la mucosa intestinal y liberan metabolitos protectores, como arginina y glutamina, evitando que las bacterias patógenas lo hagan. Posteriormente los probióticos compiten con los microorganismos indeseables por los nutrientes disponibles. Por último, estos producen compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, H₂O₂ y bacteriocinas, que son péptidos sintetizados por bacterias ácido-lácticas (Beristain-Bauza et al., 2012), logrando evitar el crecimiento de los microorganismos patógenos (Hemaiswarya et al., 2013).

Los beneficios para la salud atribuidos a la ingestión de cultivos probióticos dependen de la cepa (Williams, 2010), entre ellas se encuentra el control de la flora intestinal, aumento de la respuesta inmune a organismos patógenos, diarrea asociada al consumo de antibióticos, protección contra alergias (George Kerry et al, 2018), ayuda en la digestión de lactosa en individuos intolerantes a la lactosa (Pelletier et al., 2001), reducción de los síntomas del síndrome del intestino irritable (Moayyedi et al., 2010) y otros beneficios relacionados a la prevención de diversos desórdenes intestinales.

La ingesta diaria de los probióticos es necesaria para garantizar los efectos continuos que estos ofrecen. Por ello, estos microorganismos son considerados como posibles suplementos alimenticios en animales, con el fin de aumentar la productividad de los mismos, mejorando su calidad al mantener una buena salud intestinal, protegiéndolos contra posibles microorganismos patógenos (Castillo Baron, 2016).

Los productos lácteos, en especial la leche fermentada y una gran variedad de yogures, son los principales alimentos comercializados que contienen cultivos probióticos, dotándolos con los beneficios mencionados (Saad, 2006). También se puede encontrar a este microorganismo en forma de cápsulas de cultivos liofilizados, sobrenadantes de cultivos secados con calor y en otros alimentos como el chocolate (McFarland L. V., 2010).

2.6. *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii es una levadura no patógena que tiene propiedades que la convierten en un agente probiótico, como capacidad de sobrevivir al tránsito por el tracto gastrointestinal y crecimiento a 37 °C. Fue descubierta por el microbiólogo francés Henri Boulard en 1920, en Indochina, al percatarse que durante un brote de

cólera algunas personas no desarrollaban dicha enfermedad al beber cierto té a base de una fruta tropical llamada lichi, logrando aislar la cepa de levadura causante de dichos efectos. No fue hasta 1947 que la patente de esta levadura fue adquirida por Laboratorios Biocodex (McFarland L. V., 2010).

Esta levadura tiene un tamaño diez veces más grande que las bacterias probióticas, característica propia que diferencia a las células procariotas (bacterias) de las células eucariotas (levaduras); presenta resistencia natural a los antibióticos pudiendo aplicarse en combinación con ellos (Czerucka et al., 2007). Por esto es recetada para prevenir la diarrea y colitis asociada a antibióticos, causado por el agente *Clostridium difficile* tanto en adultos como en niños (McFarland et al., 2016; Dinleyici et al., 2019).

Se prescribe ampliamente en varios países en forma liofilizada, como agente preventivo y terapéutico para la diarrea aguda, diarrea asociada a antibióticos, síndrome del intestino irritable, colitis y otros malestares gastrointestinales (Dinleyici et al., 2012; Moré et al., 2015). Además, este probiótico se presenta como una alternativa para mejorar la respuesta inmune de vacunas frente a BoHV-5 (Herpesvirus bovino tipo 5) en ratones (Roos et al., 2018) y ovejas (Roos et al., 2018).

Sen et al. (2020) mencionan en su trabajo recopilatorio que la levadura *Saccharomyces boulardii* puede ser útil para combatir diversas infecciones del tracto gastrointestinal, tanto en modelos de rata y en seres humanos, debido a la capacidad de modular la inmunidad del huésped y de excluir competitivamente las bacterias patógenas. Sin embargo, sugiere que los potenciales beneficios pueden variar en función de la naturaleza de la infección y del huésped consumidor.

Como suplemento alimenticio en terneros lecheros Holstein, la levadura *Saccharomyces boulardii* puede llegar actuar como antiestresante, reduciendo la temperatura rectal, la frecuencia cardíaca y la diarrea tanto en condiciones térmicas neutras, como en condiciones ambientales estresantes causadas por altas temperaturas y alta humedad (Lee et al., 2019).

A diferencia de los demás probióticos, esta levadura es capaz de crecer a temperaturas de entre 20 y 50° C, siendo la temperatura óptima entre 30 y 35° C, ocurriendo a 55° C la muerte térmica (Farinazzo et al., 2017). El pH de crecimiento de este microorganismo debe ser ácido, teniendo la ventaja de que este se puede adaptar a pH más bajo que otras levaduras, como la *Saccharomyces cerevisiae*,

creciendo hasta en un medio de pH 2, siendo entre 4,5 y 5,5 los valores óptimos de crecimiento (Du et al., 2012). Estos autores mencionan además que este microorganismo es capaz de fermentar carbohidratos como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa y maltosa.

Estas características colocan al *Saccharomyces boulardii* como un microorganismo con un amplio margen para su cultivo, en lo referente al sustrato, por lo que se podrían buscar fuentes alternativas de carbono para ser asimiladas, con un medio de cultivo con los nutrientes y condiciones necesarias para el crecimiento óptimo de biomasa de este probiótico, logrando que el proceso sea rentable.

2.7. Reactores air-lift

Los reactores air-lift son utilizados en procesos fermentativos debido a que presentan un modelo simple con ausencia de partes móviles donde el líquido circula entre dos zonas interconectadas, conocidos como el tubo ascendente y el tubo descendente (Figura 3). En este tipo de reactores se promueve una conexión entre el líquido superior e inferior, por medio del direccionamiento del gas (generalmente aire filtrado), provocando una recirculación del líquido (Guieysse et al., 2011).

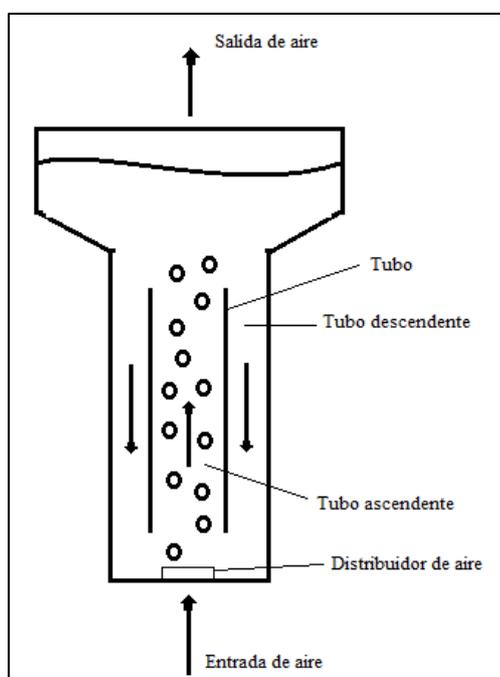


Figura 3. Ilustración de un reactor air-lift y sus componentes. Adaptado de Guieysse et al. (2011).

Son clasificados según su estructura, en reactores de bucle externo y de bucle interno (Figura 4). En los reactores bucle externo los tubos están separados y se conectan por conductos horizontales; mientras que los de bucle interno poseen un tubo o placa dentro del reactor con el que se crean las dos zonas interconectadas (Xu et al., 2011). Con este tipo de configuración se logra una mezcla más eficiente y mayor transferencia de masa con un menor consumo de energía por unidad de volumen que los reactores comúnmente usados, pudiendo adicionar características como el uso de microburbujas con diámetro de 50 μm , llegando flujos de aire mucho mayores, traduciéndose en una mejor mezcla (AL-Mashhadani et al., 2015).

Estos equipos son ideales a la hora de trabajar con microorganismos a gran escala, en especial por sus bajas fuerzas de cizallamiento y por su mejor distribución de oxígeno en comparación a otros equipos, otorgándoles una gran ventaja ya que la aireación está relacionada directamente con la formación de biomasa (Muller et al., 2007).

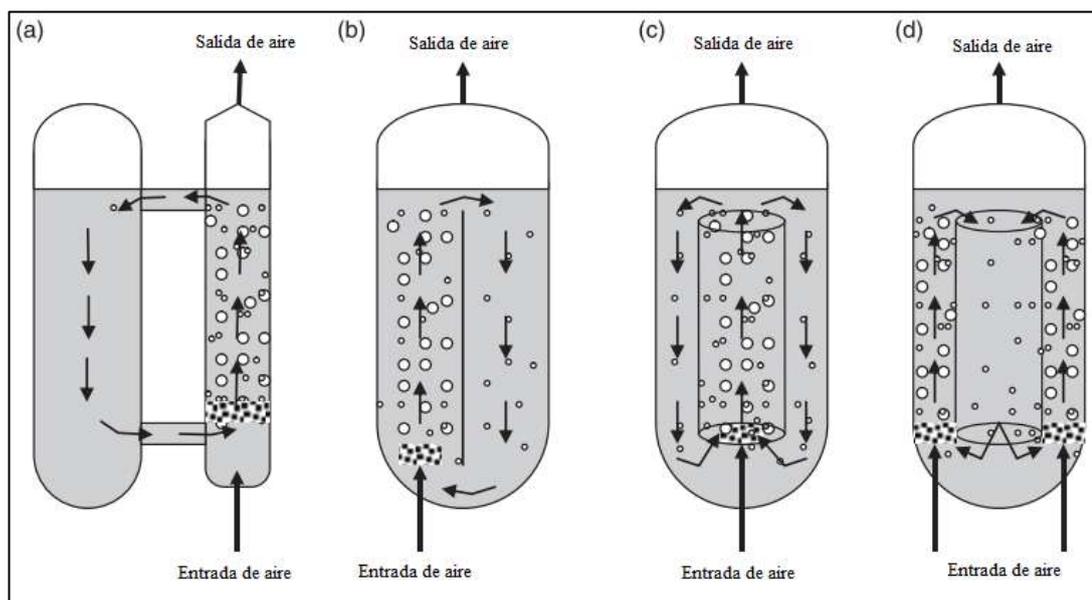


Figura 4. Estructura de (a) un air-lift de bucle externo; (b) un air-lift de bucle interno dividido; (c) air-lift de bucle interno con tubo de aspiración concéntrica; y (d) un air-lift de bucle interno con burbujeo anular. Adaptado de Guieysse et al. (2011).

2.8. Antecedentes

Ochoa-Estopier et al. (2011) mencionan que el glicerol crudo puede utilizarse como sustrato para la obtención biomasa a partir de una cepa mejorada de *Saccharomyces*

cerevisiae, con rendimientos similares a los obtenidos con sustratos a base de glucosa, con la ventaja de tener un monitoreo del sustrato menos riguroso, al ser una fuente de carbono no fermentable, evitando la formación de sub-productos, como etanol, durante el cultivo de levaduras, pudiendo trabajar a mayores rangos de concentración de sustrato, a diferencia de la glucosa que debe mantener concentración residual muy baja (<1 g/L).

Para mejorar la capacidad de crecimiento de microorganismos en glicerol crudo es necesario que este pase por un tratamiento previo para eliminar compuestos que puedan inhibir el crecimiento de microorganismos. Rivaldi et al. (2017) demostró que el uso de ácido fosfórico al 85% puede ser una alternativa viable para la eliminación de varias impurezas como los ácidos grasos libres, jabón y alcohol presentes en el glicerol, permitiendo una mayor asimilación de este sustrato y consecuente producción de biomasa por bacteria de género *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*), con características probióticas. También, este tratamiento proporciona fósforo necesario para el metabolismo microbiano.

El glicerol crudo fue utilizado como sustrato a diferentes concentraciones con el fin de producir aceites unicelulares (SCO, por sus siglas en inglés, *single cell oil*) empleando varias cepas de levadura. Primeramente, se comparó el crecimiento de biomasa y lípidos para todas las levaduras con una concentración inicial de glicerol de 30 g/L, siendo las cepas *Lipomyces starkeyi* y *Rhodospiridium toruloides* las que reflejaron un mayor crecimiento celular. Posteriormente, la cantidad de biomasa y SCO producidos por estas dos cepas fue comparada para distintas concentraciones de glicerol crudo, dentro de un rango de 50 a 180 g/L, logrando resultados favorables en todas las concentraciones, comprobando que estas levaduras pueden crecer inclusive a concentraciones muy altas de dicho sustrato (Tchakouteu et al., 2015).

Como la levadura *Saccharomyces boulardii* es capaz de asimilar distintas fuentes de carbono para obtener biomasa probiótica, esta fue utilizada para la biorremediación de efluentes de arroz parvolizado, agregando también distintos suplementos como sacarosa y glicerol crudo durante el cultivo del microorganismo. Entre los cinco medios evaluados fue el que contenía el efluente suplementado con sacarosa al 1% el que presentó los mejores resultados en cuanto a crecimiento de células y eliminación de nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno (DQO). Este medio fue llevado a un biorreactor en el cual se generó biomasa con una media de 3,8 g/L,

además se eliminaron compuestos como fósforo y DQO en un alto porcentaje (Gaboardi et al., 2018).

Muller et al. (2007) compararon el crecimiento de *Saccharomyces boulardii*, siendo el sustrato glucosa, en un biorreactor de agitación normal y uno del tipo air-lift, para una aireación de 1,0 y 1,5 vvm, obteniendo resultados casi idénticos en la fase de latencia y exponencial, correspondiente desde las 0 a 6 horas. Luego de esas 6 horas, fue observado un cambio significativo en la velocidad de formación de células, siendo el mayor valor para el fermentador airlift a 1,5 vvm, concluyendo que la mayor aireación otorga una oxigenación más eficiente, que conlleva a una mayor tasa de crecimiento de célula.

Elsayed et al. (2018) también realizaron un estudio en donde comparó el crecimiento de *Saccharomyces boulardii* y producción de invertasa para aireaciones de 0,5, 1,0 y 2,0 vvm, teniendo como resultado mayor formación de células a 2,0 vvm (9,8 g/L), mientras que a 1,0 vvm de aireación fue alcanzada la mayor producción de la enzima invertasa (14950 U/L).

El glicerol ya fue probado como sustrato para el crecimiento de *Saccharomyces boulardii*, en medios que contenían 2, 3 y 5% de glicerol, a diferentes pH, 4, 5 y 7, en donde el microorganismo no pudo crecer en ninguna concentración del sustrato a un pH de 7, mientras que para pH 4 y 5 si se observó formación de células, concluyendo que el pH óptimo de crecimiento para este probiótico se encuentra entre 4,5 y 5,5 (Bzducha-Wróbel et añ., 2013).

De acuerdo a la literatura consultada, es posible utilizar glicerol de biodiesel como sustrato para el crecimiento de levaduras probióticas y otros microorganismos de interes biotecnológico. Además, la abundancia de glicerol en el mercado, tanto local como internacional, lo hace propicio como sustrato para procesos fermentativos.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El enfoque de la investigación fue de carácter cuantitativo, siendo el alcance correlacional y descriptivo, puesto que se evaluó el grado de asociación existente entre las variables que influyen en la producción, rendimiento y productividad de la biomasa de la levadura probiótica.

3.1. Materia prima

3.1.1. Sustrato

El sustrato estudiado fue glicerol de biodiesel crudo proveído por la empresa Bioenergy Paraguay S.A., localizada en la ciudad de Villeta (Central, Paraguay), siendo el subproducto de la elaboración de biodiesel, conteniendo impurezas como jabones, agua, metanol y sales. Esta materia prima fue almacenada en contenedores cerrados a temperatura ambiente.

3.1.2. Microorganismo

En cuanto a la cepa de levadura *Saccharomyces boulardii* comercial, fue adquirida en farmacias de la zona y evaluada en cuanto a su capacidad de crecimiento en un medio formulado con glicerol tratado como fuente de carbono y nutrientes.

3.2. Tratamiento del glicerol

Con el fin de eliminar el exceso de NaOH, jabones y otras impurezas que puedan inhibir el crecimiento de la levadura *Saccharomyces boulardii*, el glicerol crudo fue acidificado con ácido fosfórico (H_3PO_4) 85%, conforme metodología descrita por Rivaldi et al. (2017).

El proceso consistió en calentar 400 mL de glicerol crudo a 75°C bajo agitación constante de 200 rpm durante 30 minutos para reducir la viscosidad y evaporar la mayor cantidad de metanol. Al mismo tiempo, se adicionó progresivamente 0,1 mL de ácido fosfórico 85% a la muestra para ajustar el pH a $2,0 \pm 0,5$. Luego de reducir la viscosidad y observar formación de capa bifásica el glicerol pretratado, fue transvasado a un embudo de decantación, permaneciendo en reposo por 24 h para

separación de compuestos insolubles, en este caso ácidos grasos, de la fase de glicerol.

3.3. Preparación de inóculo

Se prepararon frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de solución de composición: glicerol de biodiesel tratado, 20 g/L; fosfato ácido de amonio, 2,0 g/L; fosfato ácido de potasio, 2,0 g/L, extracto de levadura, 3,0 g/L, sulfato de manganeso, 0,1 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado, 0,5 g/L, cloruro de calcio dihidratado, 0,05 g/L a pH 5,0 (Rivaldi et al., 2012). Los frascos fueron inoculados con células liofilizadas en una concentración inicial de células de 0,1 g/L, e incubadas a 30°C por 24 h bajo agitación orbital de 150 rpm. Dos alícuotas de 45 mL fueron obtenidas al final del cultivo, centrifugadas a 3500 rpm, lavadas dos veces con agua destilada estéril, enseguida fue determinada la concentración celular para inoculación, según metodología descrita por Rivaldi et al. (2012).

3.4. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento en reactor air-lift

Los cultivos fueron conducidos en reactor tipo air-lift, con volumen útil de 500 mL, conteniendo el mismo medio de cultivo indicado anteriormente (item 3.3), con concentraciones variables de glicerol. El reactor air-lift utilizado consistió en un cuerpo cilíndrico de vidrio encamisado para recirculación de agua, con el fin de mantener su temperatura constante, en cuyo interior se encuentra un cilindro de vidrio de diámetro interno de 3 cm separado 3 cm de fondo, en cuyo interior se inyecta aire mediante un difusor de acero inoxidable colocado en la parte inferior del cilindro central.

El reactor fue conectado a un compresor de aire, cuyo flujo de entrada al sistema fue regulado por un conjunto de válvulas, además de filtros de aire (0,2 μm) estéril para eliminar posibles impurezas (partículas, esporos o microorganismos) que pudieran contaminar el medio (Figura 5). El control de la temperatura del cultivo microbiano fue regulado mediante encamisado con circulación de agua precalentada a la temperatura óptima de crecimiento de la levadura, 30° C.

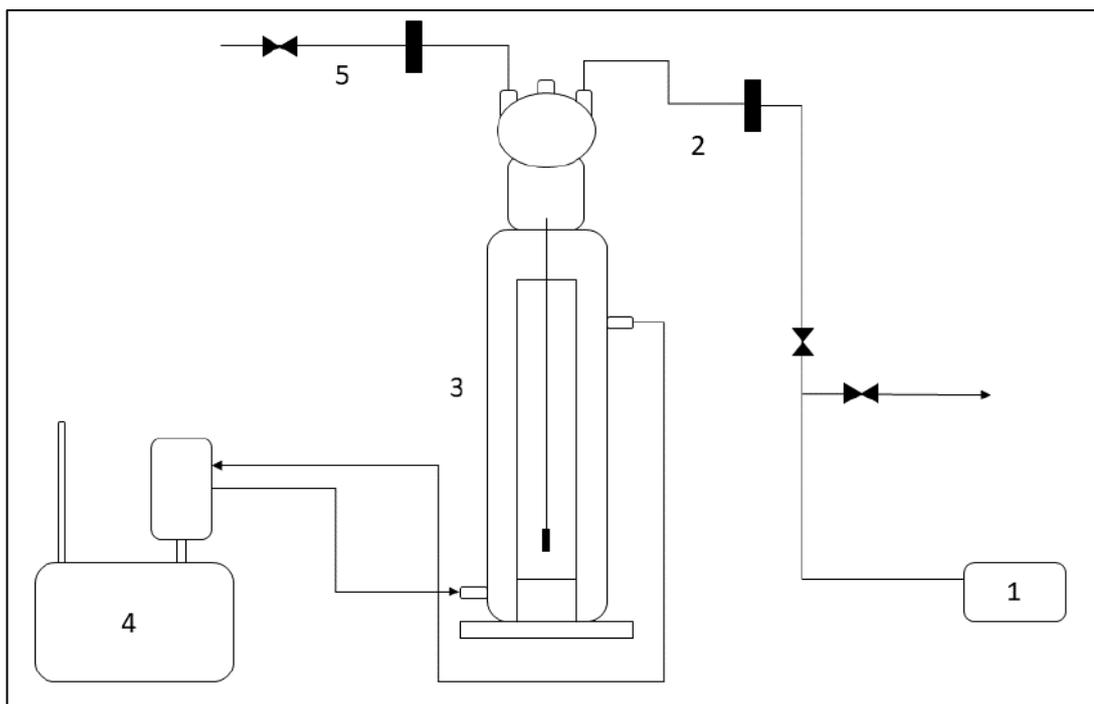


Figura 5. Representación esquemática de sistema de cultivo. Bomba de aire (1), filtro (2), reactor de vidrio (3) calentador de agua (4), salida para medición de caudal (5). Fuente: Elaboración propia.

El medio de cultivo conteniendo glicerol de biodiesel 0,1 g/L de penicilina y antiespumante consistente en una emulsión acuosa de silicona, fue inoculado con 0,1 g/L de células, siendo el cultivo conducido a 30° C por un periodo de 30 h. Alícuotas de 5 mL de medio fueron obtenidas a intervalos de 3 h. y almacenadas para posterior análisis.

Diseño experimental

La influencia de las variables independientes concentración de glicerol y aireación (volumen de aire por volumen de medio de cultivo, vvm) sobre las variables dependientes, producción de biomasa (g/L), productividad volumétrica (g/L.h, Q_P), factor de conversión (g/g glicerol, Y_{XS}) y consumo volumétrico de sustrato (g/L.h, Q_S) fue estudiada según un Diseño Central Compuesto 2^2 con tres réplicas en el punto central. Los experimentos fueron conducidos bajo condiciones variables de glicerol y aireación (Tabla 3), totalizando 11 experimentos, conforme la matriz experimental de la Tabla 4.

Tabla 3. Niveles de las variables del proceso de cultivo.

Factores	Símbolo	Niveles de variables		
		-1	0	+1
Concentración de glicerol (g/L)	A	20	60	100
Aireación (vvm)	B	0,5	1,0	1,5

(-1) factor relativo al menor valor evaluado, (0) factor relativo al valor evaluado en el punto central, (+1) factor relativo al mayor valor evaluado

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Matriz experimental del diseño central compuesto 2^2 con tres réplicas en el punto central.

Experimentos	Valores de las variables			
	Codificadas		Reales	
	Variable A	Variable B	Variable A	Variable B
1	-1	-1	20	0,5
2	+1	-1	100	0,5
3	-1	+1	20	1,5
4	+1	+1	100	1,5
5	-1	0	20	1,0
6	+1	0	100	1,0
7	0	-1	60	0,5
8	0	+1	60	1,5
9	0	0	60	1,0
10	0	0	60	1,0
11	0	0	60	1,0

Fuente: Elaboración propia.

Este tipo de diseño fue escogido con el fin de un mejor estudio de la región del espacio experimental y la posible curvatura presente en esta (Gutiérrez Pulido et al., 2008). También, se optó por un valor de α igual a 1, obteniendo un espacio experimental más acotado, esto debido a las limitaciones para la medición del flujo de aire en rangos distintos a los definidos para la investigación

La elección de los niveles de concentración de glicerol (g/L) mostrados en la Tabla 3 se basaron en estudios previos en los que se demuestra que algunos microorganismos son capaces de asimilar este sustrato hasta concentraciones elevadas (Tchakouteu et al., 2015). Para la aireación se tomaron en cuenta varias bibliografías que estudiaron el crecimiento de la levadura *Saccharomyces boulardii*

en distintas condiciones de aireación dentro del rango elegido (Muller et al., 2007; Elsayed et al., 2018)

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Determinación de concentración celular

La concentración de células expresada (g/L) se determinó a partir de una curva de calibración de absorbancia vs concentración de célula en espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific, modelo Orion Aquamate 8000 UV-VS a 600 nm conforme metodología descrita por Rivaldi et al. (2012).

3.5.2. Determinación de concentración de glicerol

La determinación de la concentración de glicerol se realizó utilizando la metodología propuesta por (Kuhn et al., 2015), donde se construyó una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de glicerol en espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific, modelo Orion Aquamate 8000 UV-VS a 410 nm, con previo tratamiento del glicerol con ácido fosfórico y calentamiento para eliminar las sales, jabón y metanol (Rivaldi, et al. 2013).

3.5.3. Análisis de Resultados

Los parámetros bioquímicos del cultivo de las levaduras en medio conteniendo glicerol fueron determinados conforme:

- Productividad volumétrica en biomasa (Q_P): relación entre la cantidad de biomasa producida y el tiempo de cultivo.

$$Q_P = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} \quad (1)$$

Dónde:

Q_P = productividad volumétrica en biomasa (g/L.h); X_f = concentración final de biomasa (g/L); X_i = concentración inicial de biomasa (g/L); Δt = intervalo de tiempo de cultivo (h).

- Factor de conversión de glicerol a biomasa ($Y_{X/S}$): relación entre la cantidad de biomasa producida y la correspondiente variación en el sustrato consumido durante el cultivo.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (2)$$

Dónde:

$Y_{X/S}$ = factor de rendimiento de biomasa (g/g); X_i = concentración inicial de biomasa (g/L); X_f = concentración final de biomasa (g/L); S_i = concentración inicial de sustrato (g/L); S_f = concentración final de sustrato (g/L).

- Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_S): relación entre la cantidad de sustrato consumido y el tiempo de cultivo.

$$Q_S = \frac{S_f - S_i}{\Delta t} \quad (3)$$

Dónde:

Q_S = consumo volumétrico de sustrato (g/L.h); S_f = concentración final de sustrato (g/L); S_i = concentración inicial de sustrato (g/L); Δt = intervalo de tiempo de cultivo (h).

Además, se determinaron las velocidades máximas específicas de crecimiento (μ_{max}) mediante los coeficientes angulares de las líneas ajustadas de la variación del logaritmo neperiano de las concentraciones determinadas con el tiempo. También el tiempo de generación (t_d) se determinó mediante la relación entre el logaritmo neperiano de 2 y μ_{max} (Arredondo-Vega et al., 2007).

$$\mu_{max} = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (5)$$

El análisis estadístico del efecto de las variables sobre las respuestas será realizado mediante el programa Protimiza® Experimental Design y Design Expert® Software Version 11 (DEMO), utilizando conceptos de estadística descriptiva y multivariada.

Para analizar los datos obtenidos y la correlación entre las variables independientes sobre las variables dependientes será empleado el análisis de varianza y el método de superficie de respuesta, con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$).

A partir de los resultados de ANOVA y regresión será establecido el modelo matemático que representa la producción de biomasa (g/L), rendimiento (g/g glicerol) y productividad volumétrica celular (g/L.h) de la levadura probiótica en función de las variables independientes estudiadas.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tratamiento del glicerol crudo

El glicerol proveniente de la industria contiene gran cantidad de impurezas, entre ellas ésteres, metanol, sales utilizadas como catalizadores (Hu et al., 2012), por lo que fue necesaria la eliminación de la mayor cantidad de estos compuestos a fin de evitar que estos actúen como inhibidores durante el proceso de crecimiento celular (Venkataramanan et al., 2012).

El tratamiento con ácido fosfórico concentrado, en una proporción de 0,14 mL/mL de glicerol crudo, permitió la neutralización total del glicerol crudo y la separación de ácidos grasos libres derivados de la descomposición ácida de jabones. En la Figura 6 es posible observar la separación de las fases luego de las 24 h de decantación, siendo la fase superior compuesta de ácidos grasos libres y la otra fase rica en glicerol, conteniendo pequeñas cantidades de sales, agua y metanol. Este último fue eliminado en gran parte durante el agregado del ácido realizado bajo calentamiento continuo a 75° C por 1 h, considerando que la temperatura de vaporización del metanol es de 64,7 °C.

La fracción correspondiente al glicerol tratado fue separada, caracterizada en cuanto a su concentración y utilizada para la formulación de medios de cultivo. El tratamiento permitió además la incorporación de fósforo en forma de fosfatos al glicerol tratado, siendo importante para el desarrollo de microorganismos en procesos fermentativos. Resultados similares fueron obtenidos durante el tratamiento del glicerol crudo de biodiesel descrito por Nanda et al., 2014 y Rivaldi et al., 2017.

El contenido inicial de glicerol en el residuo crudo fue de 430 g/L alcanzando una concentración final promedio de 610 g/L, al final del tratamiento ácido. En la Figura 7 se puede observar la diferencia entre el glicerol crudo y el tratado, denotando un color más claro luego del tratamiento debido a la eliminación de la mayoría de sus impurezas.



Figura 6. Separación de glicerol después del tratamiento con ácido fosfórico al 85%, la fase superior corresponde a los ácidos grasos y la fase inferior: glicerol y sales. Fuente: elaboración propia.



Figura 7. Glicerol crudo y glicerol tratado. Fuente: elaboración propia.

Los ácidos grasos obtenidos durante la purificación pueden ser caracterizados y al conocer su composición encontrarles usos alternos para aprovechar este nuevo subproducto. Este puede ser utilizado para la producción de biodiesel (Duong et al., 2021; Reis et al., 2015; Oliveira et al., 2008) logrando un proceso eficiente y abriendo posibilidades a futuras investigaciones.

4.2. Evaluación de las condiciones de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en glicerol

El glicerol tratado fue utilizado como sustrato, en adición con otros nutrientes, para la producción de biomasa de levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*. En la Tabla 5 se presenta la concentración celular (g/L) y la concentración de glicerol (g/L) medida en los distintos tiempos para los 11 ensayos realizados en el reactor air-lift. Además, la Figura 8 presenta las curvas cinéticas de consumo de sustrato y crecimiento celular, denotando el comportamiento de cada experimento llevado a cabo.

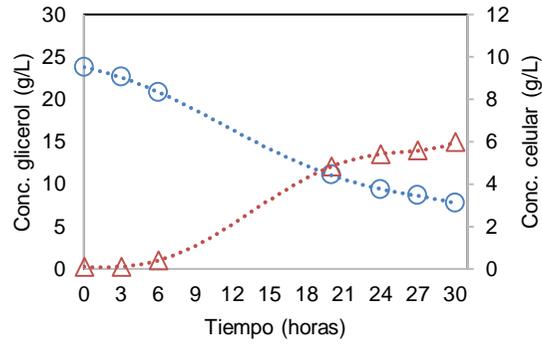
La mayor producción de biomasa, 8,13 g/L, se alcanzó a las 30 h de cultivo, en las condiciones de 20 g/L de glicerol y 1,0 vvm de aireación, correspondiente al ensayo 5. Aparentemente, esta condición favoreció la formación celular sin generar estrés en la levadura *S.boulardii*. A altas concentraciones de glicerol (100 g/L) y alto flujo de aire (1,5 vvm) se observó la menor cantidad de biomasa producida, 1,82 g/L en 30 h de cultivo.

El glicerol a altas concentraciones ocasiona tensiones sobre la membrana biológica de microorganismos (Cray et al., 2015), por lo que se dificulta la asimilación de este sustrato, es por ello que la menor cantidad de biomasa producida fue a 100 g/L de concentración inicial de glicerol. Además al agregar mayor cantidad de glicerol, las impurezas que no pudieron ser removidas, como pequeñas cantidades de ácidos grasos, también actuaron como inhibidores del crecimiento celular.

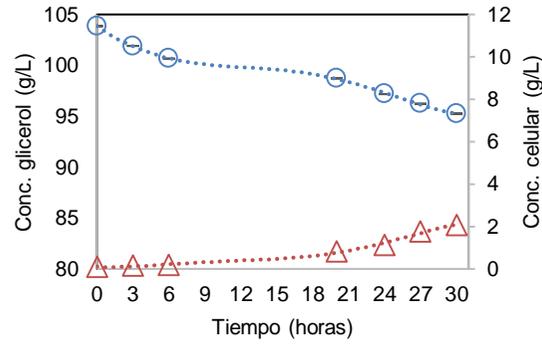
En lo que respecta a la aireación, al aumentar esta la cantidad de oxígeno disuelto disponible dentro del reactor es mayor, por lo que el metabolismo microbiano es más activo, logrando las células crecer rápidamente en estas condiciones (Elsayed et al., 2018)., es por ello que al aumentar el flujo de aire, mayor fue la producción de biomasa hasta llegar a la aireación de 1,0 vvm.

Que la producción de biomasa haya disminuido al llevar la aireación al valor más alto seleccionado pudo deberse al estrés oxidativo generado en el medio, que ocurre cuando se forman especies reactivas de oxígeno (ERO), que son subproductos normales del metabolismo celular. Estos compuestos en concentraciones altas tales que las células no son capaces de eliminarlas, terminan dañando a varios componentes celulares como los lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, pudiendo llegar a la muerte celular (Landolfo et al., 2008; Folch-Mallol et al., 2004).

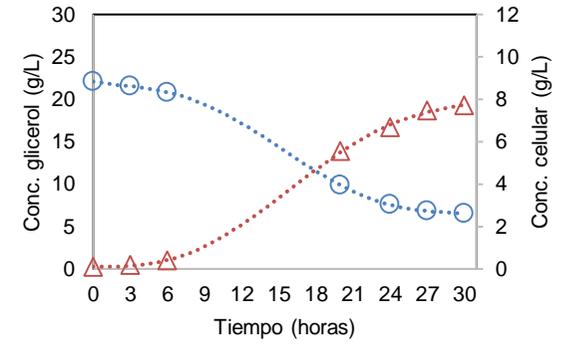
Ensayo 1



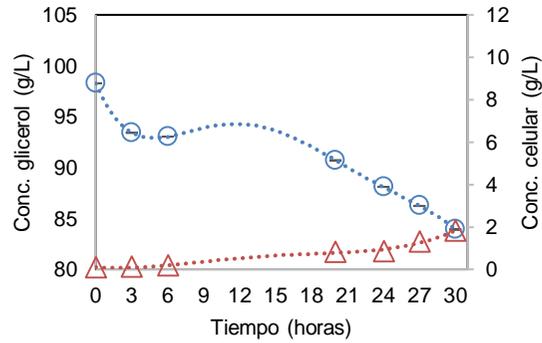
Ensayo 2



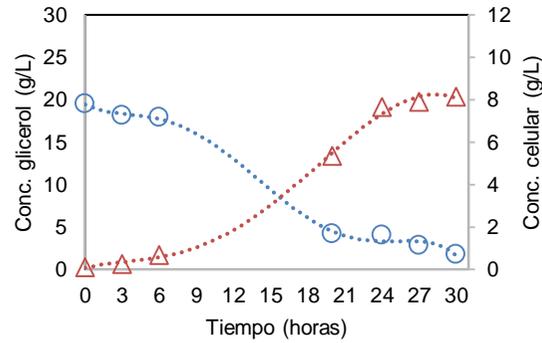
Ensayo 3



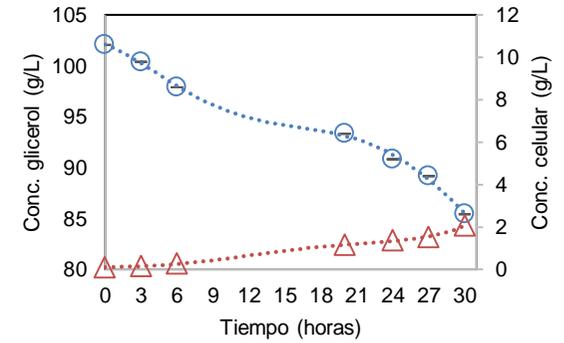
Ensayo 4



Ensayo 5



Ensayo 6



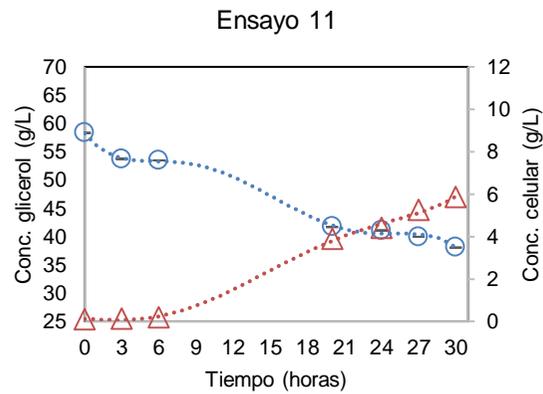
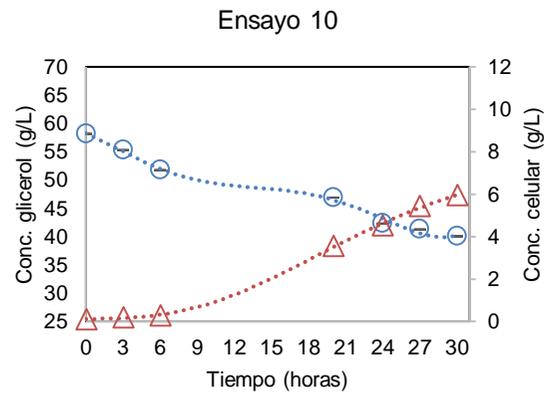
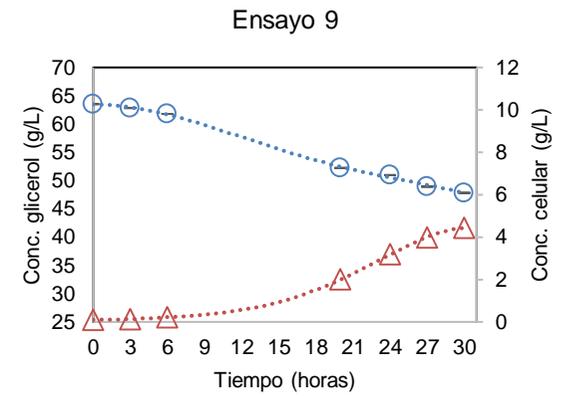
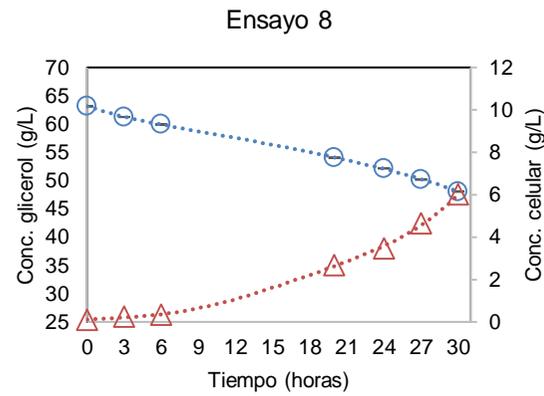
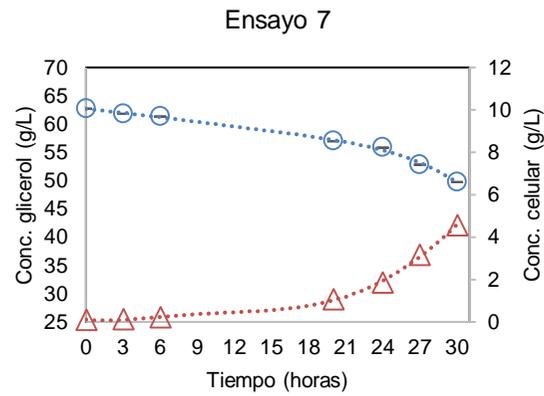


Figura 8. Curvas de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (rojo, Δ) y concentración de glicerol (azul, \circ) en función del tiempo.
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Valores resultantes de concentración celular y concentración de sustrato en los ensayos realizados.

Ensayo	Niveles de las variables		Células (g/L)							Glicerol (g/L)						
	A	B	0	3	6	20	24	27	30	0	3	6	20	24	27	30
1	-1	-1	0,10	0,11	0,40	4,82	5,41	5,58	5,97	23,78	22,62	20,83	11,09	9,34	8,67	7,76
2	+1	-1	0,10	0,14	0,19	0,81	1,13	1,76	2,07	103,85	101,91	100,66	98,72	97,17	96,23	95,25
3	-1	+1	0,10	0,18	0,39	5,55	6,69	7,46	7,71	22,10	21,52	20,83	9,88	7,59	6,80	6,50
4	+1	+1	0,10	0,11	0,17	0,82	0,85	1,31	1,82	98,27	93,42	93,04	90,70	88,10	86,22	83,91
5	-1	0	0,10	0,24	0,67	5,34	7,64	7,90	8,13	19,50	18,13	17,89	4,16	3,99	2,79	1,74
6	+1	0	0,10	0,14	0,27	1,14	1,37	1,52	2,06	102,05	100,38	97,89	93,31	90,82	89,15	85,41
7	0	-1	0,10	0,13	0,21	1,07	1,84	3,16	4,57	62,72	61,82	61,32	56,95	55,81	52,80	49,74
8	0	+1	0,10	0,24	0,32	2,69	3,47	4,64	6,01	63,14	61,24	59,92	54,04	52,15	50,18	48,06
9	0	0	0,10	0,14	0,22	2,00	3,18	3,99	4,42	63,52	62,83	61,79	52,23	50,97	48,92	47,82
10	0	0	0,10	0,18	0,28	3,54	4,53	5,43	5,94	58,15	55,29	51,73	46,88	42,29	41,25	40,04
11	0	0	0,10	0,12	0,19	3,88	4,40	5,26	5,85	58,32	53,73	53,47	41,68	41,08	39,95	38,04

A: glicerol; B: aireación. Fuente: Elaboración propia.

Al mismo tiempo, una mayor aireación provoca mayor formación de espuma dentro del reactor, que también pudo ser un factor inhibitor del crecimiento celular, ya que disminuye la eficiencia de transferencia de masa de oxígeno (Vardar-Sukan, 1998). Además, el estallido de las burbujas puede dañar las células y proteínas, dificultando su crecimiento (Holmes et al., 2006).

Comparando los resultados con referencias bibliográficas, Muller et al. (2007) que evaluaron el crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en medio con glucosa (10 g/L) en un reactor de tanque agitado y también de tipo air-lift, observando la mayor producción de célula, 4,1 g/L, para la mayor aireación (1,5 vvm) dentro del tanque.

En el trabajo realizado por Elsayed et al. (2018), la mayor producción de biomasa, 9,8 g/L, de *Saccharomyces boulardii* fue registrada a para un flujo de aire de 2,0 vvm, habiendo utilizado glucosa como sustrato en un reactor de tanque agitado durante 50 horas. Rivaldi et al. (2012) registraron crecimientos de biomasa de hasta 21 g/L al utilizar glicerol tratado como sustrato para el crecimiento de la levadura *Hansenula Anomala* CCT 2648, durante 24 h de cultivo con aireación de 0,5 vvm.

Rivaldi et al. (2013) utilizó el glicerol de biodiesel como sustrato en una concentración inicial de 10 g/L, llevando a cabo el crecimiento de tres cepas probióticas de *Lactobacillus* obteniendo en matraces de Erlenmeyer, en donde se alcanzó valores de 2,11 g/L en 24 h de cultivo para la *L. acidophilus*, consumiendo 4,57 g/L de sustrato en el proceso.

Los resultados referentes al factor de conversión de glicerol a biomasa ($Y_{x/s}$), productividad volumétrica en biomasa (Q_P) y velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_S) son presentados en la Tabla 6. Estos valores fueron calculados a las 24 h de cultivo debido a que la mayoría de los ensayos alcanzaron la fase estacionaria en dicho periodo.

Los valores máximos para el factor de conversión ($Y_{x/s}$) y la productividad volumétrica de biomasa (Q_P) se obtuvieron a la concentración inicial mínima de sustrato, 20 g/L, y a la aireación de 1,0 vvm. En cambio, la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_S) mayor se logró para la concentración de 60 g/L de glicerol a 1,0 vvm de aireación, coincidiendo en este último factor con los anteriores parámetros, pero para una mayor concentración inicial de sustrato.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos medidos en los distintos ensayos.

Ensayo	Niveles de las variables		$Y_{x/s}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Q_S (g/L.h)
	A	B			
1	-1	-1	0,37	0,22	0,60
2	+1	-1	0,15	0,04	0,28
3	-1	+1	0,45	0,27	0,60
4	+1	+1	0,07	0,03	0,42
5	-1	0	0,49	0,31	0,65
6	+1	0	0,11	0,05	0,47
7	0	-1	0,25	0,07	0,29
8	0	+1	0,31	0,14	0,46
9	0	0	0,25	0,13	0,52
10	0	0	0,28	0,18	0,66
11	0	0	0,25	0,18	0,72

A: glicerol; B: aireación; $Y_{x/s}$: factor de conversión de glicerol a biomasa; Q_P : productividad volumétrica de biomasa; Q_S : velocidad volumétrica de consumo de sustrato. Fuente: Elaboración propia.

El factor de conversión de mayor valor a las 24 horas (0,49) es comparable a otros trabajos ya mencionados, como el de Elsayed et al. (2018) que alcanzó también 0,49 g/g, pero a las 50 h de cultivo del *Saccharomyces boulardii*. Rivaldi et al. (2012) obtuvieron una conversión del 0,45 g/g al utilizar glicerol como sustrato a 0,5 vvm a las 24 h del cultivo de *H. anomala* CCT 2648 habiendo consumido todo el glicerol.

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos con la literatura.

Sustrato	Microorganismo	Aireación (vvm)	Tiempo (h)	Biomasa producida (g/L)	Factor de conversión (g/g)	Fuente
Glicerol	<i>Saccharomyces boulardii</i>	1,0	24	7,64	0,49	Este trabajo
Glicerol	<i>Hansenula Anomala</i> CCT 2648	0,5	24	21	0,45	Rivaldi et al. (2012)
Glucosa	<i>Saccharomyces boulardii</i>	1,5	12	4,1	0,393*	Muller et al. (2007)
Glucosa	<i>Saccharomyces boulardii</i>	2,0	50	9,8	0,49	Elsayed et al. (2018)

* Medido durante la fase exponencial. Fuente: Elaboración propia.

En otro trabajo realizado por Rivaldi et al. (2013) llegaron a un valor de 0,46 g/g en lo que se refiere al consumo de glicerol a las 24 h de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* habiendo consumido el 46 % del sustrato. Estos resultados muestran que el rendimiento logrado al utilizar glicerol de biodiesel tratado como sustrato es similar a pesar de cultivar diferentes microorganismos. Un resumen de las comparaciones con los otros trabajos mencionados se ve en la Tabla 7.

4.3. Análisis estadístico

A través del análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) se pudo conocer la influencia de las variables independientes sobre las dependientes. Primeramente, en la Tabla 8 se observa como A y B² tienen un efecto significativo sobre la biomasa producida. Esto coincide con la literatura, en la que se indica que tanto la concentración de sustrato como el flujo de aire influyen en el crecimiento celular (Muller et al., 2007; Rivaldi et al., 2017; de Paula et al., 2019).

Tabla 8. Análisis de varianza de los factores estudiados en la producción de biomasa probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	50,45	5	10,09	25,91	0,0014	Significativo
A	44,77	1	44,77	114,96	0,0001	
B	1,15	1	1,15	2,96	0,1460	
AB	0,6084	1	0,6084	1,56	0,2667	
A ²	1,10	1	1,10	2,82	0,1541	
B ²	3,60	1	3,60	9,24	0,0288	
Residual	1,95	5	0,3895			
Falta de ajuste	1,03	3	0,3447	0,7549	0,6130	No significativo
Error puro	0,9133	2	0,4566			
Total	52,40	10				
Desv. estándar	0,6241	R²	0,9628	P.a.	14,5440	
Total	3,59	R² aj.	0,9257			
C.V. %	17,37	R² pr.	0,7675			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada.
Fuente: Elaboración propia.

$$X \left(\frac{g}{L} \right) = 3,88 - 2,73A + 0,4383B - 0,39AB + 0,6582A^2 - 1,19B^2 \quad (6)$$

El modelo matemático que muestra el efecto de las variables sobre la producción de biomasa fue representado en la ecuación 6, siendo esta significativa al presentar un valor p 0,0014 ($p < 0,05$), además la falta de ajuste en este caso no fue significativa. El R^2 presenta un valor mayor a 0,9 (0,9628), además la diferencia entre el R^2 ajustado (0,9257) y el R^2 predicho (0,7675) es menor a 0,2, demostrando que el modelo se ajusta a los datos experimentales y puede ser utilizado para predecir la concentración de biomasa en estas condiciones.

La Figura 9 representa la superficie de respuesta generada por el modelo matemático, incluyendo todos los términos, significativos y no significativos. Se puede observar una curvatura debida a los términos cuadráticos de la ecuación. Es posible comprobar gráficamente la relación existente entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos de manera experimental para la producción de biomasa en la Figura 10.

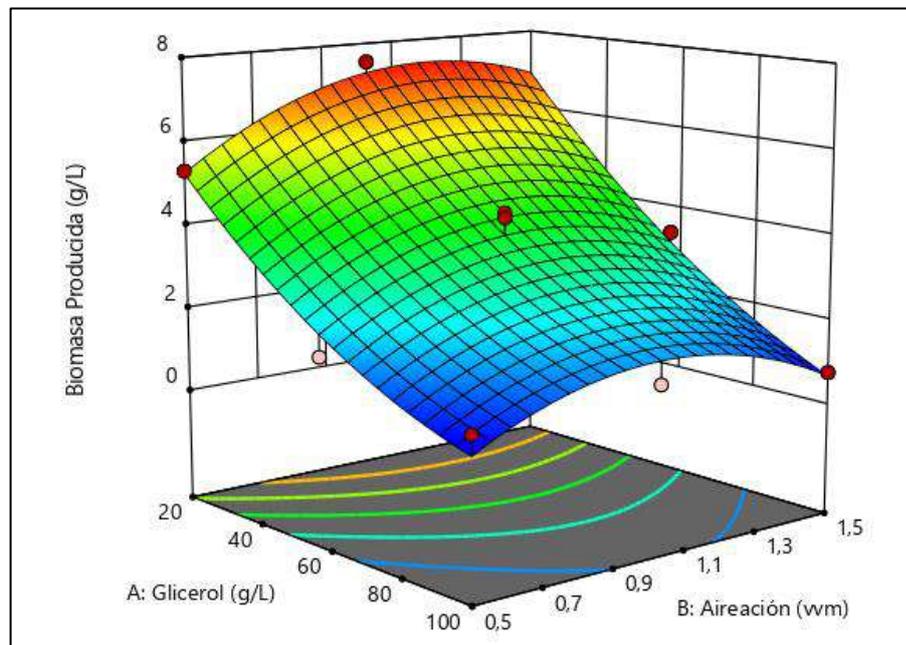


Figura 9. Superficie de respuesta correspondiente a la biomasa producida (g/L) en función de las variables independientes. Fuente: Elaboración propia.

Los términos no significativos fueron removidos por medio de la técnica de selección de variables por pasos hacia atrás, la cual consistió en eliminar uno por uno los

términos de menor contribución al ajuste, siendo estos los de mayor valor p en la Tabla ANOVA (Gutiérrez et al., 2008). Esto fue realizado con el fin de mejorar la capacidad predictiva del modelo.

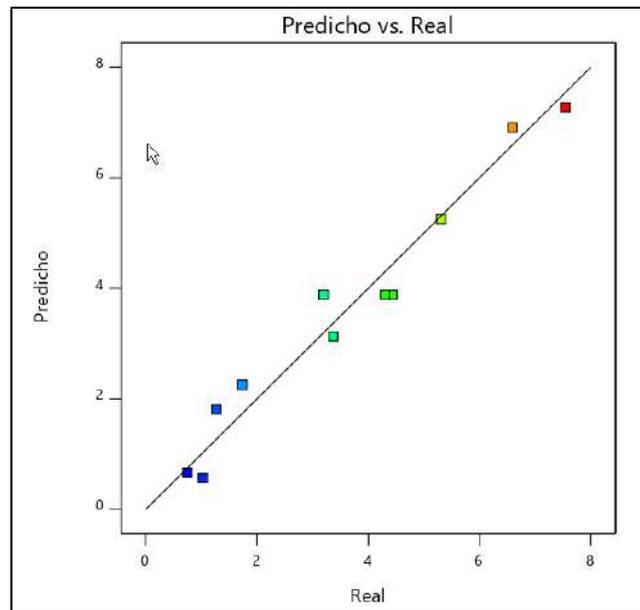


Figura 10. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la producción de biomasa (g/L). Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar en la Tabla 9 como el valor p para el modelo y A disminuyeron y aumentó para B^2 , manteniendo la significancia de estos para la producción de biomasa. La ecuación 7 presenta al nuevo modelo matemático que representa la superficie de respuesta de la Figura 11. Se ve también como la curvatura de la superficie es menos pronunciada por la eliminación de los términos AB y A^2 de la ecuación.

La aplicación de la técnica mencionada mejoró la capacidad predictiva del modelo, pudiendo ver esto en la diferencia entre el valor del R^2 ajustado (0,9004) y el R^2 predicho (0,8125). Sobre todo, el nuevo modelo es capaz de predecir de una manera más exacta el comportamiento de cultivo de levaduras llevados en condiciones diferentes al experimento realizado. En la Figura 12 se puede ver cómo fueron pocos los valores reales que se alejan de los predichos.

Tabla 9. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la producción de biomasa posterior a la selección de los términos significativos.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	48,74	3	16,25	31,13	0,0002	Significativo
A	44,77	1	44,77	85,79	< 0.0001	
B	1,15	1	1,15	2,21	0,1808	
B ²	2,82	1	2,82	5,40	0,0531	
Residual	3,65	7	0,5219			
Falta de ajuste	2,74	5	0,5480	1,20	0,5129	No significativo
Error puro	0,9133	2	0,4566			
Total	52,40	10				
Desv. Estándar	0,7224	R²	0,9303	P.a.	15,8805	
Total	3,59	R² aj.	0,9004			
C.V. %	20,10	R² pr.	0,8125			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

$$X\left(\frac{g}{L}\right) = 4,15 - 2,73A + 0,4383B - 1,02B^2 \quad (7)$$

Este análisis de varianza fue realizado también para la productividad volumétrica de biomasa (g/L.h). Al ser esta el cociente entre la cantidad de biomasa producida y el tiempo transcurrido en el cultivo, debido a esto, los resultados obtenidos son similares entre sí, como se puede ver en la Tabla 10, siendo A y B² factores que poseen un efecto significativo sobre la productividad.

De igual manera, el modelo matemático que representa la superficie de respuesta que corresponde a la productividad volumétrica de biomasa se denota en la ecuación 8. Este modelo fue significativo al presentar un valor *p* 0,0016 (*p*<0,05), además la falta de ajuste tampoco fue significativa. El R² presentó un valor de 0,9606 y la diferencia entre el R² ajustado (0,9212) y el R² predicho (0,7537) fue menor a 0,2, por lo que es posible utilizar este modelo para predecir la productividad volumétrica en células en las condiciones del experimento.

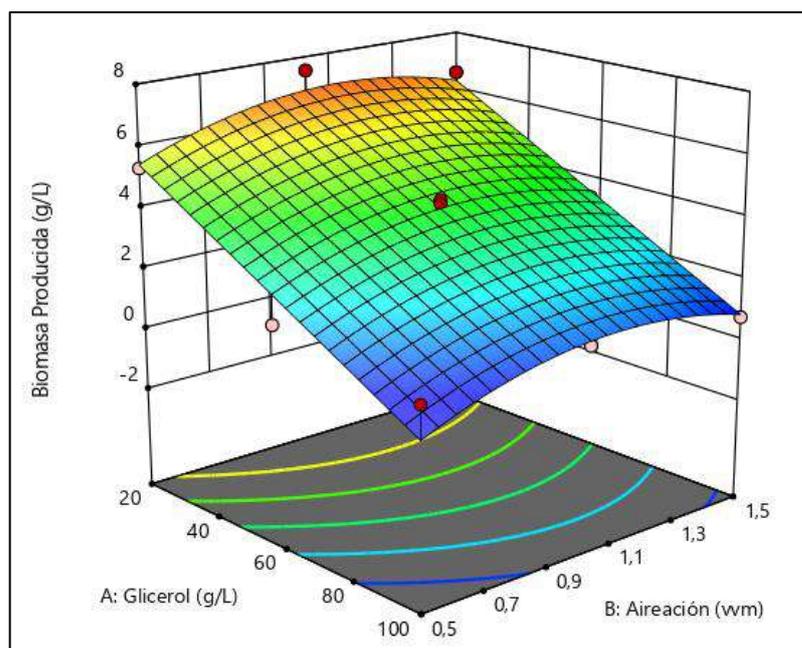


Figura 11. Superficie de respuesta correspondiente a la producción de biomasa (g/L) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

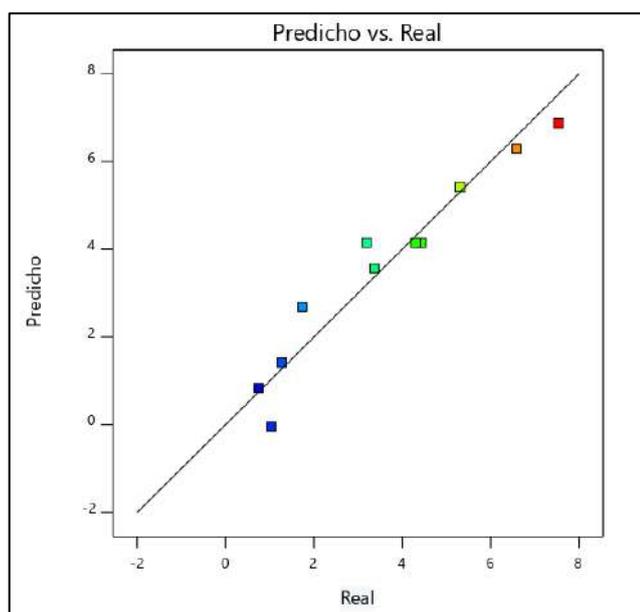


Figura 12. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la producción de biomasa (g/L) posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa de levadura *Saccharomyces boulardii*.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	0,0865	5	0,0173	24,39	0,0016	Significativo
A	0,0771	1	0,0771	108,68	0,0001	
B	0,0020	1	0,0020	2,84	0,1525	
AB	0,0009	1	0,0009	1,27	0,3111	
A ²	0,0018	1	0,0018	2,47	0,1766	
B ²	0,0060	1	0,0060	8,47	0,0334	
Residual	0,0035	5	0,0007			
Falta de ajuste	0,0019	3	0,0006	0,7516	0,6142	No significativo
Error puro	0,0017	2	0,0008			
Total	0,0900	10				
Desv. estándar	0,0266	R²	0,9606	P.a.	14,1701	
Total	0,1473	R² aj.	0,9212			
C.V. %	18,08	R² pr.	0,7537			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

$$Q_p \left(\frac{g}{L.h} \right) = 0,1595 - 0,1133A + 0,0183B - 0,015AB + 0,0263A^2 - 0,0487B^2 \quad (8)$$

Elaboración propia.

La superficie de respuesta generada por el modelo matemático para la productividad es presentada en la Figura 13, denotando una curva al igual que la superficie generada para la producción de biomasa, siendo de igual manera a una concentración inicial de glicerol de 20 g/L y aireación de 1,0 vvm en donde se obtuvo la mayor productividad. Con la Figura 14 se puede corroborar la relación existente entre los valores predichos por el modelo matemático y los obtenidos durante el experimento.

También se realizó la eliminación de los términos no significativos del modelo por medio de la técnica de selección de variables por pasos hacia atrás. El valor *p* para el modelo y A disminuyeron y aumentó para B², como se puede ver en la Tabla 11. La superficie de respuesta (Figura 15) presentó una menor curvatura por la

eliminación de los términos no significativos, siendo la ecuación 9 la que representa de manera matemática dicha superficie.

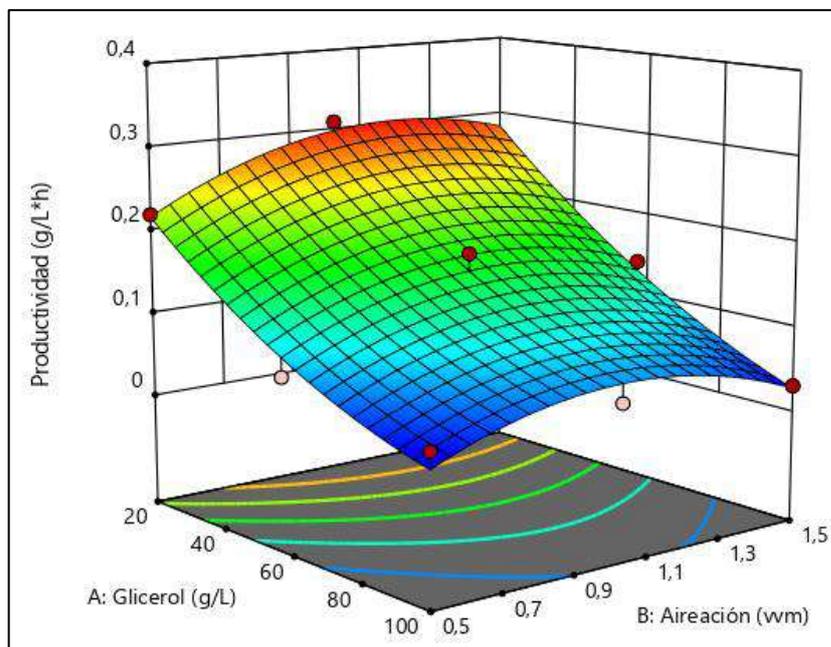


Figura 13. Superficie de respuesta para la productividad volumétrica de biomasa (g/L.h) en función de las variables independientes. Fuente: Elaboración propia.

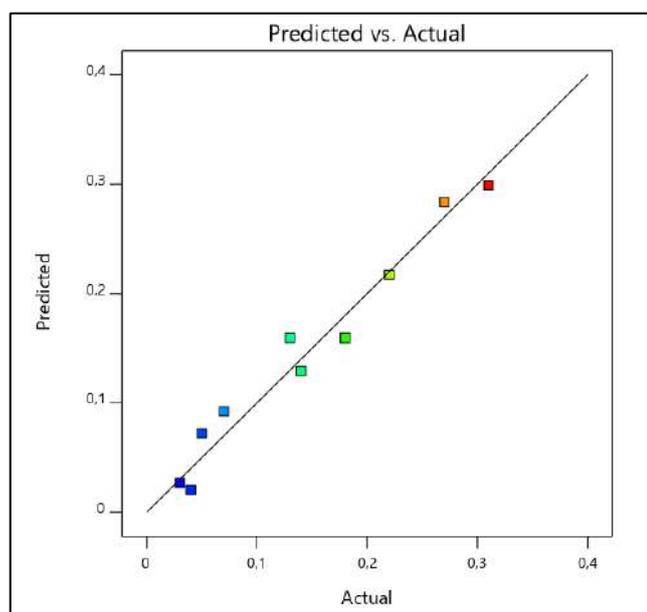


Figura 14. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la productividad volumétrica de biomasa (g/L.h). Fuente:

Tabla 11. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa posterior a la selección de los términos significativos.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	0,0838	3	0,0279	31,54	0,0002	Significativo
A	0,0771	1	0,0771	87,01	< 0,0001	
B	0,0020	1	0,0020	2,28	0,1751	
B ²	0,0047	1	0,0047	5,35	0,0540	
Residual	0,0062	7	0,0009			
Falta de ajuste	0,0045	5	0,0009	1,09	0,5428	No significativo
Error puro	0,0017	2	0,0008			
Total	0,0900	10				
Desv. Estándar	0,0298	R²	0,9311	P.a.	15,9734	
Total	0,1473	R² aj.	0,9016			
C.V. %	20,21	R² pr.	0,8179			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

$$Q_P \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = 0,1700 - 0,1133A + 0,0183B - 0,0417B^2 \quad (9)$$

El valor de R² predicho aumentó (0,8179), por lo que la diferencia entre este y R² ajustado (0,9016) disminuyó, por lo que mejoró la capacidad predictiva del modelo, pudiendo ver esto en la Figura 16, al comparar gráficamente los valores reales con los valores predichos.

Con respecto al factor de conversión, este mostró una tendencia positiva al disminuir la concentración del glicerol y aumentar la aireación dentro del reactor. Su análisis de varianza se puede apreciar en la Tabla 12. En este caso A fue una variable significativa para el modelo en el intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$), mientras que B no. El efecto de las diferentes variables estudiadas sobre el factor de conversión fue expresado en la ecuación 10, siendo el modelo significativo para el intervalo de confianza mencionado anteriormente.

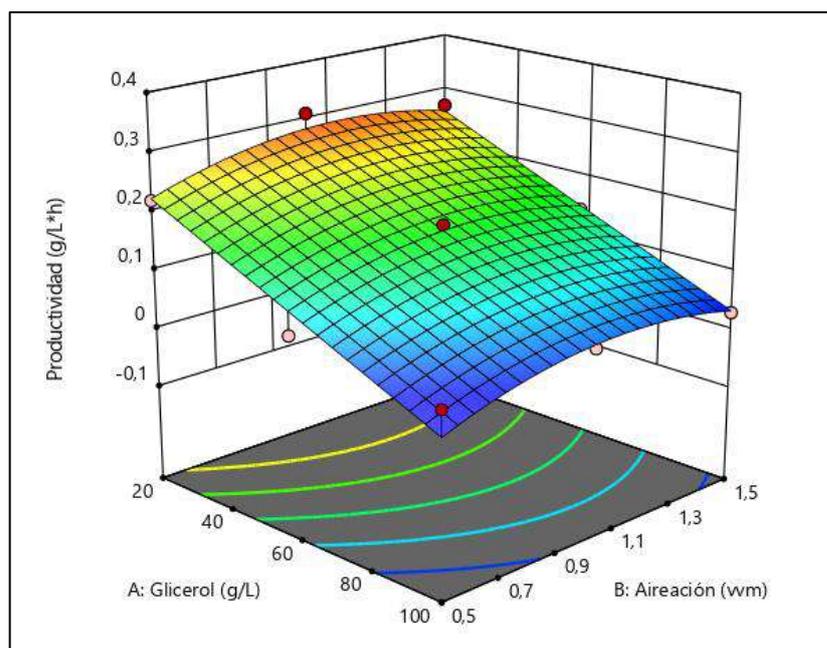


Figura 15. Superficie de respuesta correspondiente a la productividad volumétrica de biomasa (g/L.h) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

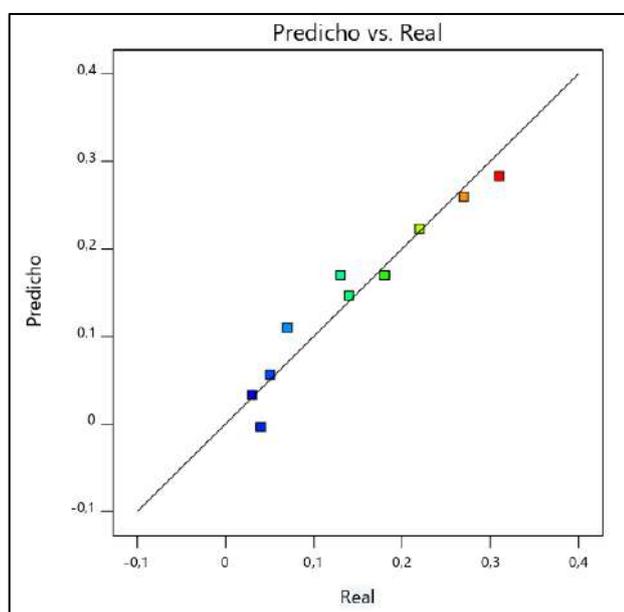


Figura 16. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la productividad volumétrica de biomasa (g/L.h) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 12. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente al factor de conversión de la levadura *Saccharomyces boulardii*.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	0,1666	5	0,0333	24,11	0,0016	Significativo
A	0,1601	1	0,1601	115,84	0,0001	
B	0,0001	1	0,0001	0,0482	0,8348	
AB	0,0064	1	0,0064	4,63	0,0840	
A ²	0,0000	1	0,0000	0,0081	0,9317	
B ²	0,0000	1	0,0000	0,0081	0,9317	
Residual	0,0069	5	0,0014			
Falta de ajuste	0,0063	3	0,0021	7,01	0,1274	No significativo
Error puro	0,0006	2	0,0003			
Total	0,1735	10				
Desv. estándar	0,0372	R²	0,9602	P.a.	14,8130	
Total	0,2745	R² aj.	0,9203			
C.V. %	13,54	R² pr.	0,6984			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

$$Y_{XS} \text{ (g/g)} = 0,2768 - 0,1633A + 0,0033B - 0,04AB - 0,0021A^2 - 0,0021B^2 \quad (10)$$

La superficie de respuesta para el factor de conversión presentó una leve curvatura que se puede observar en la Figura 17. Así mismo a través de la gráfica se denota que los valores máximos se logran a concentraciones bajas de glicerol, 20 g/L, y a altos flujos de aire, 1,5 vvm, produciendo mayor cantidad biomasa por sustrato consumiendo durante el cultivo.

A pesar de que el modelo matemático fuera significativo y que tanto el valor de R² y del R² ajustado sean elevados, 0,9602 y 0,9203 respectivamente, la diferencia entre este último coeficiente y el R² predicho (0,6984) es mayor a 0,2, lo que se traduce en que el modelo tiene la capacidad de predecir las variaciones de las respuestas debida a los datos experimentales, pero no para futuros experimentos en diferentes condiciones (Montgomery, 2004). Por ello en la Figura 18 se ve como los valores reales no están muy alejados de los valores predichos.

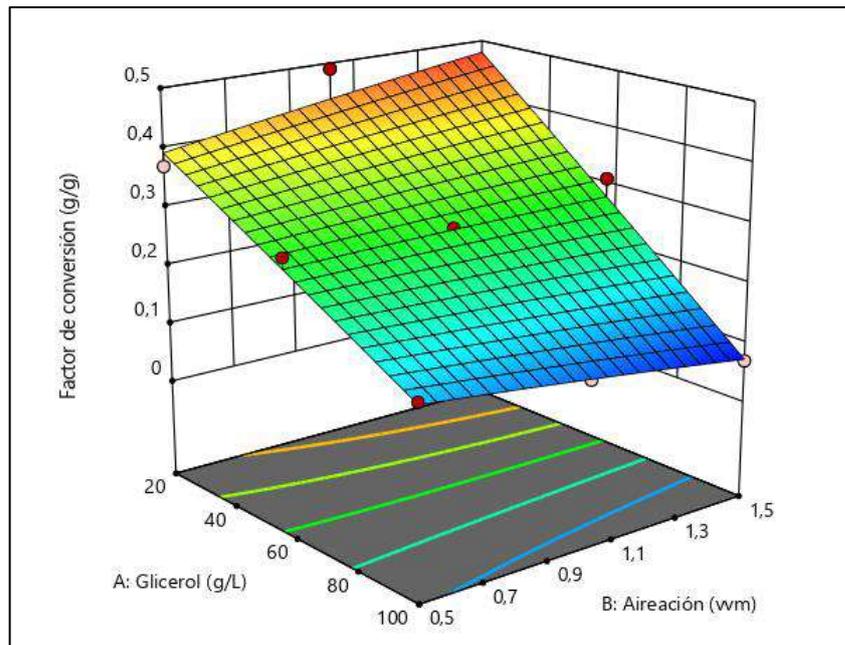


Figura 17. Superficie de respuesta correspondiente al factor de conversión (g/g) en función de las variables independientes. Fuente: Elaboración propia.

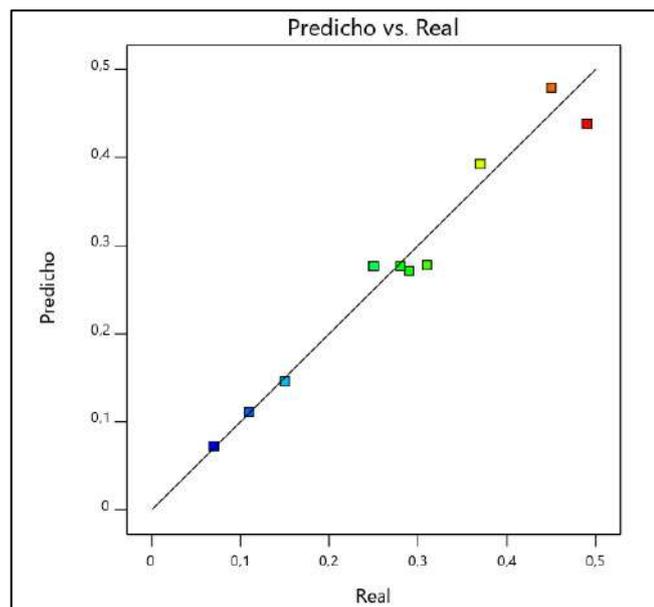


Figura 18. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para el factor de conversión de biomasa (g/g). Fuente: Elaboración propia.

Un modelo matemático debe explicar tanto la respuesta obtenida con los resultados experimentales y también poder predecir el comportamiento del mismo en

condiciones distintas al experimento. Por esta razón se mejoró la capacidad predictiva del modelo con la técnica de selección de variables por pasos hacia atrás.

Al haber eliminado los términos cuadráticos de la ecuación el valor p correspondiente al modelo disminuye considerablemente (Tabla 13), por lo que sigue siendo significativo. También ocurrió esto para la interacción AB, llegando a ser significativa para la ecuación, demostrando de manera estadística que la aireación también tiene un efecto sobre el factor de conversión.

Tabla 13. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente factor de conversión de la levadura *Saccharomyces boulardii* posterior a la selección de los términos significativos.

Factores	SC	GL	MC	F	p	
Modelo	0,1665	3	0,0555	56,00	< 0.0001	Significativo
A	0,1601	1	0,1601	161,46	< 0.0001	
B	0,0001	1	0,0001	0,0672	0,8028	
AB	0,0064	1	0,0064	6,46	0,0386	
Residual	0,0069	7	0,0010			
Falta de ajuste	0,0063	5	0,0013	4,23	0,2023	No significativo
Error puro	0,0006	2	0,0003			
Total	0,1735	10				
Desv. Estándar	0,0315	R²	0,9600	P.a.	21,4187	
Total	0,2745	R² aj.	0,9429			
C.V. %	11,47	R² pr.	0,8615			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

$$Y_{X/S} \left(\frac{g}{g} \right) = 0,2745 - 0,1633A + 0,0033B - 0,0400AB \quad (11)$$

Tanto el valor de R^2 ajustado (0,9429) y de R^2 predicho (0,8615) aumentaron al realizar la reducción de términos, por lo que la ecuación 11 en este caso es adecuada para predecir el factor de conversión. La superficie de respuesta (Figura 19) y la gráfica de valores reales vs. predichos (Figura 20) no presentaron grandes cambios con respecto a las Figuras anteriores. En la superficie de respuesta se observa una contracción debido a la interacción, ya que la respuesta varía en relación a las distintas combinaciones, para bajas concentraciones de sustrato, al aumentar la

aireación aumenta el factor de conversión, mientras que el efecto se invierte para altas concentraciones.

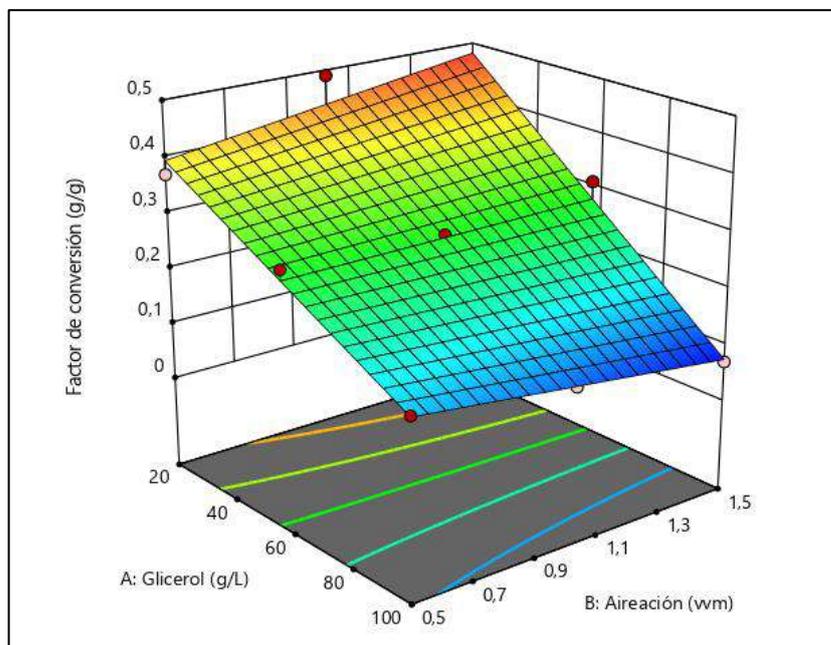


Figura 19. Superficie de respuesta correspondiente al factor de conversión (g/g) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

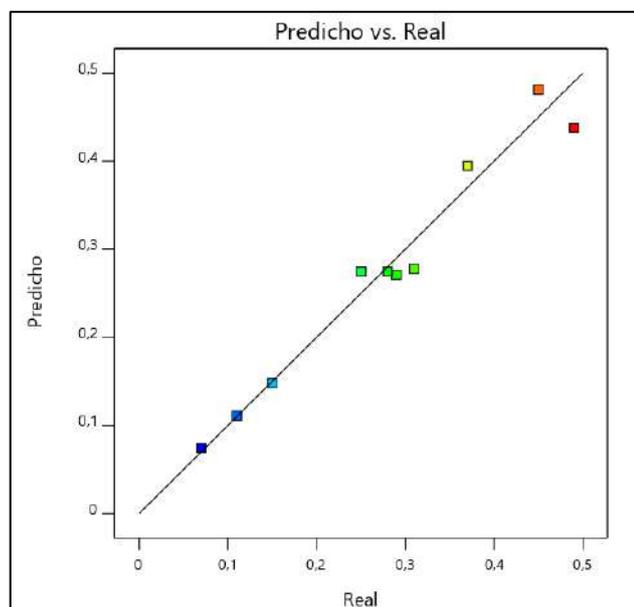


Figura 20. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para el factor de conversión de biomasa (g/g) posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

Para análisis de varianza de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato se presenta la Tabla 14. Tanto el A como B² tuvieron una influencia significativa dentro del modelo, presentando un valor *p* menor a 0,05. Por otro lado, el modelo no fue significativo en el intervalo de confianza del 95% (*p*<0,05), siendo su valor muy próximo a 0,05 (0,0522).

Tabla 14. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato.

Factores	SC	GL	MC	F	<i>p</i>	
Modelo	0,1848	5	0,0370	4,94	0,0522	No significativo
A	0,0771	1	0,0771	10,29	0,0238	
B	0,0160	1	0,0160	2,14	0,2034	
AB	0,0049	1	0,0049	0,6546	0,4552	
A ²	0,0001	1	0,0001	0,0094	0,9266	
B ²	0,0818	1	0,0818	10,93	0,0213	
Residual	0,0374	5	0,0075			
Falta de ajuste	0,0302	3	0,0101	2,80	0,2742	No significativo
Error puro	0,0072	2	0,0036			
Total	0,2222	10				
Desv. estándar	0,0865	R²	0,8316	P.a.	7,7162	
Total	0,5227	R² aj.	0,6631			
C.V. %	16,55	R² pr.	-0,0608			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada. Fuente: Elaboración propia.

La ecuación 12 representa la superficie de respuesta de la Figura 21, teniendo en cuenta todos los factores analizados. Se pudo notar el máximo consumo de sustrato por hora para la menor concentración inicial de glicerol y para la aireación de 1,0 vvm, lo que coincide con la producción de biomasa, ya que en estas condiciones fue la mayor generación de la misma, por lo que fue necesario mayor consumo del sustrato. Además, la superficie de respuesta presentó una curva pronunciada, debido mayormente al factor que corresponde a la aireación cuadrática.

$$Q_s \left(\frac{g}{L.h} \right) = 0,6179 - 0,1133A + 0,0517B + 0,035AB + 0,0053A^2 - 0,1797B^2 \quad (12)$$

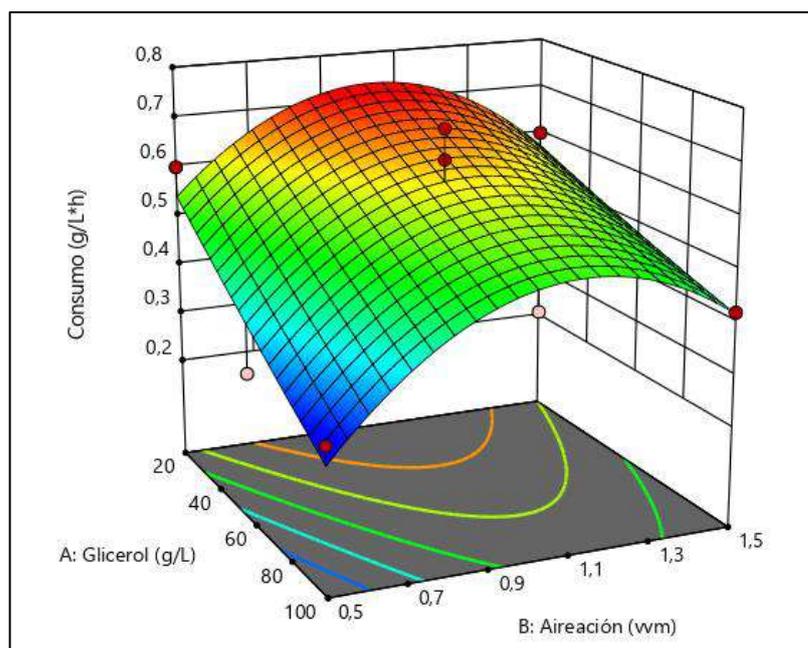


Figura 21. Superficie de respuesta correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h) en función de las variables independientes. Fuente: Elaboración propia.

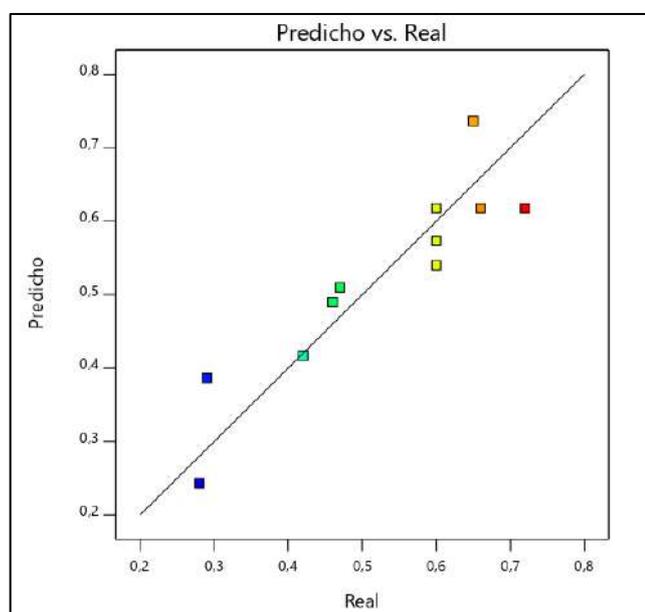


Figura 22. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h). Fuente: Elaboración propia.

Como los valores de R^2 (0,8316), R^2 ajustado (0,6631) y R^2 predicho (-0,0608) son muy bajos, en especial los dos últimos mencionados, este modelo no pudo ser válido

para predecir el comportamiento de la velocidad de consumo volumétrico de sustrato, como se puede notar en la Figura 22, donde los valores reales se alejan de los valores predichos en la mayoría de los casos, por lo que fue necesario aplicar nuevamente la técnica de selección de variables por pasos hacia atrás.

La Tabla 15 muestra el análisis de varianza luego de la eliminación de los términos correspondientes a AB y A². Con esto el valor *p* para el modelo disminuyó, siendo ahora significativo en el intervalo de confianza mencionado anteriormente. También ocurrió esto con el valor *p* de los factores del modelo, manteniendo la significancia del A y B².

La ecuación 13 representa la nueva superficie de respuesta generada luego de la eliminación de términos, la cual presentó una curvatura menos pronunciada como se puede ver en la Figura 23. El valor de R² ajustado (0,7274) y de R² predicho (0,5121) aumentó, sin embargo, estos valores siguen siendo bajos, lo que se traduce como una dificultad para el modelo a la hora de predecir la respuesta de la variable dependiente analizada, notándose en la Figura 24 como algunos valores reales se siguen alejando de los predichos en gran medida.

Tabla 15. Análisis de varianza de los factores estudiados correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato posterior a la selección de los términos significativos.

Factores	SC	GL	MC	F	P	
Modelo	0,1798	3	0,0599	9,90	0,0065	Significativo
A	0,0771	1	0,0771	12,72	0,0091	
B	0,0160	1	0,0160	2,64	0,1480	
B ²	0,0867	1	0,0867	14,32	0,0069	
Residual	0,0424	7	0,0061			
Falta de ajuste	0,0352	5	0,0070	1,96	0,3720	No significativo
Error puro	0,0072	2	0,0036			
Total	0,2222	10				
Desv. Estándar	0,0778	R²	0,8092	P.a.	9,7304	
Total	0,5227	R² aj.	0,7274			
C.V. %	14,89	R² pr.	0,5121			

A= glicerol; B= aireación; SC= suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= media cuadrática; C.V.%= coeficiente de variación; P.a.= precisión adecuada.
Fuente: Elaboración propia.

$$Q_s \left(\frac{g}{L.h} \right) = 0,6200 - 0,1133A + 0,0517B - 0,1783B^2 \quad (13)$$

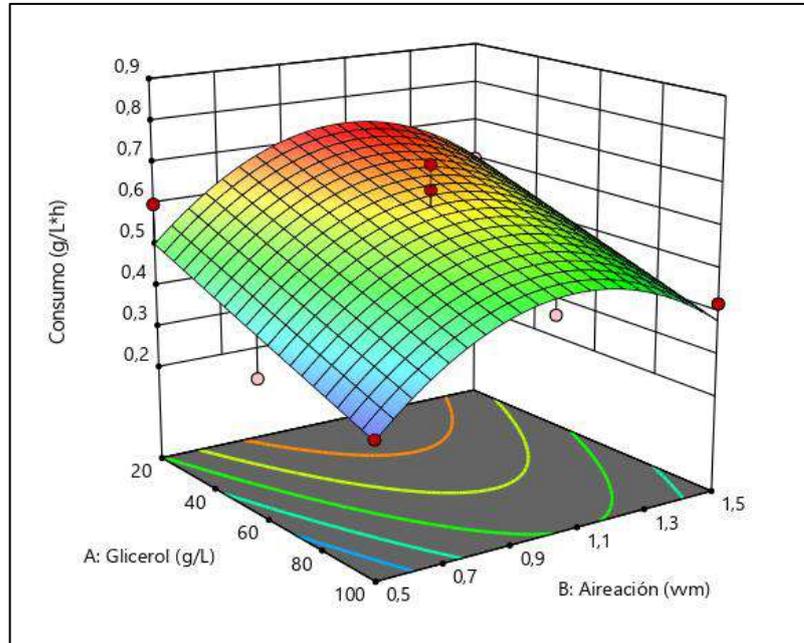


Figura 23. Superficie de respuesta correspondiente a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

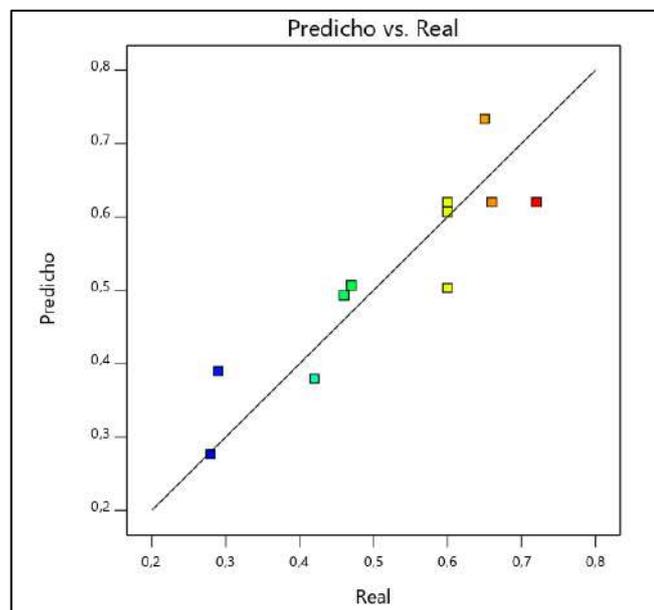


Figura 24. Relación de valores predichos por el modelo cuadrático con relación a los reales obtenidos para a la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h) en función de las variables independientes posterior a la selección de los términos significativos. Fuente: Elaboración propia.

4.4. Optimización

A partir de las superficies de respuesta obtenidas se realizó una exploración de las mismas con el fin de conocer las condiciones del experimento en donde se consiguen los valores óptimos, delimitado la búsqueda a valores dentro de la región experimental de la investigación. Este proceso fue llevado a cabo para la productividad volumétrica de biomasa.

Con el programa Design Expert se realizó la búsqueda de las condiciones óptimas. Este lo realizó partiendo de la metodología de la deseabilidad, que consiste en definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global del producto en cada punto, maximizándola, dentro de un rango entre 0 y 1, para obtener el punto óptimo buscado (Gutiérrez et al., 2008).

Dentro del programa se definió el rango de trabajo para la concentración inicial de glicerol y la aireación, 20 g/L a 100 g/L y 0,5 vvm a 1,5 vvm. En este intervalo el valor de la productividad volumétrica de biomasa óptima fue 0,29 g/L.h, obteniendo este resultado para una concentración inicial de sustrato de 20 g/L y 1,1 vvm para el flujo de aire, con una deseabilidad de 0,941. Los resultados son muy parecidos a los vistos en la experimentación, ya que los valores más altos se lograron a 20 g/L de glicerol inicial y 1,0 de aireación.

Cabe destacar que el valor óptimo, 0,29 g/L.h, fue menor al obtenido de manera experimental, 0,31 g/L.h, esto debido a que para los cálculos se tomó en cuenta la superficie de respuesta con los términos ya reducidos y a pesar de que esta posee una gran capacidad para predecir los resultados, algunos valores reales fueron diferentes a los predichos, como en este caso, en donde supera a este.

En estas condiciones el programa calculó el factor de conversión correspondiente, llegando a 0,45 g/g. Con esto se calculó la biomasa producida multiplicando la productividad volumétrica de biomasa por 24, que serían las horas de cultivo, dando como resultado 6,96 g/L de célula. También se calculó la velocidad volumétrica de consumo de sustrato, siendo este el cociente entre la productividad y el factor de conversión, dando un valor de 0,64 g/l.h, consumiendo así el 76,8% del sustrato.

4.5. Velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de generación (t_d)

Los resultados obtenidos para la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) y el tiempo se pueden ver en la Tabla 16, medidos durante la fase exponencial. El mayor valor para la primera variable dependiente se presentó para la concentración de glicerol de 20 g/L y para la máxima aireación, 1,5 vvm, por ello su tiempo de generación (t_d) fue el menor, al ser este calculado a partir de la relación entre el logaritmo neperiano de 2 y la μ_{max} . El mayor valor alcanzado por este fue para la condición de mayor concentración de sustrato (100 g/L) y menor aireación (0,5 vvm).

En la Figura 25.a se nota la tendencia que sigue la velocidad específica de crecimiento máxima, viendo valores similares para las concentraciones de 20 y 60 g/L de glicerol, habiendo una disminución de su valor para la concentración más alta. La tendencia contraria se ve para el tiempo de generación (Figura 25.b) en donde tiempos mayores fueron obtenidos para la concentración máxima.

Tabla 16. Velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de generación (t_d) para los distintos ensayos.

Ensayo	Condiciones		μ_{max} (1/h)	t_d (h)
	A	B		
1	20	0,5	0,153	4,52
2	100	0,5	0,104	6,68
3	20	1,5	0,167	4,15
4	100	1,5	0,097	7,12
5	20	1,0	0,139	4,99
6	100	1,0	0,084	8,26
7	60	0,5	0,148	4,69
8	60	1,5	0,137	5,07
9	60	1,0	0,149	4,64
10	60	1,0	0,147	4,71
11	60	1,0	0,166	4,17

A: glicerol (g/L); B: aireación (vvm); μ_{max} : velocidad máxima específica de crecimiento; t_d : tiempo de generación. Fuente: elaboración propia.

Esto podría indicar que a menor concentración de glicerol mayor es el incremento de células por hora en el medio. Mientras que para mayores concentraciones de sustrato las células presentan una reducción de la velocidad de multiplicación,

confirmando los resultados de mayor producción celular (biomasa) a la menor concentración de sustrato.

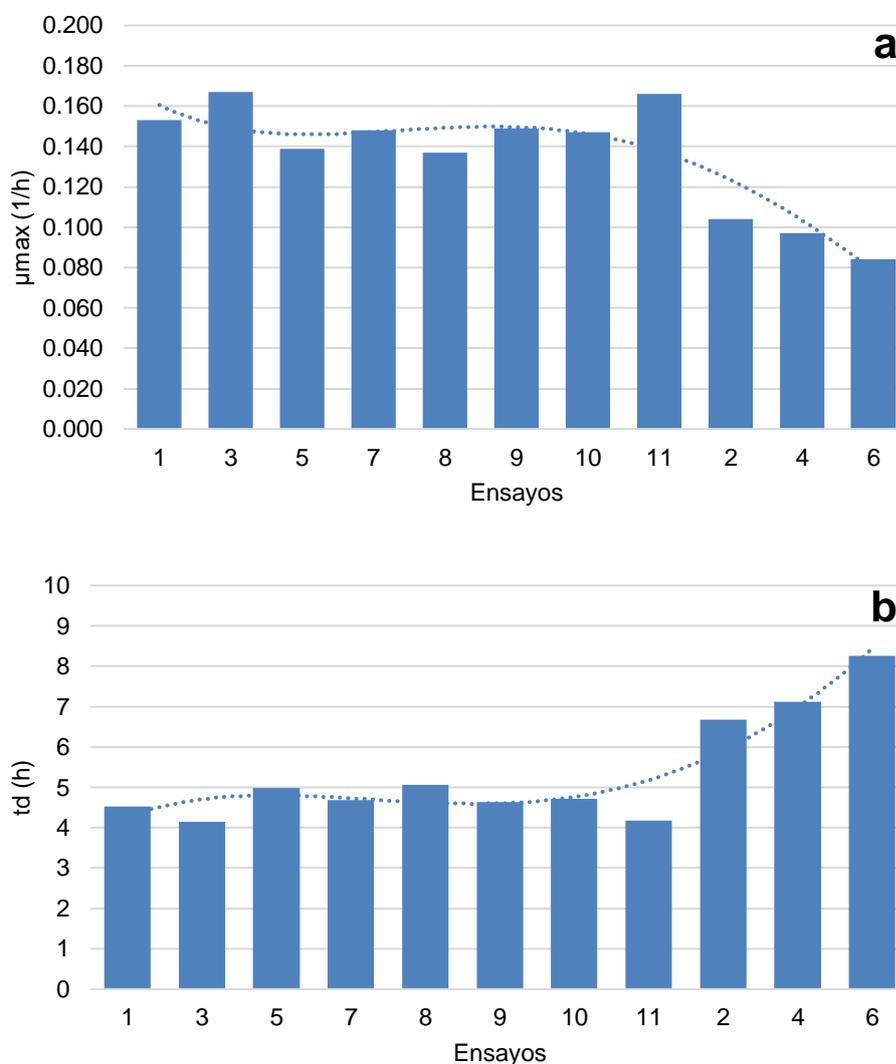


Figura 25. Velocidad específica de crecimiento máxima (a) y tiempo de generación (b) para los diferentes ensayos. Fuente: Elaboración propia.

Estos valores fueron menores a los presentados por Muller et al. (2007), que alcanzaron una velocidad específica máxima de crecimiento de $0,382 h^{-1}$, para el cultivo de *Saccharomyces boulardii* utilizando glucosa como sustrato en reactor air-lift a 1,5 vvm. En el trabajo presentado por Rivaldi et al. (2017) esta variable alcanzó un valor de $0,24 h^{-1}$ en un reactor de tanque agitado utilizando glicerol como sustrato y siendo el microorganismo *Lactobacillus plantarum*.

Comparado a estos trabajos la tasa de crecimiento es menor, habiendo alcanzado un valor máximo de $0,167 \text{ h}^{-1}$. Esto pudo ser debido a las condiciones del medio, ya que fue durante la fase exponencial donde se dificultó el control del cultivo, ya que fue en un horario sin acceso a los laboratorios, habiéndose formado espuma que inhibió la duplicación de la célula durante esta etapa. Además a la hora de armar la curva en esta fase faltaron más datos para una mayor precisión.

Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos para μ_{max} con la literatura.

Sustrato	Microorganismos	Aireación (vvm)	Tiempo (h)	μ_{max} (1/h)	Fuente
Glicerol	<i>Saccharomyces boulardii</i>	1,0	24	0,167	Este trabajo
Glicerol	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	24	0,24	Rivaldi et al. (2012)
Glucosa	<i>Saccharomyces boulardii</i>	1,5	12	0,382	Muller et al. (2007)

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

El glicerol tratado con ácido fosfórico al 85% puede ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento de biomasa probiótica *Saccharomyces boulardii*.

La concentración inicial del sustrato y la aireación mostraron ser parámetros significativos para la producción de biomasa, productividad volumétrica (Q_P), velocidad de consumo de sustrato (Q_S) y el factor de conversión ($Y_{X/S}$) durante el proceso de cultivo.

La mayor producción de biomasa (8,13 g/L) se logró a baja concentración inicial de glicerol, (20 g/L), y aireación (1,0 vvm). La misma tendencia fue presentada para el consumo de sustrato. En cambio, el proceso realizó una conversión más eficiente a una aireación aún mayor, 1,5 vvm.

La velocidad específica máxima de crecimiento fue influenciada mayormente por la concentración inicial del sustrato, alcanzando su mayor valor (0,167) para el contenido inicial de glicerol más bajo.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran el potencial que posee el glicerol como sustrato, dándole un valor agregado al mismo y pudiendo economizar la producción de microorganismos probióticos.

CAPÍTULO VI

6. SUGERENCIAS

Caracterizar el glicerol para conocer los distintos componentes del mismo, a través de técnicas que emplean FTIR, espectroscopía atómica, así como HPLC con detección de índice de refracción. Además, de ser posible, utilizar esta última técnica para la medición más precisa de la concentración del sustrato durante el cultivo.

Contar con equipos de detección de nivel de espuma, con el fin de agregar antiespumante de manera automática en caso de que el investigador no se encuentre en el laboratorio durante el cultivo.

Obtener mayor cantidad de muestras durante la fase exponencial de crecimiento, en laboratorios de libre acceso durante las 24 horas.

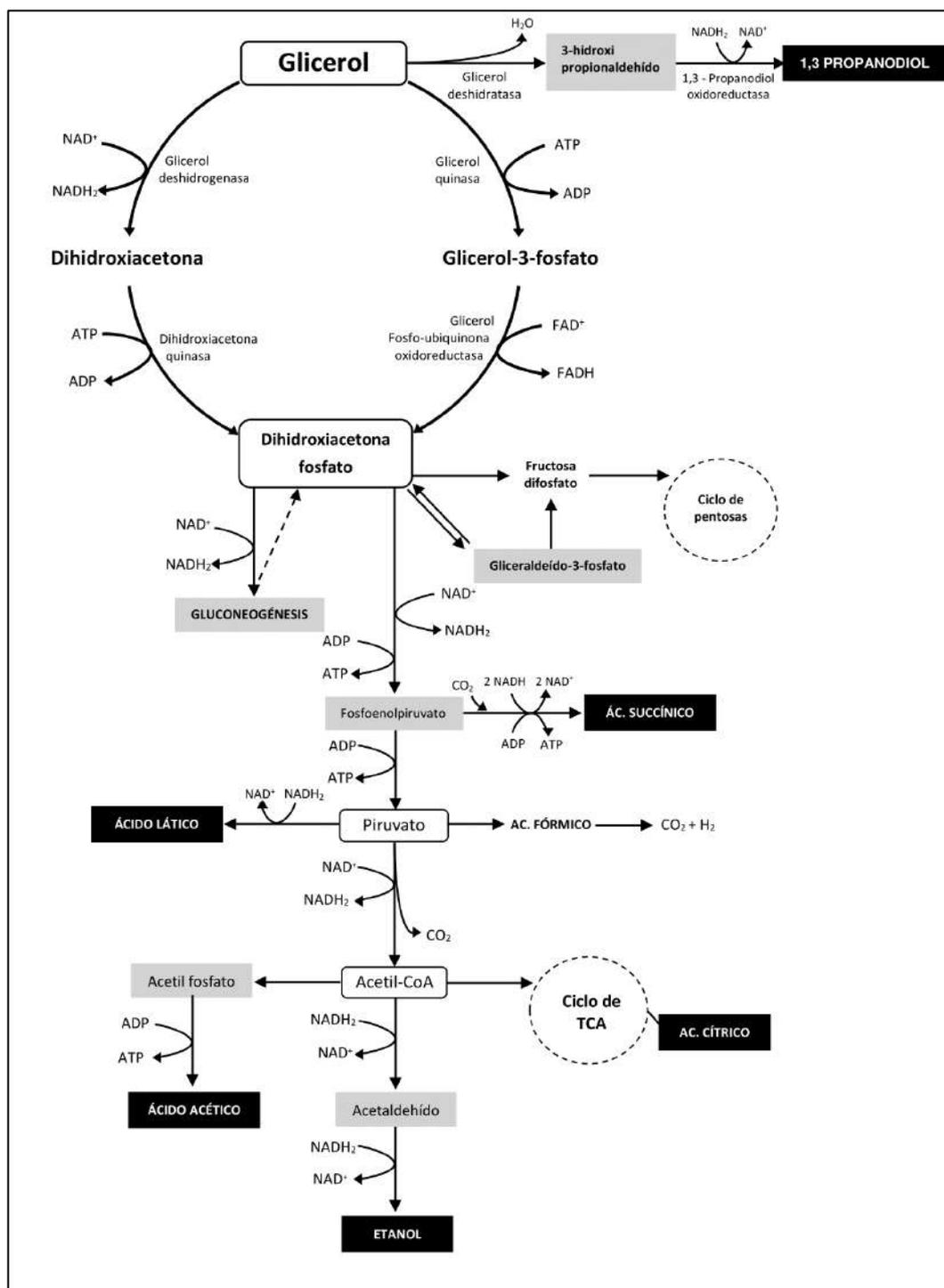
Realizar análisis a los ácidos grasos obtenidos durante la purificación para futuras investigaciones.

Evaluar las condiciones de crecimiento del *Saccharomyces boulardii* en un rango menor de concentración de sustrato.

ANEXOS

Anexo A

Figura A1. Vías del metabolismo del glicerol en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Adaptado de Rivaldi et al. (2008).



Anexo B

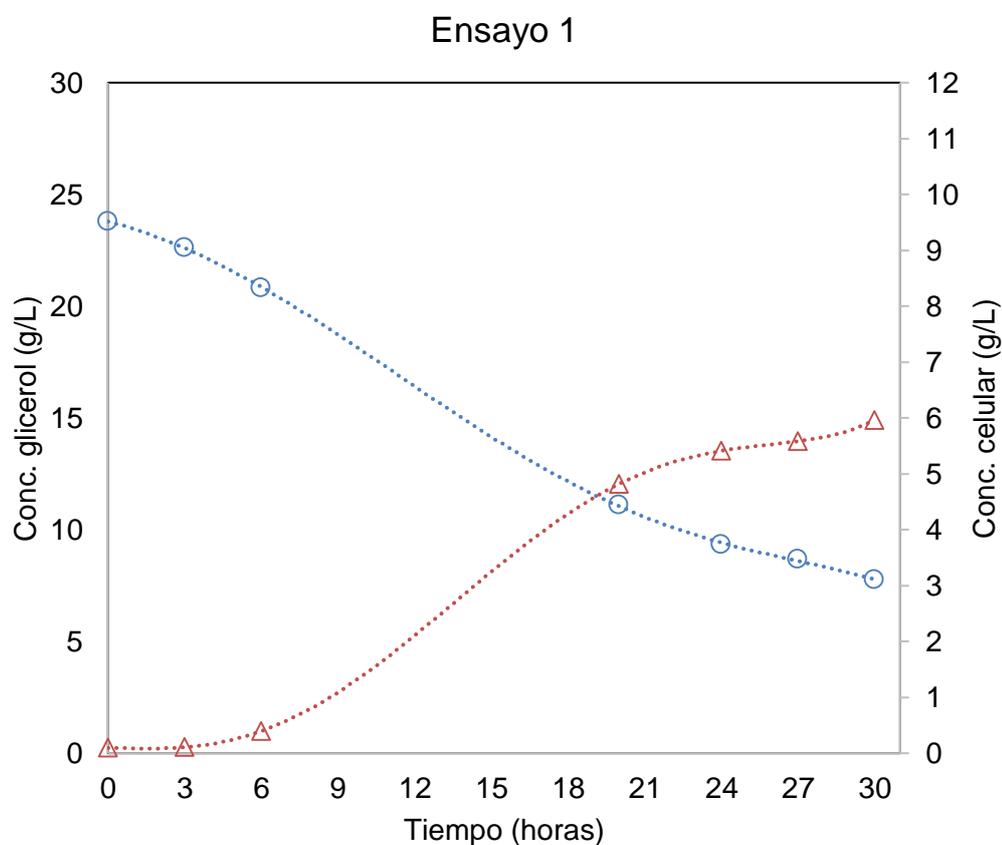


Figura B1. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 1.

Tabla B1. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 1).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	58,32	0,10	0,00	0,166	4,17	34,77
3	53,73	0,12	0,00			
6	53,47	0,19	0,02			
20	41,68	3,88	0,23			
24	41,08	4,40	0,25			
27	39,95	5,26	0,28			
30	38,04	5,85	0,28			

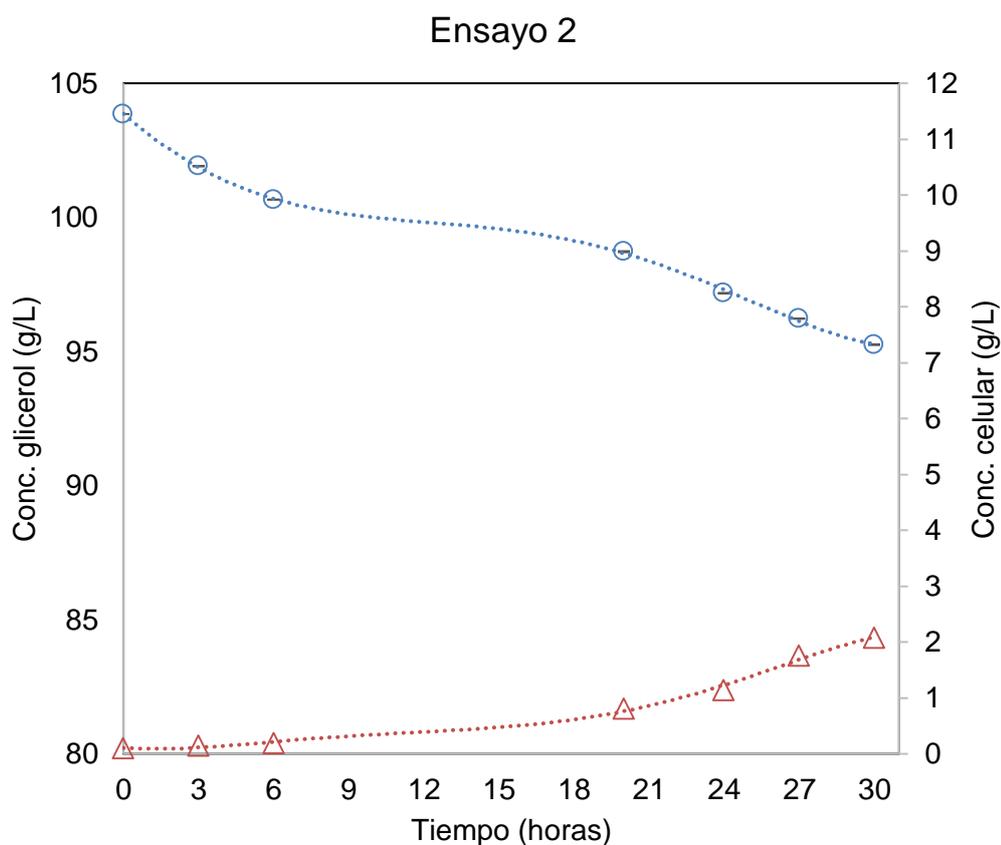


Figura B2. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 2.

Tabla B2. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 2).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	103,85	0,10	0,00	0,104	6,68	8,28
3	101,91	0,14	0,02			
6	100,66	0,19	0,03			
20	98,72	0,81	0,14			
24	97,17	1,13	0,15			
27	96,23	1,76	0,22			
30	95,25	2,07	0,23			

Ensayo 3

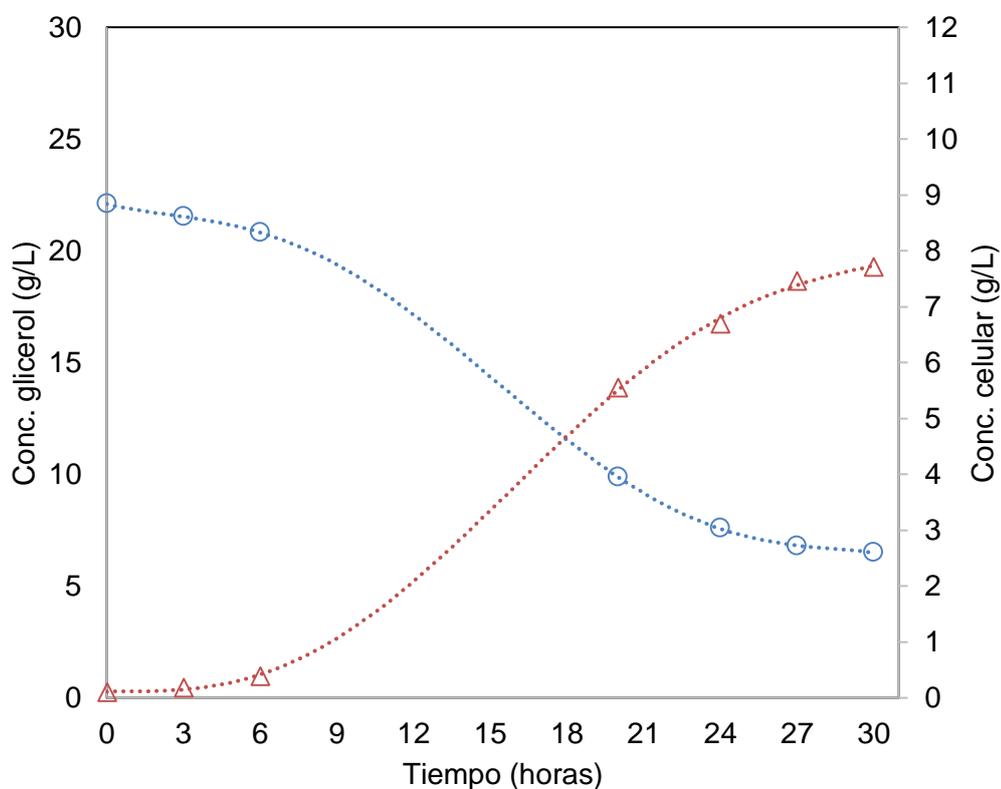


Figura B3. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 3.

Tabla B3. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 3).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	22,10	0,10	0,00	0,167	4,15	70,56
3	21,52	0,18	0,14			
6	20,83	0,39	0,22			
20	9,88	5,55	0,45			
24	7,59	6,69	0,45			
27	6,80	7,46	0,48			
30	6,50	7,71	0,49			

Ensayo 4

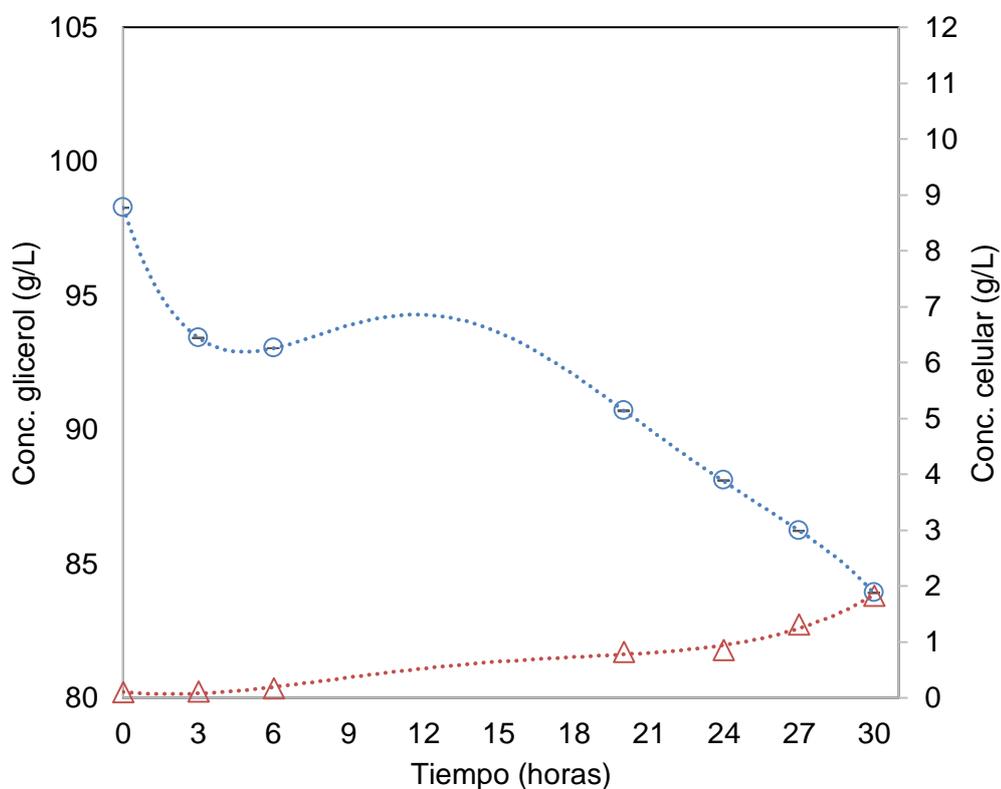


Figura B4. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 4.

Tabla B4. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 4).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	98,27	0,10	0,00	0,097	7,12	14,61
3	93,42	0,11	0,00			
6	93,04	0,17	0,01			
20	90,70	0,82	0,10			
24	88,10	0,85	0,07			
27	86,22	1,31	0,10			
30	83,91	1,82	0,12			

Ensayo 5

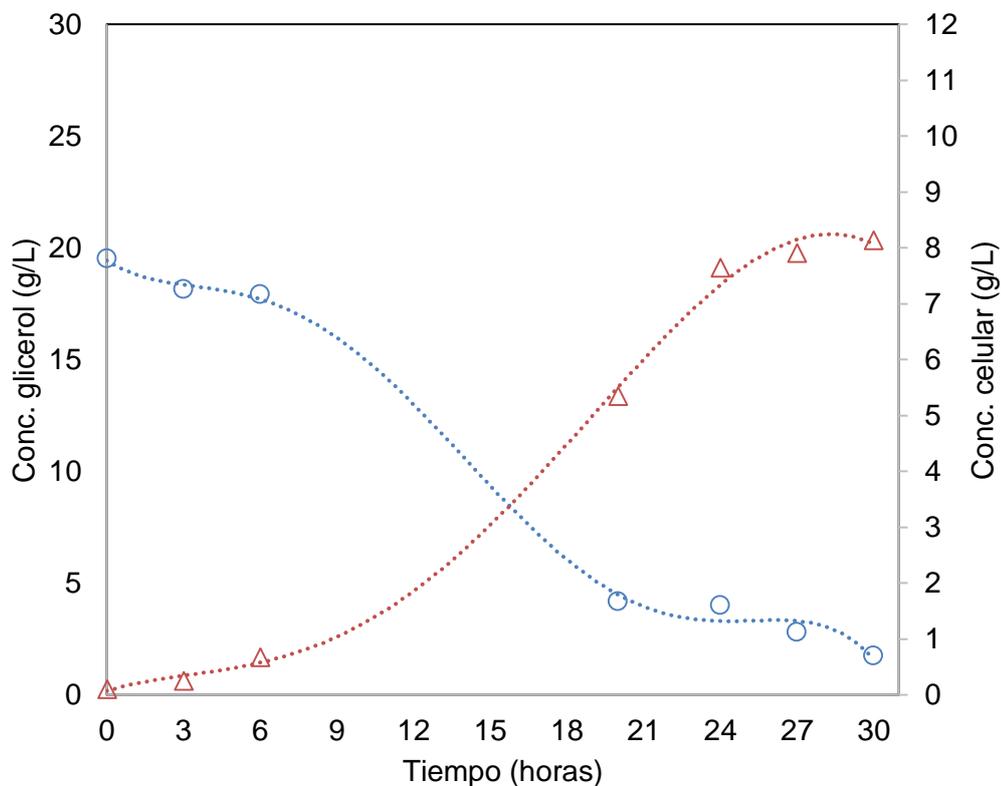


Figura B5. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 5.

Tabla B5. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 5).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	19,50	0,10	0,00	0,139	4,99	91,07
3	18,13	0,24	0,11			
6	17,89	0,67	0,35			
20	4,16	5,34	0,34			
24	3,99	7,64	0,49			
27	2,79	7,90	0,47			
30	1,74	8,13	0,45			

Ensayo 6

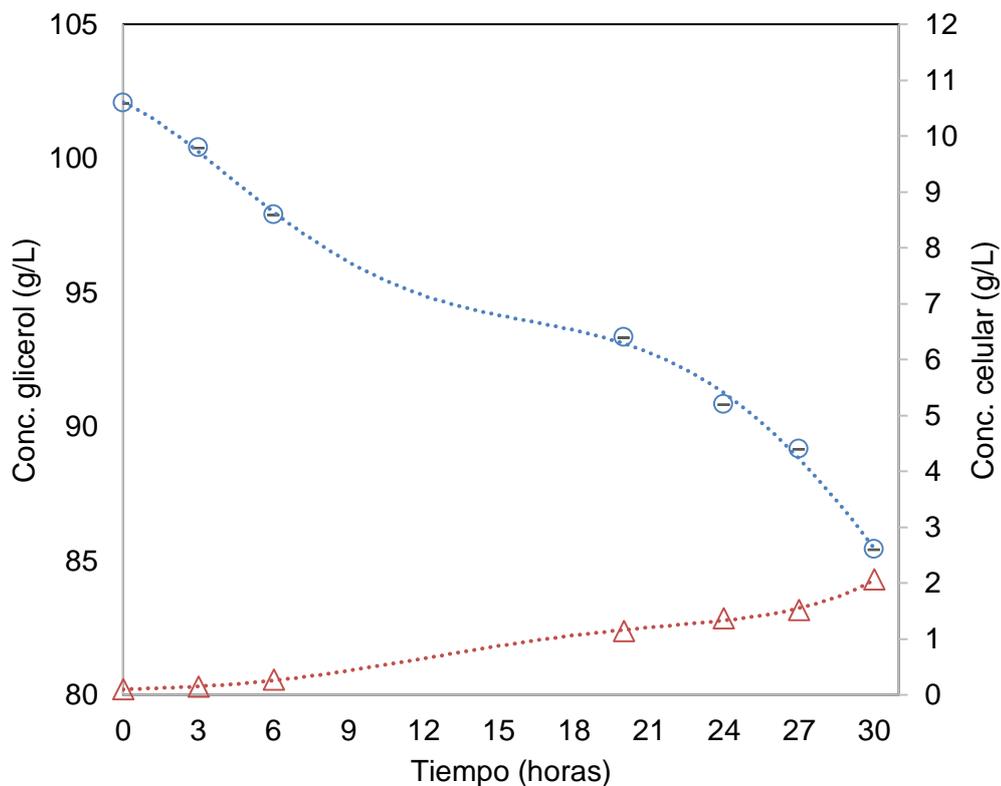


Figura B6. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 6.

Tabla B6. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 6).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	102,05	0,10	0,00	0,084	8,26	16,30
3	100,38	0,14	0,02			
6	97,89	0,27	0,04			
20	93,31	1,14	0,12			
24	90,82	1,37	0,11			
27	89,15	1,52	0,11			
30	85,41	2,06	0,12			

Ensayo 7

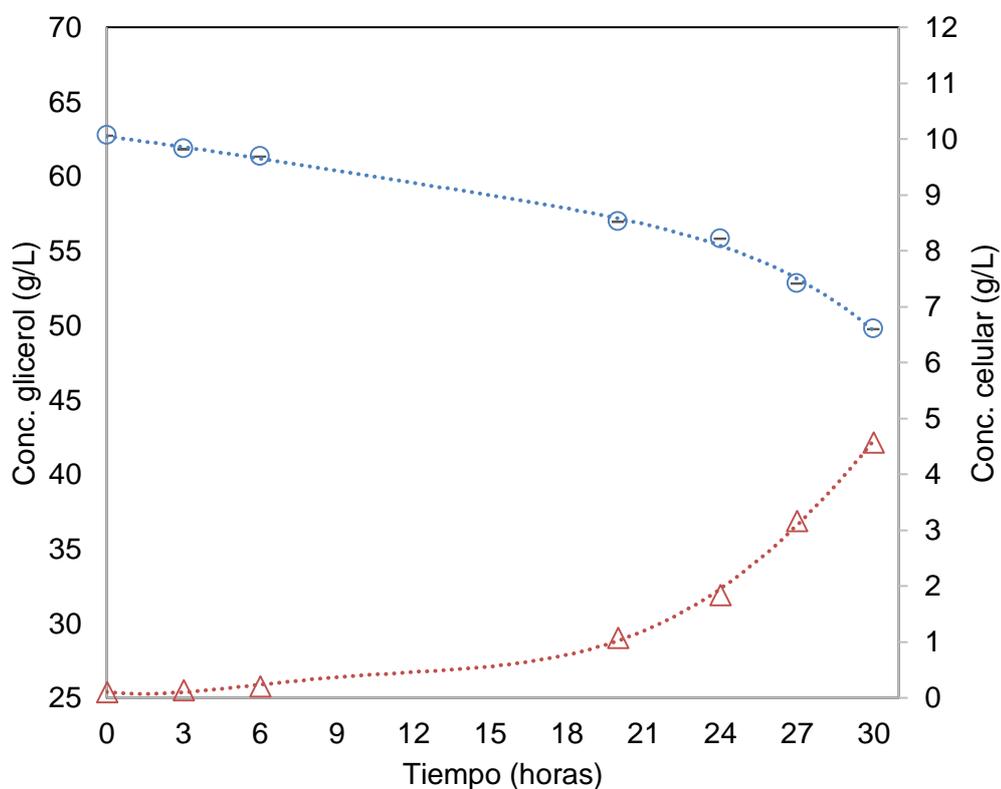


Figura B7. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 7.

Tabla B7. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 7).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	62,72	0,10	0,00	0,148	4,69	20,70
3	61,82	0,13	0,04			
6	61,32	0,21	0,07			
20	56,95	1,07	0,17			
24	55,81	1,84	0,25			
27	52,80	3,16	0,31			
30	49,74	4,57	0,34			

Ensayo 8

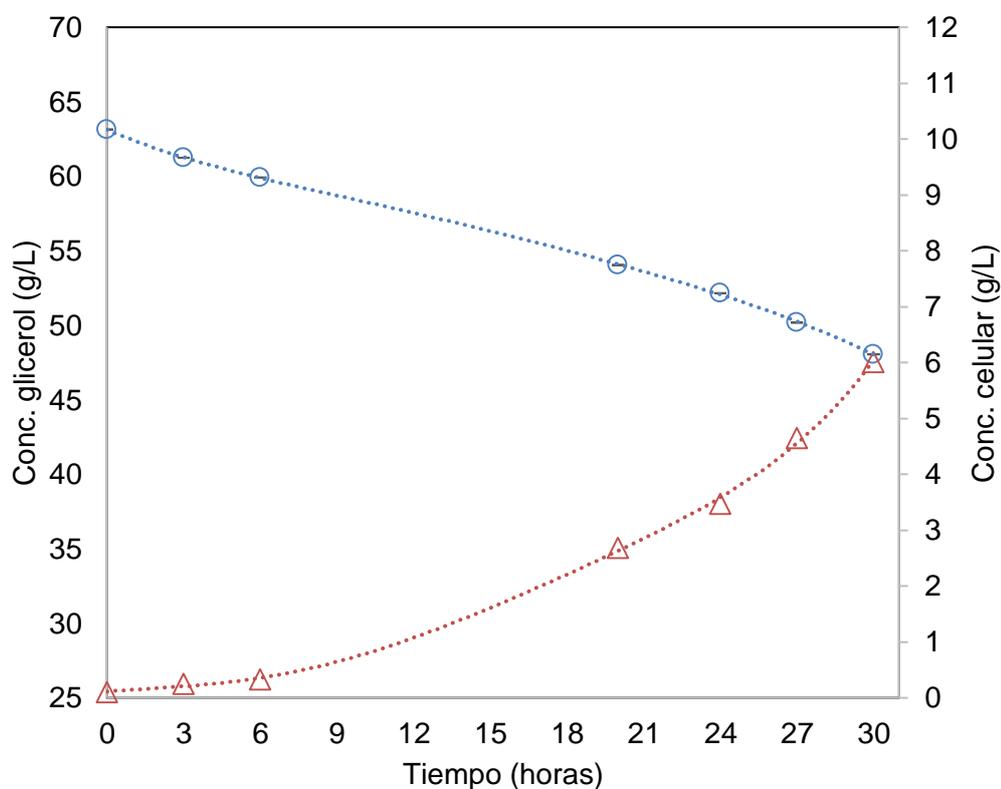


Figura B8. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 8.

Tabla B8. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 8).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	63,14	0,10	0,00	0,137	5,07	23,89
3	61,24	0,24	0,08			
6	59,92	0,32	0,07			
20	54,04	2,69	0,28			
24	52,15	3,47	0,31			
27	50,18	4,64	0,35			
30	48,06	6,01	0,39			

Ensayo 9

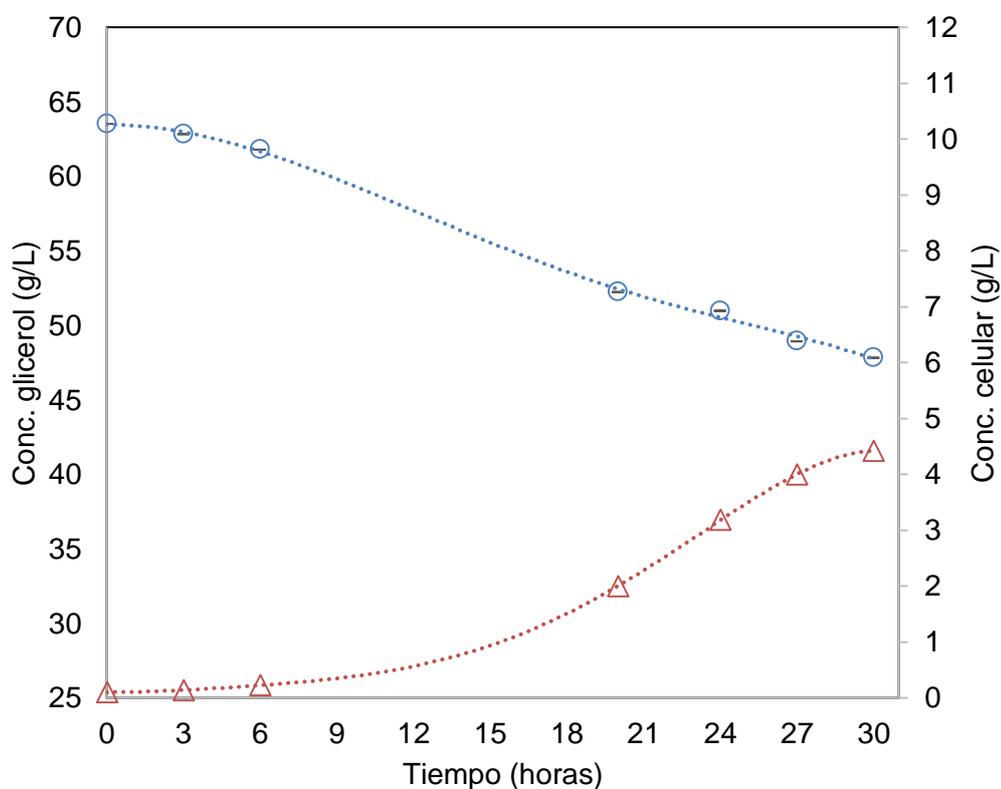


Figura B9. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 9.

Tabla B9. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 9).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	63,52	0,10	0,00	0,149	4,64	24,72
3	62,83	0,14	0,05			
6	61,79	0,22	0,07			
20	52,23	2,00	0,17			
24	50,97	3,18	0,25			
27	48,92	3,99	0,27			
30	47,82	4,42	0,28			

Ensayo 10

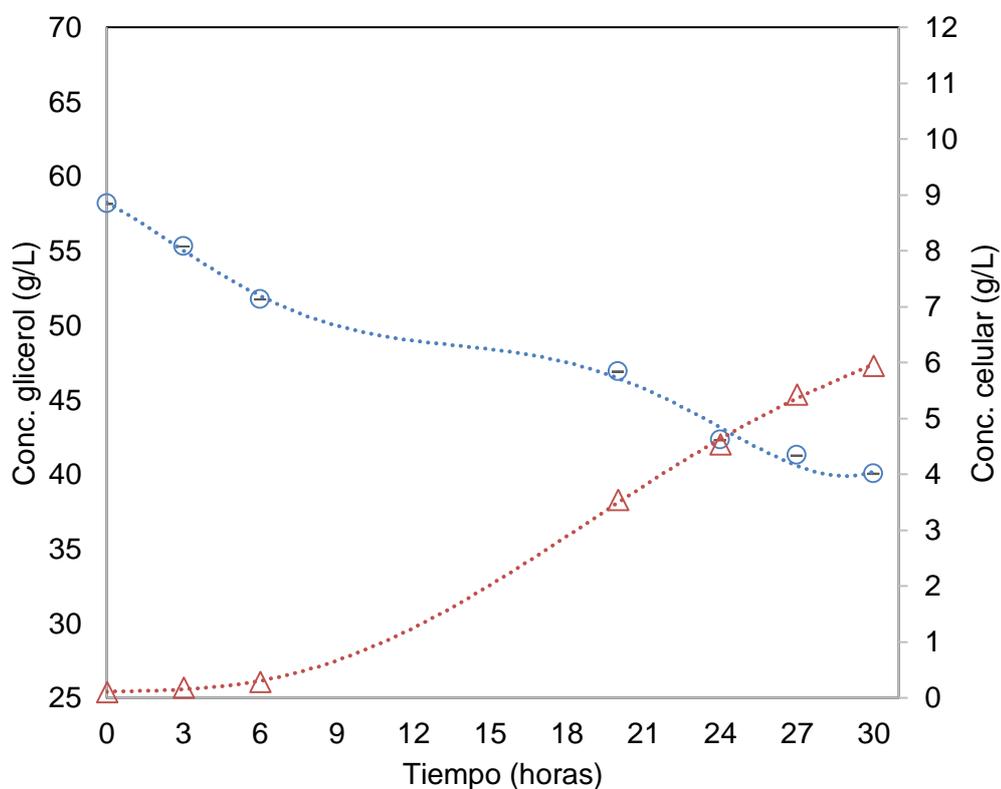


Figura B10. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 10.

Tabla B10. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 10).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	58,15	0,10	0,00	0,147	4,71	31,14
3	55,29	0,18	0,03			
6	51,73	0,28	0,03			
20	46,88	3,54	0,31			
24	42,29	4,53	0,28			
27	41,25	5,43	0,32			
30	40,04	5,94	0,32			

Ensayo 11

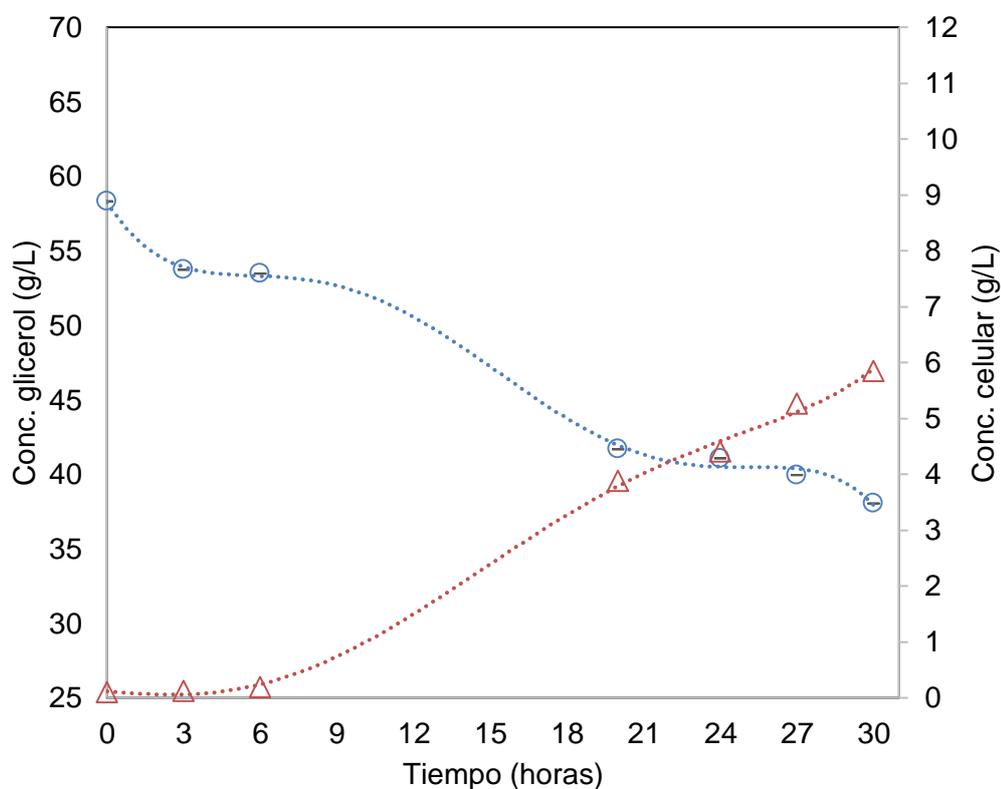


Figura B11. Curva de crecimiento celular de *Saccharomyces boulardii* (Δ) y concentración de glicerol (\circ) en función del tiempo para el ensayo 11.

Tabla B11. Resultados de los análisis del cultivo de levadura *Saccharomyces boulardii* en medio contenido con glicerol para la obtención de biomasa (Ensayo 11).

Tiempo (h)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)	Factor de conversión	μ_{\max} (1/h)	Tiempo de generación (h)	Consumo de glicerol (%)
0	58,32	0,10	0,00	0,166	4,17	34,77
3	53,73	0,12	0,00			
6	53,47	0,19	0,02			
20	41,68	3,88	0,23			
24	41,08	4,40	0,25			
27	39,95	5,26	0,28			
30	38,04	5,85	0,28			

Anexo C



Figura C1. Preparación de medio en el reactor air-lift.



Figura C2. Reactor luego de 30 h de cultivo.



Figura C3. Reactor en funcionamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abas, N., Kalair, A., & Khan, N. (2015). Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69, 31–49.
- Aguilar, C. B., Prado, R. D., Castellanos, L., & Silva, C. N. (2016). Características De La Glicerina Generada En La Producción De Biodiesel, Aplicaciones Generales Y Su Uso En El Suelo. *Cultivos Tropicales*, 7-14.
- AL-Mashhadani, M., Wilkinson, S., & Zimmerman, W. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chemical Engineering Science*, 137, 243–253.
- Anitha, M., Kamarudin, S., & Kofli, N. (2016). The potential of glycerol as a value-added commodity. *Chemical Engineering Journal*, 295, 119–130.
- Ardi, M., Aroua, M., & Hashim, N. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1164–1173.
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En B. O. Arredondo-Vega, & D. Voltolina, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (págs. 21-29). La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Beristain-Bauza, S., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 64–78.
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Kumar, R., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., Kumar, R., & Palani, S. (2014). Biodiesel production using chemical and biological methods - A review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 368-382.

- Blieck, J., Affouard, F., Bordat, P., Lerbret, A., & Descamps, M. (2005). Molecular dynamics simulations of glycerol glass-forming liquid. *Chemical Physics*, 317. 253–257.
- Bondioli, P., & Della Bella, L. (2005). An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 153–157.
- Bzducha-Wróbel, A., Kieliszek, M., & Błażej, S. (2013). Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *European Food Research and Technology*, 489-499.
- Casóla, L., & Freier, A. (2018). El nexo entre cambio climático y energía renovable en el Mercosur. Un análisis comparativo de las legislaciones de Argentina y Brasil. *Revista Derecho Del Estado*, 40, 153–179.
- Castillo Baron, L. V. (2016). Probióticos y prebióticos como alimentos funcionales en nutrición animal. *Zoociencia*, 3(2), 15–21.
- Chatzifragkou, A., & Papanikolaou, S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 13–27.
- Christy, S., Noschese, A., Lomelí-Rodríguez, M., Greeves, N., & Lopez-Sanchez, J. A. (2018). Recent progress in the synthesis and applications of glycerol carbonate. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 99–107.
- Cornejo, A., Barrio, I., Campoy, M., Lázaro, J., & Navarrete, B. (2017). Oxygenated fuel additives from glycerol valorization. Main production pathways and effects on fuel properties and engine performance: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79. 1400-1413.

- Coronado, C. R., Carvalho, J. A., Quispe, C. A., & Sotomonte, C. R. (2014). Ecological efficiency in glycerol combustion. *Applied Thermal Engineering*, 97-104.
- Cray, J., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S., Eleutherio, E., Ezeji, T., . . . Hallsworth, J. (2015). Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 228-259.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 767–778.
- de Paula, B. P., Chávez, D. W., Lemos Junior, W. J., Guerra, A. F., Corrêa, M. F., Pereira, K. S., & Coelho, M. A. (2019). Growth Parameters and Survivability of *Saccharomyces boulardii* for Probiotic Alcoholic Beverages Development. *Frontiers in Microbiology*, 10. 1-10.
- Dinleyici, E. C., Eren, M., Ozen, M., Yargic, Z. A., & Vandenplas, Y. (2012). Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(4), 395–410.
- Dinleyici, M., & Vandenplas, Y. (2019). Clostridium difficile Colitis Prevention and Treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1125, 139–146.
- Du, L., Hao, R., Xiao, D., Guo, L., & Gai, W. (2012). Research on the characteristics and culture conditions of *Saccharomyces boulardii*. *Advanced Materials Research*, 343–344, 594–598.
- Duong, H., Wu, Y., Sutor, A., Burek, B., Hollmann, F., & Bloh, J. (2021). Intensification of Photobiocatalytic Decarboxylation of Fatty Acids for the Production of Biodiesel. *ChemSusChem*, 1053-1056.
- Elsayed, E., & El Enshasy, H. (2018). Effects of different aeration rates and feeding strategies on cell growth and invertase production kinetics by

- Saccharomyces boulardii*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 575-582.
- FAO, O. d. (2013). *La Bioenergía en América Latina y El Caribe*. Santiago.
- FAO/WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, Argentina.
- Farinazzo, F. S., Farinazzo, E. S., Spinosa, W. A., & Garcia, S. (2017). *Saccharomyces boulardii*: Optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp. *Food Science and Biotechnology*, 26. 4. 969-977.
- Feizizadeh, S., Salehi-Abargouei, A., & Akbari, V. (2014). Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute diarrhea. *Pediatrics*, 134(1).
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 33-40.
- Gaboardi, G., Gil de los Santos, D., Mendes, L., Centeno, L., Meireles, T., Vargas, S., Conceição, F. R. (2018). Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. *Journal of Environmental Management*, 226. 180-186.
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927–939.
- Guieysse, B., Quijano, G., & Muñoz, R. (2011). Airlift Bioreactors. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 201-212.
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. (2013). Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 113–119.
- Hernández, D., Fernández, J., Mondragón, F., & López, D. (2012). Production and utilization performance of a glycerol derived additive for diesel engines. *Fuel*, 130-136.
- Holmes, W., Smith, R., & Bill, R. (2006). Evaluation of antifoams in the expression of a recombinant FC fusion protein in shake flask cultures of *Saccharomyces cerevisiae* & *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 1-3.
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S. D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*, 100, 63–73.
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., & Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921.
- IEA, I. (2021). *Oil 2021 - Analysis and forecast to 2026*.
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J., & Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, 878-893.
- Konings, W. (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 325-342.
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 252-255.
- Lages, F., & Lucas, C. (1995). Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast*, 111-119.

- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., & Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 892-898.
- Lee, J. S., Kacem, N., Kim, W. S., Peng, D. Q., Kim, Y. J., Joung, Y. G., Lee, H. G. (2019). Effect of *Saccharomyces boulardii* supplementation on performance and physiological traits of holstein calves under heat stress conditions. *Animals*, 9(8). 1-10.
- Lelieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Burnett, R., Haines, A., & Ramanathan, V. (2019). Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7192-7197.
- Leoneti, A. B., Aragão-Leoneti, V., & de Oliveira, S. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 138-145.
- Luo, X., Ge, X., Cui, S., & Li, Y. (2016). Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. *Bioresource Technology*, 144-154.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W., Prior, B., Ramos, J., Thevelein, J., & Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO Journal*, 1360-1371.
- Manafi, M., Hedayati, M., & Mirzaie, S. (2018). Probiotic *Bacillus* species and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broiler chickens. *South African Journal of Animal Sciences*, 48(2), 379–389.

- Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., & Caetan, C. (2019). Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in european countries. *Energies*, 12(6), 1–11.
- Mayorga Betancourt, M. &. (2012). Aprovechamiento Integral Del Glicerol Residual En La Industria Del Biodiesel: Caso 1,3-Propanodiol (1,3-Pd). *Tecciencia*, 6(12), 80–93.
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2202–2222.
- McFarland, L. V., Ozen, M., Dinleyici, E. C., & Goh, S. (2016). Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 22(11), 3078–3104.
- Melero, J. A., Vicente, G., Paniagua, M., Morales, G., & Muñoz, P. (2012). Etherification of biodiesel-derived glycerol with ethanol for fuel formulation over sulfonic modified catalysts. *Bioresource Technology*, 103(1), 142–151.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1334–1346.
- Mishra, V. K., & Goswami, R. (2018). A review of production, properties and advantages of biodiesel. *Biofuels*, 273-289.
- Moayyedi, P., Ford, A. C., Talley, N. J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A. E., Brandt, L. J., & Quigley, E. M. (2010). The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review. *Gut*, 59(3), 325–332.
- Monteiro, M. R., Kugelmeier, C. L., Pinheiro, R. S., Batalha, M. O., & da Silva César, A. (2018). Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109–122.

- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. LIMUSA S.A.
- Moré, M., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis - A review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 8, 237–255.
- Morrow, S. (14 de Enero de 2021). *Anadolu Agency*. Obtenido de <https://www.aa.com.tr/es/mundo/la-oep-afirma-que-la-demanda-mundial-de-petr%C3%B3leo-aumentar%C3%A1-en-un-6-5-en-2021/2110431#>
- Mota, C. J., Pinto, B. P., & de Lima, A. L. (2017). Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry. *Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry*, 1–110.
- Muller, J. L., Protti, K. L., Machado, M. D., De Lacerda, L. L., Bresolin, T. M., & Podlech, P. S. (2007). Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, V27. 4. 688-693.
- Nanda, M., Yuan, Z., & Qin, W. (2014). Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and product characterization. *Austin Journal of Chemical Engineering*, 1-7.
- Ochoa-Estopier, A., Lesage, J., Gorret, N., & Guillouet, S. (2011). Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresource Technology*, 1521-1527.
- Oliveira, F., Suarez, P., & Santos, W. (2008). Biodiesel: Possibilidades e Desafios. *Química Nova na Escola*, 3-8
- Pelletier, X., Laure-Boussuge, S., & Donazzolo, Y. (2001). Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: Importance of the live flora. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(6), 509–512.

- Posada-Duque, J. A., & Cardona-Alzate, C. A. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel. *Ingeniería y Universidad*, 14(1). 9-28.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M., Montiel, V., García, R., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 693-701.
- Quispe, C., Coronado, C., & Carvalho, J. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475–493.
- REN21. (2021). *Renewables 2021 Global Status Report*. París.
- Reis, M., Freitas, F., Lachter, E., Gil, R., Nascimento, R., Poubel, R., & Borré, L. (2015). Produção de biodiesel a partir de ácidos graxos provenientes do refino de óleos vegetais via catálise ácida heterogênea e micro-ondas. *Quimica Nova*, 1307-1312.
- Rivaldi, J. D., Duarte, L., Rodrigues, R., Filho, H. J., Felipe, M., & de Mancilha, I. M. (2017). Valorization of glycerol from biodiesel industries as a renewable substrate for co-producing probiotic bacteria biomass and acetic acid. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(1), 81–90.
- Rivaldi, J. D., Sarrouh, B. F., & Fiorilo, R. (2008). Estratégias biotecnológicas para a utilização de glicerol gerado da produção de biodiesel.
- Rivaldi, J. D., Sarrouh, B. F., De Freitas Branco, R., De Mancilha, I. M., & Da Silva, S. S. (2012). Biotechnological Utilization of Biodiesel-Derived Glycerol for the Production of Ribonucleotides and Microbial Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2054-2067.
- Rivaldi, J. D., Sousa Silva, M. L., Duarte, L., Ferreira, A., Cordeiro, C., De Almeida Felipe, M., . . . De Mancilha, I. (2013). Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1735-1743.
- Roos, T. B., de Moraes, C. M., Sturbelle, R. T., Dummer, L. A., Fischer, G., & Leite, F. P. (2018). Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces*

- boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science*, 117, 260-265.
- Roos, T., Avila, L., Sturbelle, R., Leite, F., Fischer, G., & Leite, F. (2018). *Saccharomyces boulardii* modulates and improves the immune response to Bovine Herpesvirus type 5 Vaccine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 375-381.
- Saad, S. M. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 1–16.
- Salimon, J., Salih, N., & Yousif, E. (2012). Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 135-145.
- Schwengber, C. A., Alves, H. J., Schaffner, R. A., Da Silva, F. A., Sequinel, R., Bach, V. R., & Ferracin, R. J. (2016). Overview of glycerol reforming for hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 259-266.
- Sen, S., & Mansell, T. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*.
- Sharma, S. P., & Sharma, R. (2020). Functional food probiotic: Impact on human health. *Journal of Critical Reviews*, 7(10), 1032–1036.
- Siles, J., Martín, M., Chica, A., & Martín, A. (2010). Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, 6315-6321.
- Suárez-machín, C., & Guevara-rodríguez, C. A. (2017). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 51(2), 21–30.
- Tchakouteu, S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of

- substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 118. 911-927.
- van Zyl, P. J., Kilian, S. G., & Prior, B. A. (1990). The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 231-235.
- Vardar-Sukan, F. (1998). Foaming: Consequences, prevention and destruction. *Biotechnology Advances*, 913-948.
- Venkataramanan, K., Boatman, J., Kurniawan, Y., Taconi, K., Bothun, G., & Scholz, C. (2012). Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1325-1335.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449–458.
- Xiao, Y., Xiao, G., & Varma, A. (2013). A universal procedure for crude glycerol purification from different feedstocks in biodiesel production: Experimental and simulation study. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 14291-14296.
- Xu, Y., Luo, L., & Yuan, J. (2011). CFD simulations to portray the bubble distribution and the hydrodynamics in an annulus sparged air-lift bioreactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(2), 360–368.