

Utilización de subproductos industriales para la producción de levaduras oleaginosas como materia prima alternativa de biodiésel

B.C. Adalgisa Martínez-Silveira

*Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química, Udelar*

2 de marzo 2020

Directores de tesis: Dra. Silvana Vero
Dra. Caterina Rufo

Utilización de subproductos industriales para la producción de levaduras oleaginosas como materia prima alternativa de biodiésel

Adalgisa Martínez Silveira

Trabajo presentado para obtener el título de

DOCTOR EN QUÍMICA

Directores de Tesis:

Dra. Silvana Vero

Dra. Caterina Rufo

Tribunal evaluador:

Prof. M^a Pía Cerdeiras

Prof. Claudia Lareo

Dra. Silvia Batista

PEDECIBA Química

Área Microbiología, DEPBIO

Facultad de Química, Universidad de la República

Marzo 2020

Agradecimientos

A Silvana y Caterina, por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por aceptarme como su estudiante. Por su apoyo, por las oportunidades, por el tiempo dedicado, por la confianza y por tenerme mucha paciencia a lo largo de estos casi 7 años. Agradecerles por su gran generosidad en lo laboral y en lo personal y sobre todo su gran calidez humana, ante todo.

A los miembros el tribunal, por aceptar ser parte del mismo y agradecerles especialmente por considerar el pedido especial de leer la tesis en tiempo récord.

A las diferentes agencias financiadoras que hicieron posible este proyecto de investigación. A ANII y CAP por las becas de maestría y doctorado. A CSIC por la financiación del proyecto en el cual se enmarcó mi tesis de doctorado Al Instituto Antártico Uruguayo por permitirme viajar a la Base Científica Antártica Artigas. Al PEDECIBA, por brindarme las alcuotas de estudiante y por estar siempre a disposición de los estudiantes del programa.

A Germán Panissa y Andrés Pena de ALUR que nos proporcionaron los diferentes subproductos que usados durante este proyecto.

A Camilo Bouzas y Mónica Cirese del Laboratorio de Cereales y Oleaginosos de ALUR por la ayuda con los análisis del biodiésel.

A la Cátedra de Farmacognosia y Bioquímica por compartir sus equipos, su conocimiento y siempre recibirme de la mejor manera.

A Sebastián Cavalitto del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, (UNLP-CONICET) por abrirme las puertas de su laboratorio y por enseñarme a querer a los fermentadores. A los integrantes del Laboratorio 1 del CINDEFI por ayudarme en lo académico y hacer que mi estadía en La Plata fuera mucho más amena.

A Romina e Irene que fueron una parte muy importante de esta tesis.

A Giannina y Sole por ayudarme siempre en todo, por hacerme sentir parte del laboratorio de Alimentos, por el servicio de correo y sobre todo por ser tan buenas compañeras.

A mis compañeros de la Cátedra de Microbiología, por la ayuda, por hacerme sentir que puedo contar con ellos ante cualquier inquietud o problema, por todas las instancias compartidas, por el buen ambiente de trabajo y por aguantar mis rezongos.

Un agradecimiento muy especial, a mis compañeras del “14”, por ser una familia, por la ayuda, por el apoyo, por la preocupación, por el cariño y por todo lo compartido. Estos años no hubieran sido lo mismo sin ustedes ¡las quiero! A el 14 retro, muchas ya no están, pero fueron parte importante de este camino. A Gabi por su sensatez, confianza y ser una gran persona conmigo. A Silvana mi hermana mayor. A Pauli y Sole que siempre están ahí y me cuidan.

A mis amigos, los juveniles, las de paso, las bioquímicas y los del crossfit, todos han hecho que este camino sea más fácil.

A mi madre que hizo muchos sacrificios para que yo pudiera estudiar. Y que aun estando lejos, siempre me ha ayudado y apoyado en todo. A mi hermano y familia que están siempre al firme. A Liliana la madre-suegra que la vida me dio, por su preocupación y apoyo de siempre, y a su familia que me han hecho siempre sentirme parte. Y en especial quiero agradecerle a mi familia, los Martínez que son muchos, pero siempre están ahí alentando, dando amor y apoyándome incondicionalmente.

A Agustín, mi amor y compañero, por ser un pilar en mi vida, ayudándome en TODO, desde cocinarme, acompañarme a sacar muestras los domingos, mimarme y mal enseñarme. Por el aliento diario, por la contención, por siempre intentar que sea mejor persona y aguantarme hasta en mis peores días. ¡Mi vida no sería lo mismo sin tu apoyo, y el de la hiji!.

Por último, quiero agradecer a mi abuela Brenda que fue quien me enseñó que con sacrificio y trabajo duro todo se logra, y que en la vida hay que ser agradecido. Y Abuela aún no me pagan horas extras....

Resumen

La producción de biodiésel está creciendo sostenidamente a nivel mundial, siendo varios los beneficios de este combustible, incluyendo un menor efecto adverso al medioambiente, la utilización de materias primas renovables y por lo tanto una reducción en la dependencia de los combustibles fósiles. El biodiésel se genera por esterificación de ácidos grasos provenientes de triglicéridos de diferentes orígenes con alcoholes de cadena corta. Los triglicéridos más utilizados como materia prima para este combustible son de origen vegetal. Sin embargo, los altos costos de obtención de los aceites vegetales y la competencia con el sector alimentario han impulsado la exploración de materias primas alternativas como los triglicéridos acumulados intracelularmente por levaduras oleaginosas. Dichas levaduras son capaces de acumular en su citoplasma triglicéridos en niveles superiores al 20% de su biomasa seca, con una composición de ácidos grasos similar a la de los cultivos oleaginosos.

Actualmente la producción de biodiésel a partir de microorganismos no está considerada económicamente viable. En el caso de las levaduras, se podría lograr un proceso económicamente competitivo mediante el uso de medios de cultivo de bajo costo basados en subproductos industriales y la implementación de procesos de *downstream* rentables.

En esta tesis se aislaron, identificaron y caracterizaron 58 levaduras antárticas y se exploró su capacidad de acumular triglicéridos intracelulares. Se identificaron 21 cepas como potenciales oleaginosas, describiéndose 2 especies, *Candida glabrosa* y *Leucosporidiella fragaria*, no caracterizadas previamente como oleaginosas. La levadura *C. glabrosa* 12D fue la que tuvo mayor capacidad de acumulación de lípidos intracelulares, y su perfil de ácidos grasos resultó adecuado para su uso como materia prima para biodiésel. Se estudió el crecimiento y la acumulación de lípidos de dos cepas de levadura, *C. glabrosa* 12D y *Rhodotorula graminis* S1/2R (seleccionada en un trabajo anterior) a nivel de matraz y fermentador en medios a base de vinaza (subproducto de la producción de etanol) suplementados con melaza (subproducto de la industria azucarera) o con glicerina cruda (subproducto de la producción de biodiésel),

respectivamente. En ambos casos se obtuvieron buenos rendimientos y una composición de lípidos a partir de los cuales se podría obtener biodiésel de buena calidad.

Para la obtención de biodiésel a partir de los triglicéridos intracelulares de las levaduras, se realizaron estudios de transesterificación directa sobre la biomasa microbiana, lográndose definir las condiciones óptimas para alcanzar un rendimiento máximo en el menor tiempo de reacción. Utilizando una relación de metanol a biomasa de 60: 1, 0.4 M de H_2SO_4 e incubando a 70°C durante 3 h, a partir de la biomasa seca de las levaduras, se obtuvo un rendimiento 23% mayor que el obtenido con el método en dos pasos, en el que se extrajeron primero los ácidos grasos de la levadura y luego se esterifican con metanol. La composición de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenida a partir de lípidos por transesterificación directa cumplió con los estándares uruguayos para el biodiésel.

En suma, en esta tesis se determinaron condiciones de cultivo para la máxima acumulación de lípidos para las levaduras *C. glabrosa* 12D y *R. graminis* S1/2R utilizando vinaza, melaza y glicerina cruda y se optimizó un método que permite la obtención de biodiésel directamente de la biomasa. Estos resultados contribuyen al desarrollo de la producción de biodiésel.

Índice

Introducción	18
Situación Estratégica	19
Biodiésel	22
Materias primas para biodiésel	23
Microorganismos oleaginosos	24
Levaduras oleaginosas	25
Uso de subproductos en la producción de levaduras oleaginosas	27
Producción de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas	29
Objetivos	31
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
Estructura de la tesis	32
Capítulo I	
Búsqueda y caracterización de levaduras oleaginosas	33
I.1. Introducción al capítulo	34
I.2. Materiales y métodos	
I.2.1. Sitios de muestreo:	37
I.2.2. Procesamiento de muestra y aislamiento de levaduras:	37
I.2.3. Identificación de levaduras:	38
I.2.4. Diversidad de levaduras cultivables:	39
I.2.5. Determinación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los aislamientos de levaduras:	40
I.2.6. <i>Screening</i> de levaduras oleaginosas:	40
I.2.7. Determinación del contenido de lípidos saponificables intracelulares y del porcentaje de acumulación:	41
I.2.8. Determinación de perfiles de ácidos grasos de los lípidos acumulados a diferentes temperaturas:	42
I.2.9. Temperatura de crecimiento de la cepa seleccionada:	43
I.2.10. Asimilación de fuentes carbonadas:	44
I.3. Resultados	45
I.3.1. Aislamiento de levaduras:	45
I.3.2. Identificación de levaduras:	47
I.3.3. Diversidad de levaduras cultivables:	50

I.3.4.	<i>Screening</i> de levaduras oleaginosas:	51
I.3.5.	Determinación de lípidos saponificables intracelulares y porcentaje de acumulación:	54
I.3.6.	Determinación de lípidos saponificables y perfiles de ácidos grasos de los lípidos acumulados a diferentes temperaturas:	56
I.3.7.	Temperatura de crecimiento de la cepa seleccionada:	61
I.3.8.	Asimilación de fuentes carbonadas:	62
I.4.	Discusión del capítulo	63

Capítulo II

Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas 67

II.1. Introducción al capítulo..... 68

II.2. Materiales y métodos

II.2.1.	Melaza y vinaza de caña de azúcar:	69
II.2.2.	Determinación de la concentración de melaza que no inhiba el crecimiento de la cepa seleccionada:	69
II.2.3.	Determinación del efecto de la melaza en la acumulación de lípidos:	70
II.2.4.	Determinación de componentes del medio que influyen en la producción de biomasa y acumulación de lípidos intracelulares:	70
II.2.5.	Sustitución de componentes del medio acumulación por vinaza de caña de azúcar:	71
II.2.6.	Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:	72
II.2.7.	Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza de caña de azúcar en <i>batch</i> :	72
II.2.8.	Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza de caña, cultivo alimentado:	73
II.2.9.	Determinación de la calidad de la mezcla de FAMES obtenida:	74
II.2.10.	Métodos analíticos:	74
II.2.10.1.	Determinación de la concentración de azúcares:	74
II.2.10.2.	Determinación de la concentración de nitrógeno como amino libre:	74
II.2.10.3.	Determinación del crecimiento celular:	74
II.2.10.4.	Determinación de la concentración de lípidos saponificables:	75
II.2.10.5.	Determinación de concentración y perfil de metilésteres de ácidos grasos:	75
II.2.10.6.	Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:	76
II.2.10.7.	Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido:	76

II.3. Resultados.....	79
II.3.1. Melaza y vinaza de caña de azúcar utilizadas:	79
II.3.2. Determinación de la concentración de melaza de caña que no inhiba el crecimiento de la levadura seleccionada:.....	79
II.3.3. Determinación del efecto de la melaza en la acumulación de lípidos:	80
II.3.4. Determinación de componentes del medio que influyen en la producción de biomasa y acumulación de lípidos intracelulares:	81
II.3.5. Cambio de medio base de acumulación por vinaza de caña de azúcar:.....	85
II.3.6. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:.....	86
II.3.7. Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza en <i>batch</i> :	87
II.3.8. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo alimentado:	89
II.3.9. Determinación del perfil de metilésteres de los lípidos acumulados:	91
II.3.10. Estimación de otras propiedades de la mezcla de metilésteres obtenida a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:	92
II.3.11. Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos de la mezcla de metilésteres obtenida:	93
II.4. Discusión del capítulo.....	94
 Capítulo III	
Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas	100
III.1. Introducción al capítulo.....	101
III.2. Materiales y métodos	102
III.2.1. Glicerina cruda y vinaza de caña:	102
III.2.2. Tratamiento de la glicerina cruda y determinación del contenido de glicerol:.....	102
III.2.3. Evaluación de capacidad de acumulación de lípidos con glicerina cruda como fuente de carbono:.....	102
III.2.4. Determinación de la concentración de glicerina cruda que maximice la concentración de lípidos intracelulares para la cepa <i>R. graminis</i> S1/2R:.....	103
III.2.5. Escalado en fermentador utilizando 50 g/L de glicerina cruda:	104
III.2.6. Producción de la levadura S1/2R en medio a base de vinaza de caña de azúcar con glicerol como fuente de carbono:	104
III.2.7. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:.....	105
III.2.8. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo en <i>batch</i> :.....	105
III.2.9. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo alimentado:	106

III.2.10.	Métodos analíticos:.....	107
III.2.10.1.	Determinación de la concentración de glicerol:	107
III.2.10.2.	Determinación del crecimiento celular:.....	107
III.2.10.3.	Determinación de la concentración de lípidos saponificables:	107
III.3.	Resultados.....	108
III.3.1.	Tratamiento de la glicerina cruda y determinación del contenido de glicerol:.....	108
III.3.2.	Evaluación de la capacidad de acumulación de lípidos con glicerina cruda como fuente de carbono	108
III.3.3.	Determinación de la concentración de glicerina cruda que maximice la concentración de lípidos intracelulares para la cepa S1/2R:.....	109
III.3.4.	Escalado en fermentador utilizando 50 g/L de glicerina cruda:	110
III.3.5.	Producción de la levadura S1/2R en medio a base de vinaza de caña de azúcar con glicerol como fuente de carbono:	112
III.3.6.	Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:.....	113
III.3.7.	Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo en <i>batch</i> :.....	115
III.3.8.	Cultivo alimentado en fermentador con vinaza de caña como medio base:.....	116
III.3.9.	Comparación entre diferentes condiciones de cultivo en fermentador:..	118
III.4.	Discusión del capítulo.....	121

Capítulo IV

Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas.....	126
IV.1. Introducción al capítulo.....	127
IV.2. Materiales y métodos	128
IV.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo para la optimización:	128
IV.2.2. Análisis y cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos:	128
IV.2.3. Proceso de transesterificación en dos pasos para lípidos de levaduras:.....	129
IV.2.4. Transesterificación directa de lípidos intracelulares a partir de la biomasa seca:.....	129
IV.2.5. Optimización de la concentración de catalizador, relación metanol-biomasa, temperatura y tiempo de la transesterificación ácida directa sobre biomasa seca:.....	130
IV.2.6. Optimización del tiempo de reacción del método optimizado:.....	131
IV.2.7. Determinación de los perfiles de metilésteres del biodiésel obtenido por transesterificación directa y por el proceso en dos pasos:	131

IV.2.8.	Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:	132
IV.2.9.	Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por transesterificación directa:	132
IV.2.10.	Evaluación del método optimizado en diferentes cepas de levaduras:	132
IV.3.	Resultados	134
IV.3.1.	Cultivo de <i>R. graminis</i> S1/2R:	134
IV.3.2.	Comparación del proceso en 2 pasos con la transesterificación directa con catálisis básica y ácida:	134
IV.3.3.	Optimización de la transesterificación directa catalizada por ácido:	135
IV.3.4.	Optimización del tiempo de reacción:	142
IV.3.5.	Determinación de los perfiles de metilésteres (FAMES) del biodiésel obtenido por transesterificación directa y por el proceso en dos pasos:	143
IV.3.6.	Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES):	144
IV.3.7.	Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por transesterificación directa:	145
IV.3.8.	Evaluación del método optimizado en diferentes cepas de levaduras:	146
IV.4.	Discusión del capítulo	147
Conclusiones y perspectivas		148
Bibliografía		148
Anexos		148

Índice de figuras

Introducción:

Figura 1: Producción de biodiésel en Uruguay 2010-2018.....	21
--	----

Capítulo I:

Figura I.1: Ubicación de sitios de muestreo en la Isla Rey Jorge.....	37
Figura I.2: Árbol filogenético para la región D1/D2 del phylum Ascomycota.....	48
Figura I.3: Árbol filogenético para la región D1/D2 del phylum Basidiomycota.	49
Figura I.4: Gráfico de torta con el porcentaje de los distintos géneros identificados.....	50
Figura I.5: Unidades de fluorescencia de los aislamientos de levaduras no oleaginosas.....	52
Figura I.6: Unidades de fluorescencia de los aislamientos de potenciales levaduras oleaginosas.....	53
Figura I.7: Lípidos saponificables en g/L de cultivo.....	55
Figura I.8: Lípidos saponificables en g/L de cultivo de los aislamientos incubados a 4°C.....	56
Figura I.9: Relación entre la velocidad específica de crecimiento y la temperatura.....	62

Capítulo II

Figura II.1: Aspecto de la melaza de caña.....	79
Figura II.2: Biomasa seca obtenida con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar.....	80
Figura II.3: Biomasa seca y lípidos saponificables en g/L de cultivo de la cepa 12D en medios con diferentes diluciones de vinaza.....	85
Figura II.4: Biomasa seca, lípidos saponificables en g/L de cultivo y porcentaje de acumulación de la cepa 12D en medios con diferentes concentraciones de extracto de levadura.....	86
Figura II.5: Cultivo en batch en fermentador sin control de oxígeno con 100g/L melaza de caña y vinaza sin diluir como base.....	88
Figura II.6: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables.....	89
Figura II.7: Cultivo en alimentado en fermentador sin control de oxígeno con 100 g/L melaza de caña y vinaza sin diluir como base.....	90
Figura II.8: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables.....	91

Capítulo III

Figura III.1 Fotografías de las etapas del tratamiento realizado a la glicerina cruda.....	108
Figura III.2: Cultivo en <i>batch</i> en fermentador en el medio optimizado con 50 g/L de glicerol.....	111
Figura III.3: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables.....	112
Figura III.4: Biomasa seca en g/L de cultivo de la cepa S1/2R en medios con diferentes diluciones de vinaza.....	113
Figura III.5: Biomasa seca, lípidos saponificables en g/L de cultivo y porcentaje de acumulación de la cepa S1/2R en medios con diferentes concentraciones de extracto de levadura.....	114
Figura III.6: Cultivo en <i>batch</i> en fermentador sin control de oxígeno con 50g/L de glicerol en forma de glicerina cruda y 50:50 vinaza:H ₂ O como base.....	115
Figura III.7: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables.....	116
Figura III.8: Cultivo en alimentado en fermentador con control de oxígeno con 50g/L de glicerol en forma de glicerina cruda y 50:50 vinaza:H ₂ O como base.....	117
Figura III.9: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables.....	118

Capítulo IV

Figura IV.1: FAMES por g de biomasa seca de las diferentes reacciones de transesterificación.....	134
Figura IV.2: Gráfico de Pareto luego del diseño factorial.....	137
Figura IV.3: Superficie de respuesta.....	138
Figura IV.4: Gráfico de Pareto luego del diseño factorial.....	141
Figura IV.5: Interacción entre relación metanol biomasa con el tiempo.....	142
Figura IV.6: Resultados de FAMES obtenidos con diferentes tiempos de reacción.....	143

Índice de tablas

Capítulo I

Tabla I.1: Identificación, fuente y rango de temperatura de crecimiento de las levaduras aisladas.....	46
Tabla I.2: Porcentaje de acumulación de los aislamientos seleccionados y de las cepas comerciales <i>S. cerevisiae</i>	55
Tabla I.3: Porcentaje de acumulación a 4°C de los aislamientos seleccionados.....	57
Tabla I.4: Porcentajes de acumulación y lípidos saponificables a diferentes temperaturas de los aislamientos seleccionados.....	58
Tabla I.5: Porcentaje e identificación de los metilésteres acumulados por los aislamientos seleccionados.....	59
Tabla I.6: Valores de numero de cetano, índice de insaturación, punto enturbiamiento (CP) y punto de obstrucción del filtro en frío (CFPP).....	60
Tabla I.7: Velocidades específicas de crecimiento.....	61
Tabla I.8: Evaluación de la capacidad de asimilación de las la cepa 12D.....	62

Capítulo II

Tabla II.1: Variables y sus niveles ensayados en el diseño factorial fraccionado.....	71
Tabla II.2 Concentración de biomasa seca y lípidos saponificables obtenidos de la cepa 12D en los ensayos del diseño factorial fraccionado.....	82
Tabla II.3: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de biomasa seca.....	82
Tabla II.4: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de lípidos saponificables.....	83
Tabla II.5: Resumen de los resultados del cultivo de la cepa 12D en los diferentes medios utilizados.....	87
Tabla II.6: Porcentaje e identificación de los ésteres metílicos.....	92
Tabla II.7: Propiedades fisicoquímicas del biodiésel.....	93
Tabla II.8: Contenido de glicerol libre, glicerol total y mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel.....	93

Capítulo III

Tabla III.1: Biomasa seca, lípidos saponificables y porcentajes de acumulación de las cepas 12D y S1/2R con glicerina cruda como fuente de carbono.....	109
--	-----

Tabla III.2: Resultados de biomasa seca, lípidos saponificables y glicerol remanente en (g/L) a los 8 días de incubación.....	110
--	-----

Tabla III.3: Cuadro comparativo de las diferentes condiciones de cultivo en fermentador...	120
---	-----

Capítulo IV

Tabla IV.1: Niveles de los factores del diseño factorial.....	130
--	-----

Tabla IV.2: Niveles de los factores del diseño factorial.....	131
--	-----

Tabla IV.3: Diseño matricial del diseño factorial y los valores de respuesta obtenidos de g de FAMES por g de biomasa seca.....	135
--	-----

Tabla IV.4: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de FAMES en el diseño factorial.....	136
---	-----

Tabla IV.5: Diseño matricial del diseño factorial y los valores de respuesta obtenidos de g de FAMES por g de biomasa seca.....	139
--	-----

Tabla IV.6: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de FAMES en el diseño factorial.....	140
---	-----

Tabla IV.7: Porcentaje e identificación de los ésteres metílicos del proceso de transesterificación en 2 pasos y el proceso de transesterificación directa optimizado.....	144
---	-----

Tabla IV.8: Propiedades fisicoquímicas del biodiésel producido por el proceso de transesterificación en dos pasos y el biodiésel producido por el proceso de transesterificación directa optimizado.....	145
---	-----

Tabla IV.9: Contenido de glicerol libre, glicerol total y mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación directa optimizado.....	145
---	-----

Tabla IV.10: g FAMES/g biomasa seca para las diferentes cepas obtenido mediante el proceso de transesterificación en 2 pasos y el proceso de transesterificación directa optimizado.....	146
---	-----

Lista de abreviaturas

A.C.S:	Grado Reactivo Analítico
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AIE:	Agencia Internacional de Energía
ALUR:	Alcoholes del Uruguay
AMP:	Adenosín monofosfato
ANOVA:	Análisis de varianza
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BHI:	Caldo Cerebro Corazón
CFPP:	punto de taponamiento de filtro en frío
CM:	Cuadrado medio
CN:	Número de cetano
CP:	Cuerpo lipídico
CO ₂ :	Dióxido de carbono
DAG:	Diacilglicerol
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DRBCA:	Dicloran rosa de bengala cloranfenicol agar
DU:	Índice de insaturación
EL:	Extracto de levadura
FA:	Ácido graso
FAMES:	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAN:	Nitrógeno amínico libre
FFA:	Ácidos grasos libres
GC-FID:	Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama
GEI:	Gases de efecto invernadero
GL:	Grados de libertad
HCl:	Ácido clorhídrico
HHV:	Valor calorífico alto

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HSD: Honestly-significant-difference
IC: Intervalo de confianza
ITS: Internal Transcribed Spacer
IV: Índice de iodo
LCSF: Factor de saturación de cadena larga
LSD: Least significant difference
MIEM: Ministerio de Industria Energía y Minería
MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamide
MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados
OS: Estabilidad oxidativa.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDA: Agar Papa Dextrosa
PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados
RE: Retículo endoplasmático
rARN: Ácido ribonucleico ribosomal
SCO: Single cell oils
SM Suma de cuadrados
SN: Índice de saponificación
TAG: Triacilglicérido
UE: Unión Europea
UFC: Unidades formadoras de colonia
UNIT: Instituto Uruguayo de Normas Técnicas
URSEA: Unidad Reguladora de Servicios de Energía y Agua
VVM: Volumen de aire por volumen de medio por minuto
YNB: Caldo a base de extracto de levadura y nitrógeno



Introducción

Situación Estratégica

En la últimas décadas, ha existido un continuo crecimiento de la demanda mundial de energía y de la consiguiente contaminación ambiental (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.* 2018). Debido al aumento de la población y la modernización, se prevé para el año 2050 un aumento del 57% en el consumo de energía global (Hajjari *et al.* 2017) y del 100% de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) relacionadas con el consumo energético, según la Agencia Internacional de Energía (AIE). Hoy en día, casi el 80% de la energía total utilizada en el mundo es provista por combustibles fósiles (Hajjari *et al.* 2017).

Las fuentes de petróleo se están agotando y además, su utilización tiene un impacto ambiental negativo (Gebremariam & Marchetti 2018; Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.* 2018). Por lo tanto, satisfacer la creciente demanda energética con este recurso se está volviendo insostenible económica, social y ambientalmente. Por lo cual los biocombustibles, obtenidos a partir de fuentes renovables, pueden contribuir en parte a solucionar el problema ambiental.

El uso de biocombustibles tiene como ventajas la reducción en la emisión neta de GEI y la disminución en la contaminación (Hajjari *et al.* 2017; Gebremariam & Marchetti 2018). En las últimas dos décadas, han habido incentivos en las políticas para la utilización de biocombustibles en el sector transporte (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.* 2018; IRENA 2019), identificado como el segundo sector de mayor demanda energética y el de mayor producción de GEI (Mahmudul *et al.* 2017).

Los biocombustibles biodiésel y bioetanol, se obtienen en su gran mayoría a partir de granos y semillas que también son de uso alimentario. Esto ha cambiado el mercado de alimentos y el uso de las tierras destinadas a su producción. Ha habido un avance de la deforestación para destinar más tierras a la producción agrícola, ya sea para uso alimentario o energético, provocando también un impacto ambiental no deseado. Debido a este proceso, las reglamentaciones tanto mundiales como nacionales han ido cambiando para contemplar estos aspectos (Murdock *et al.* 2019).

A fines, de 2018 más de 70 países poseían legislaciones que preveían la mezcla de biocombustibles (Murdock *et al.* 2019). La Unión Europea (UE) en su Directiva sobre Energías Renovables 2020-2030, aprobada en diciembre de 2018, establece como objetivo que el 14% de la energía destinada al transporte provenga de fuentes renovables para el año 2030, y como máximo solo el 7% podrá provenir de biocombustibles basados en materias primas que puedan usarse como alimento.

Uruguay ha presentado históricamente una fuerte dependencia en términos energéticos de fuentes no renovables (Lado 2017). Si bien en los últimos años en nuestro país se ha llevado adelante una política expresa para diversificar la matriz energética e incorporar fuentes renovables, el abastecimiento de energía en Uruguay ha sido históricamente dependiente del petróleo y de la energía hidroeléctrica (Bertoni *et al.* 2010). Al igual que a nivel mundial, en nuestro país los sectores que presentan una mayor participación del consumo final de energía son el industrial y el transporte, según el Balance Energético Nacional 2018 presentado por el Ministerio de Industria Energía y Minería (MIEM) en noviembre del 2019. Siendo el transporte el sector que en los últimos 30 años ha consumido la mayor proporción de derivados del petróleo, representando el 69% del consumo final de los derivados del petróleo durante el 2018 (Balance Energético Nacional 2018 (MIEM)). Para mitigar la vulnerabilidad de este sector en términos de dependencia de combustibles fósiles, se propuso el reemplazo de una porción de la demanda nacional de gasolina y diésel, por combustibles renovables como el bioetanol y el biodiésel (Hajjari *et al.* 2017; Lado 2017). Fue así que a partir noviembre de 2007 entra en vigor la ley 18.195 referente a los agrocombustibles, la cual tiene por objeto: *“el fomento y la regulación de la producción, la comercialización y la utilización de agrocombustibles (Alcohol carburante y Biodiésel)”* (Ley Nº 18.195). A su vez, en dicha Ley se establecen las cuotas de incorporación de los biocombustibles a los combustibles fósiles. Para el bioetanol se establece una mezcla de hasta un 5% con naftas y para el biodiésel se fija una proporción de 5%, con un límite máximo de 7% (establecido por la Unidad Reguladora de Servicios de Energía y Agua (URSEA)). La producción de estos biocombustibles se encuentra en manos de la empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR) y llega al usuario final principalmente a través de la mezcla con combustibles fósiles realizada por

ANCAP, única institución habilitada a realizar dicha tarea. Pero fue recién a partir del año 2010 que se comenzó a contabilizar la producción y el consumo de biocombustibles en el Balance Energético Nacional, llegando a representar 2% del consumo final energético en el año 2018.

En la actualidad, el biodiésel en Uruguay se produce principalmente a partir de materias primas alimentarias de producción agropecuaria nacional. Las materias primas utilizadas para la producción del biodiésel nacional son principalmente aceite de soja (53%), aceite de canola (15%), sebo vacuno (30%) y aceite usado de fritura (2%) (de la Rúa *et al.* 2017). Desde la implementación de la Ley de Agrocombustibles ha habido un aumento en la producción nacional y mezcla de biodiésel (figura 1), siendo el 2015 el año en donde el porcentaje promedio de mezcla con gasoil fue máximo. El biodiésel uruguayo se destaca por su alto nivel de calidad y por tener un alto grado de regulación en lo relativo a su producción (cumplimiento de la norma UNIT 1100:2014).

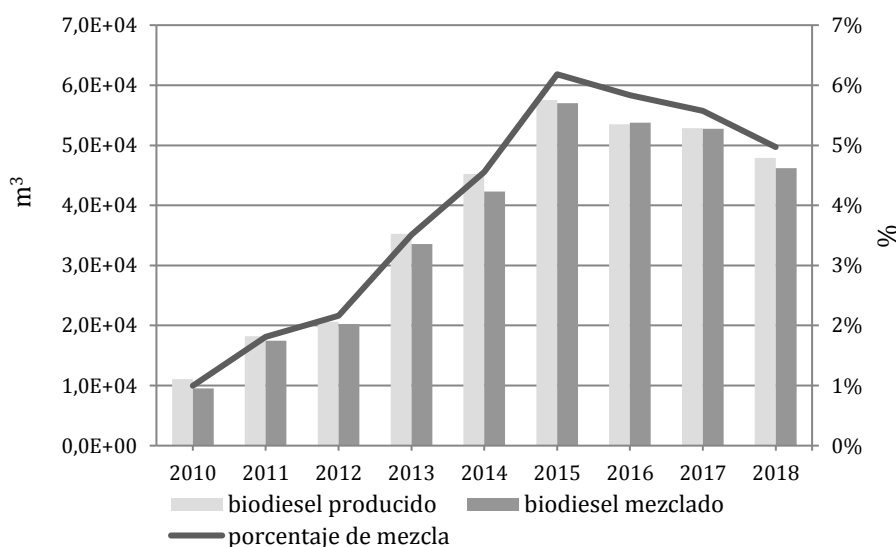


Figura 1: Producción de biodiésel en Uruguay período 2010-2018. Balance Energético Nacional (BEN) 2018, presentado por la Dirección Nacional de Energía del Ministerio de Industria, Energía y Minería.

La Norma 1100:2014 establece que el contenido de ésteres debe ser mayor a 96.5%; del éster de ácido linolénico menor a 12%; y el contenido de ésteres poli-insaturados (más de 4 dobles enlaces) debe ser menor a 1%. Esta norma exige otros requisitos que

se han identificado como los principales parámetros de calidad del biodiésel como el índice de cetano (CN), el valor de yodo (IV), la estabilidad de oxidación (OS) y la propiedad de taponamiento del filtro frío (CFPP). Estas propiedades se ven muy afectadas por el grado de insaturación y saturación. En consecuencia, la composición de la ácidos grasos de la materia prima influye en gran medida en la calidad del biodiésel (Ramos *et al.* 2009).

Biodiésel

El biodiésel es una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga (Hajjari *et al.* 2017). Dentro de las ventajas que presenta se destacan, mayor eficiencia de combustión, menor contenido de azufre, menor producción de monóxido de carbono, humo, partículas e hidrocarburos, posee mayor número de cetano, mayor biodegradabilidad, mayor punto de inflamación y lubricidad inherente, y tiene más oxígeno libre que el diésel derivado del petróleo (Knothe 2008; Demirbas 2009; Hasan & Rahman 2017; Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.* 2018). A pesar de estas diferencias, el biodiésel y el diésel comparten propiedades de combustible similares, lo que es una ventaja para su mezcla (Aghbashlo *et al.* 2018). Las mezclas por debajo de 20% son las más comúnmente utilizadas, ya que no requieren ninguna modificación en los motores que sean utilizados (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.* 2018). El principal desafío asociado al biodiésel como combustible es su elevado costo de producción, en comparación con el diésel convencional, por lo cual su utilización no ha alcanzado todo su potencial (Anuar & Abdullah 2016; Gebremariam & Marchetti 2018).

El biodiésel se sintetiza a partir de triglicéridos mediante transesterificación con alcoholes de cadena corta como metanol o etanol. En esta reacción se libera glicerol, que representa el 10% del biodiésel producido (Ma & Hanna 1999; Bart *et al.* 2010). Actualmente, el proceso más utilizado para la síntesis de biodiésel es la catálisis química homogénea, utilizando bases como NaOH o KOH, o ácidos como H₂SO₄ (Knothe & Razon 2017), que se utilizan para mejorar la velocidad y el rendimiento de la reacción (Shields-Menard *et al.* 2018). Este método resulta eficiente, pero presenta varios inconvenientes. La presencia de ácidos grasos libres y de agua en el material de partida

disminuyen el rendimiento de la reacción (Van Gerpen 2005; Kumar Tiwari *et al.* 2007), limitando las fuentes de triglicéridos utilizables a los aceites refinados.

La obtención del aceite refinado a partir de semillas oleaginosas implica múltiples pasos, que van desde la producción de cultivos, cosecha, limpieza y secado de semillas, extracción de los triglicéridos mediante extrusión o extracción con solventes, desgomado y la refinación del aceite extraído (Haas *et al.* 2006; Vivek *et al.* 2017). La utilización de materiales de partida económicos sería uno de los puntos clave para aumentar la competitividad del biodiésel frente al diésel derivado del petróleo.

Materias primas para biodiésel

La selección de la materia prima a utilizar depende de la disponibilidad y los aspectos económicos de cada país (Sakthivel *et al.* 2018). Convencionalmente, los biocombustibles, incluido el biodiésel, se clasifican en 3 generaciones según la materia prima utilizada en su producción. Estas generaciones incluyen biocombustibles producidos a partir de, 1) materias primas agrícolas comestibles, 2) biomasa no destinada a la alimentación y residuos, 3) microorganismos oleaginosos (Sitepu *et al.* 2014). El biodiésel de primera generación representa más del 95% del total de la producción mundial (Hajjari *et al.* 2017). Este tipo de biodiésel utiliza aceites comestibles derivados de soja, canola, palma etc. Aunque estas materias primas poseen ventajas como la gran disponibilidad de cultivos oleaginosos y un proceso de conversión relativamente simple (Sakthivel *et al.* 2018), compiten por la tierra y el agua utilizada para la producción de alimentos (Shields-Menard *et al.* 2018), pudiendo conducir a un aumento en los precios de los alimentos (Sakthivel *et al.* 2018). Por estas razones, se ha puesto foco en la búsqueda de fuentes alternativas de materias primas, dando origen a los biocombustibles de segunda generación, o biocombustibles avanzados. Las materias primas utilizadas en este caso pueden ser cultivos oleaginosos no destinados al consumo, aceites usados de fritura, sebo vacuno u otros residuos agrícolas (Galafassi *et al.* 2012; Shields-Menard *et al.* 2018). La principal ventaja de usar aceites no comestibles es que no afectan directamente la disponibilidad de alimentos, sin embargo, compiten también por el uso de la tierra (Sakthivel *et al.* 2018). El uso de residuos como el aceite usado de fritura y el sebo vacuno ha tenido cierto

éxito para la producción de biodiésel, pero por tener un alto contenido de ácidos grasos libres (FFA), dan como resultado un biodiésel con alta viscosidad (*Shields-Menard et al.* 2018). A pesar de los logros, los biocombustibles de segunda generación no son aún suficientes para satisfacer la demanda global (*Sitepu et al.* 2014; *Milano et al.* 2016; *Ambat et al.* 2018).

En el anhelo de superar los problemas socioeconómicos de los biocombustibles de segunda generación, se han explorado nuevas fuentes alternativas económicamente viables, con buena productividad y fácilmente disponibles (*Sakthivel et al.* 2018). Por lo tanto, ha surgido particular interés en seleccionar materias primas para la producción de biocombustibles que sean independientes de la cadena de suministro de alimentos (*Arous et al.* 2016). El biodiésel de "tercera generación" está en desarrollo, y se basa en el uso de aceites que se producen a partir de células individuales, o *single cell oils* (SCO). Estos son microorganismos que producen y almacenan lípidos, pudiendo ser microalgas, bacterias, levaduras u hongos filamentosos. Esta materia prima posee características similares a los aceites vegetales en cuanto a su perfil de triacilglicéridos (TAG) y poseen un ciclo de vida más corto que los cultivos oleaginosos convencionales. A su vez, la producción de estos aceites microbianos requiere menor mano de obra y un área menor para su cultivo (*Bhatia et al.* 2017; *Shields-Menard et al.* 2018). La materia prima estaría siempre disponible ya que no dependen de las condiciones climáticas (*Sakthivel et al.* 2018). Aunque son una alternativa muy interesante, aún restan algunos desafíos como comprender su metabolismo de manera completa (*Qin et al.* 2017; *Diwan et al.* 2018; *Lazar et al.* 2018) y lograr que su producción industrial sea rentable (*Probst et al.* 2016; *Chen et al.* 2017; *Vasconcelos et al.* 2019).

Microorganismos oleaginosos

Los microorganismos son considerados oleaginosos si son capaces de acumular más del 20 por ciento de su biomasa como lípidos (*Wynn & Ratledge* 2005) bajo ciertas condiciones de cultivo (*Meng et al.* 2009). Generalmente, los lípidos acumulados están bajo la forma de triacilglicerol (TAG) y los mismos se almacenan intracelularmente como reserva de carbono y energía (*Alvarez & Steinbüchel* 2002; *Wynn & Ratledge*

2005). En general, la acumulación de TAG ocurre después de la síntesis de fosfolípidos durante la fase de crecimiento exponencial y cuando el crecimiento celular se ve afectado durante la fase estacionaria por condiciones de exceso de carbono y limitación de algún nutriente, en general nitrógeno (Shields-Menard *et al.* 2018). Este tipo de aceite ofrece la ventaja de producir biodiésel con una calidad estable y reproducible, ya que las condiciones de cultivo son controladas. (Fortman *et al.* 2008). Los organismos eucariotas como las levaduras, hongos filamentosos y algas generalmente producen triacilgliceroles de ácidos grasos poliinsaturados similares a los aceites vegetales, por lo cual son considerados las mejores alternativas para la producción de biodiésel dentro de los organismos oleaginosos (Shields-Menard *et al.* 2018).

Levaduras oleaginosas

Las levaduras oleaginosas son uno de los microorganismos oleaginosos más prometedores para la producción de aceites microbianos (Qin *et al.* 2017), ya que algunas especies pueden acumular hasta 70% de lípidos en su biomasa y exhiben varias ventajas para la producción de lípidos sobre otros microorganismos oleaginosos (Vasconcelos *et al.* 2019). Al compararse con las microalgas, el cultivo de levaduras es más fácil de escalar ya que necesitan un área menor para su cultivo, además son muy eficientes para crecer a partir de residuos de la industria y el sector agrícola (Ageitos *et al.* 2011; Chebbi *et al.* 2019; Patel & Matsakas 2019).

En las últimas décadas, debido a la creciente necesidad de encontrar fuentes alternativas y sustentables de aceites para la síntesis de biodiésel, se ha impulsado la investigación en el área de levaduras oleaginosas (Vasconcelos *et al.* 2019). Actualmente, de 1600 especies conocidas de levaduras, aproximadamente solo 90 especies han sido reportadas como oleaginosas. Un tercio de estas fueron reportadas a partir del año 2000 (Sitepu *et al.* 2014; Garay *et al.* 2016). Estos reportes incluyen varias especies del phylum Basidiomycota, por ejemplo: *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium fluviale*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* y *Sporidiobolus ruineniae* y del phylum Ascomycota, por ejemplo: *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lipomyces starkeyi* y *Yarrowia lipolytica* (Meesters *et al.* 1996; Ratledge & Cohen 2008; Pan *et al.* 2009; Papanikolaou & Aggelis 2011; Sitepu *et al.*

2012; Kanti *et al.* 2013; Kitcha & Cheirsilp 2013; Castanha *et al.* 2014; Schulze *et al.* 2014; Chebbi *et al.* 2019).

La acumulación de lípidos en las levaduras comienza cuando algún nutriente se agota, en general nitrógeno, pero puede ser otro nutriente como el zinc, hierro, fósforo y magnesio (Meesters *et al.* 1996; Fakas *et al.* 2008). La respuesta celular al agotamiento de un nutriente clave es entrar en fase de acumulación de lípidos. En esta etapa, el exceso de carbono se convierte en lípidos de almacenamiento, pero si las células regresan a una situación en la que el nutriente está disponible, las reservas de lípidos pueden movilizarse hacia componentes celulares (Ratledge & Wynn 2002; Ratledge & Cohen 2005; Daum *et al.* 2007). La producción de lípidos en un medio con exceso de carbono ocurre en 2 etapas y comienza durante la fase exponencial tardía y continúa durante la fase estacionaria (Müllner & Daum 2004; Raschke & Knorr 2009). En la primera etapa se produce el crecimiento celular y esta etapa termina agotando el nutriente limitante, excepto el carbono. Durante la segunda fase, el exceso en la cantidad de carbono se transforma en reservas lipídicas (Madani *et al.* 2017). En estas condiciones, las funciones celulares normales como la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, y eventualmente, el crecimiento celular cesa. Las especies oleaginosas consumen cualquier fuente de carbono accesible y la metabolizan hacia la formación de lípidos. La acumulación de lípidos puede ser a través de la síntesis *de novo* usando sustratos como carbohidratos y glicerol, o la vía *ex novo* con compuestos hidrófobos que también sirven como sustratos (Diwan *et al.* 2018).

La acumulación está influenciada por diferentes condiciones de cultivo. Dentro de estos parámetros se encuentran la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la relación C/N, la velocidad de agitación, la temperatura, el tiempo de incubación, el pH y algunos otros factores como la concentración de sales minerales (Madani *et al.* 2017). Una relación carbono/nitrógeno (C/N) alta promueve la síntesis de lípidos (Cho & Park 2018). Por ello, el tipo de fuente de carbono y nitrógeno, las concentraciones de estas, así como las condiciones de cultivo, pueden afectar el rendimiento de lípidos en levaduras oleaginosas (Enshaeieh *et al.* 2013).

La utilización de esta materia prima para la producción de biodiésel se encuentra en una etapa temprana de desarrollo y el producto obtenido es aún demasiado costoso para competir con el diésel producido a partir de recursos fósiles o materia prima de primera generación (Shapaval *et al.* 2019). La utilización de sustratos baratos, subproductos o desechos de otras cadenas productivas o industriales, junto con la optimización de las condiciones de cultivo, acerca la producción del material de interés a un proceso de economía circular más eficiente. Este enfoque permite atacar los costos abaratando la materia prima y reducir el impacto ambiental utilizando desechos de otras industrias, nuevamente afectando positivamente la economía.

Uso de subproductos en la producción de levaduras oleaginosas

Debido a que el costo de la materia prima determina la rentabilidad financiera de la producción de biodiésel a partir de aceites microbianos, es indispensable utilizar sustratos de bajo costo (Ageitos *et al.* 2011). Es así que el uso de subproductos agroindustriales surge como una opción. En particular, ciertos subproductos generados en la producción de biocombustibles nacionales (etanol y biodiésel) muestran potencial para ser utilizados en procesos de producción microbiana (Basanta *et al.* 2007).

Durante la producción de biodiésel, se genera glicerina cruda, como subproducto inevitable, produciéndose 1 kg de glicerina cada 10 kg de biodiésel. La glicerina cruda está constituida por una mezcla de glicerol (65–85%, p/p), metanol y jabones (Liang *et al.* 2010). Contiene además impurezas como, por ejemplo, sales orgánicas e inorgánicas, agua, colorantes vegetales, trazas de mono y diglicéridos (Hájek & Skopal 2010; Yang *et al.* 2012). El glicerol purificado tiene múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, alimenticia, o cosmética. Sin embargo, en la mayoría de los casos se requiere un alto grado de pureza (entre 95.5% y 99%), lo cual se logra mediante procesos de alto costo (Choi 2008). A diferencia de lo que ocurre en otros subproductos, mediante un acondicionamiento poco costoso es posible utilizarlo como fuente de carbono para el cultivo de levaduras oleaginosas.

La otra cadena agroindustrial que puede aportar subproductos utilizables es la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar. La caña de azúcar ha sido ampliamente explorada por la industria biotecnológica debido a su abundancia y bajo costo de producción en regiones tropicales y sub tropicales (Bento *et al.* 2020). El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas, principalmente se produce a partir de la melaza o *blackstrap* que es un subproducto de la industria azucarera. Se trata de un jarabe líquido denso y viscoso resultante de la cristalización final del azúcar, separado de la masa cocida final y de la cual no es posible extraer más sacarosa por métodos convencionales. Esta melaza aun contiene una alta proporción de azúcares fermentables, (aproximadamente 60 % de sacarosa, glucosa y fructosa) (Otero-Rambla *et al.* 2009) que la convierten en una buena fuente de carbono para la producción de etanol (Jiménez *et al.* 2004; Basanta *et al.* 2007). Como subproducto de la producción de etanol a partir de la melaza se obtiene un residuo denominado vinaza, la cual contiene la materia soluble no volátil, remanente del proceso de fermentación-destilación (Navarro *et al.* 2000). Aproximadamente se obtienen de 10 a 16 litros de vinaza, por cada litro de etanol producido a partir de caña de azúcar, dependiendo de las condiciones tecnológicas de la destilería (Christofolletti *et al.* 2013). La vinaza es una suspensión acuosa que contiene sólidos orgánicos y minerales, formada por 93.5% de agua, 4.6% de materia orgánica y 1.9% de sustancias minerales, principalmente potasio (0.5%), nitrógeno (0.05%) y fósforo (0.01%) (Valeiro *et al.* 2017). Un destino frecuente de la vinaza es la fertirrigación de cultivos (Christofolletti *et al.* 2013; Filoso *et al.* 2015; Rodrigues Reis & Hu 2017). Dadas las características de la vinaza la fertirrigación tiene efectos negativos sobre el suelo y las aguas subterráneas a largo plazo (Rocha *et al.* 2007). Se han identificado y ensayado algunos usos adecuados para el manejo de la vinaza, como el reciclaje de la vinaza en la producción de etanol (Fadel *et al.* 2014; Yang *et al.* 2016), producción de energía (Cortez *et al.* 1992; Walter *et al.* 2011) y producción de alimentos para animales (Cortez *et al.* 1992).

A pesar de ser sustratos prometedores para la producción de levaduras oleaginosas, el costo real de los subproductos, los costos asociados a su transporte y la continuidad en el suministro son factores importantes a considerar, ya que determinan en gran

medida la viabilidad económica de su utilización. A su vez, su uso como sustratos en bioprocesos generalmente, exige la suplementación con algún tipo de nutriente adicional, cuyo costo también debe ser considerado en el momento del diseño del proceso.

Producción de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Para el caso de la producción de biodiésel a partir de aceites microbianos, se ha propuesto un proceso similar al de las semillas oleaginosas. En primer lugar, realizar la producción de biomasa microbiana en condiciones que favorezcan la acumulación de lípidos intracelulares. Una vez cosechadas las células, se deben secar y mediante un proceso de disrupción celular, se liberan los lípidos intracelulares acumulados. Estos lípidos son recuperados mediante una extracción líquido-líquido utilizando solventes orgánicos, como el hexano, heptano, o una mezcla de hexano-etanol o cloroformo-metanol. Finalmente, los lípidos extraídos se transesterifican con metanol o etanol como dador de alquilo y solvente. Esta reacción es catalizada por un ácido fuerte (HCl o H₂SO₄) o una base fuerte (NaOH o KOH) (Thliveros *et al.* 2014). Para el empleo de este proceso en dos pasos es necesario la disrupción celular. Esta puede ser mecánica, mediante sonicación o por calentamiento con microondas (Dong *et al.* 2015). Si bien son procesos relativamente sencillos a escala laboratorio, resultan difíciles de aplicar a gran escala y por demás costosos a ese nivel. A esto se suman pérdidas por una extracción de lípidos insuficiente (Lewis *et al.* 2000; Iverson *et al.* 2001) y una co-extracción de fracciones no saponificables (McNichol *et al.* 2012).

Para la utilización de lípidos microbianos resulta fundamental trabajar sobre el proceso de obtención de los mismos, explorando alternativas que disminuyan las operaciones a realizar y aumente el rendimiento del producto obtenido (Martinez-Silveira *et al.* 2019a), lo cual redundaría en un aporte positivo a la ecuación económica del proceso.

Por estas razones es que se ha explorado un proceso alternativo más simple, en donde la transesterificación ocurre en un solo paso, directamente sobre la biomasa, sin una

extracción previa de lípidos. Este proceso se conoce como transesterificación directa (Harrington & D'Arcy-Evans 1985). El proceso de transesterificación directa ha sido estudiado por Liu & Zhao (2007), Thliveros *et al.* (2014) y Dong *et al.* (2015) para obtener biodiésel a partir de diferentes especies de levaduras

Objetivos

Objetivo general

Obtener biodiésel a partir de levaduras oleaginosas utilizando para su producción subproductos industriales

Objetivos específicos

- ❑ Seleccionar levaduras oleaginosas que acumulen lípidos con el perfil adecuado para la producción de biodiésel en medios a base de glicerol, vinaza y melaza.
- ❑ Definir las condiciones del proceso para la producción de levaduras oleaginosas utilizando glicerina cruda, melaza y vinaza para las levaduras seleccionadas.
- ❑ Desarrollar y optimizar un método de transesterificación en un solo paso para la obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosa

Estructura de la tesis

En el capítulo I se realiza la búsqueda y la identificación de levaduras oleaginosas aisladas de la Antártida. Se realiza la selección de una cepa para la producción a partir de un subproducto.

En el capítulo II se realiza la optimización de la producción de la cepa *C. glaebosa* 12D en melaza de caña como fuente de carbono, así como la optimización y escalado de la producción con vinaza como medio base.

En el capítulo III se realiza el escalado de la producción de la cepa *R. graminis* S1/2R con glicerina cruda como fuente de carbono, así como la optimización y el escalado de la producción con vinaza como medio base y glicerina cruda como fuente de carbono.

En el capítulo IV se describe la optimización del método de transesterificación directa sobre la biomasa, así como la caracterización del biodiésel obtenido por este proceso. El método optimizado se evaluó en diferentes especies de levaduras.

*Búsqueda y caracterización de
levaduras oleaginosas*

Capítulo I

I.1. Introducción al capítulo

Las levaduras oleaginosas han sido aisladas de variados ambientes que incluyen zonas templadas y hábitats extremos tales como desiertos, selvas y zonas frías como el Tíbet y la Antártida (Li *et al.* 2012; Duarte *et al.* 2013; Pereyra *et al.* 2014; Coradetti *et al.* 2018). En realidad, el primer reporte de lípidos acumulados por levaduras de la región antártica es de hace casi 20 años (Zlatanov *et al.* 2001). Una de las adaptaciones más estudiadas de las levaduras que viven en ambientes fríos es su metabolismo lipídico, como se describe en la revisión realizada por Sitepu *et al.* (2014). El contenido de lípidos en levaduras y las cantidades relativas de los ácidos grasos que componen dichos lípidos se ve afectado por condiciones externas como la temperatura. Por ejemplo, cuando la temperatura de crecimiento disminuye de 25°C a 10°C, se produce un aumento de los lípidos y fosfolípidos totales, y un aumento de la insaturación en los ácidos grasos acumulados (Sitepu *et al.* 2014). Este comportamiento, al disminuir la temperatura de crecimiento también fue reportado por Amaretti *et al.* (2010), quien encontró que la composición de ácidos grasos de los lípidos almacenados cambiaba y se producía un aumento en el contenido de ácidos insaturados. A su vez, se ha demostrado que las levaduras antárticas producen una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que las levaduras aisladas de otros ambientes (Villarreal *et al.* 2018). Dado que los cambios en la composición de ácidos grasos afectan diversas propiedades del biodiésel tales como la fluidez en frío, las propiedades de combustión y el contenido energético (Sitepu *et al.* 2014), la selección de la materia prima para su producción debe contemplar el tipo de mezcla que se pretende producir. En particular, un aumento en la cantidad de ácidos grasos insaturados favorecerá la fluidez en frío, la cual se puede estimar mediante una serie de parámetros dentro de los cuales se encuentran el punto de enturbiamiento (*cloud point*) y el punto de obstrucción de filtros en frío (*cold filter plugging point*). Los dos parámetros representan valores de temperatura que cuanto más bajos sean indican una mayor fluidez a bajas temperaturas. La disminución de la fluidez en frío del biodiésel es causada por la formación de cristales a bajas temperaturas. Estos cristales pueden llegar a formar aglomerados de tamaño suficiente para restringir o impedir el flujo a través de los conductos y filtros por los cuales el combustible llega al sistema de inyección,

provocando que el motor no encienda. Por ello, la fluidez en frío es una importante propiedad a considerar si se pretende producir biodiésel que funcione a bajas temperaturas. En ese contexto, los lípidos de las levaduras oleaginosas adaptadas a crecer a temperaturas bajas, serían buenos candidatos como materia prima para producir ese tipo de biodiésel (Thomas-Hall *et al.* 2010). Al comienzo de esta tesis nuestro grupo contaba con una colección de 21 levaduras oleaginosas, aisladas de superficie de vegetales, de suelo y agua de zonas de la periferia de Montevideo y de las cercanías a la base Artigas en la isla Rey Jorge (Antártida). De ellas solamente 4 acumulaban más del 40% de su peso seco en lípidos (Pereyra *et al.* 2014). Como primer objetivo de este trabajo se planteó la búsqueda de nuevas levaduras oleaginosas, en especial de cepas psicotolerantes o psicrófilas, capaces de acumular lípidos a partir de los cuales se pudieran obtener mezclas de metilésteres que llevaran a la producción de biodiésel para zonas frías. Por ello se decidió formar una colección de levaduras antárticas y estudiar su capacidad de acumular lípidos intracelulares, entre otras propiedades de potencial biotecnológico. El interés en levaduras tolerantes al frío se evidencia en los variados trabajos que han explorado sus capacidades enzimáticas (Cavello *et al.* 2019), su habilidad de degradar contaminantes orgánicos (Fernández *et al.* 2017), su aptitud como controladores biológicos (Arrarte *et al.* 2017) e incluso su potencial para acumular lípidos intracelulares (Martinez *et al.* 2016). En este capítulo se describe el aislamiento de levaduras de diferentes hábitats terrestres y marítimos de la Isla Rey Jorge. Los aislamientos de levadura se caracterizaron fisiológicamente y se identificaron a nivel molecular mediante el análisis de las secuencias D1/D2 (Kurtzman & Robnett 1998). Además, se evaluó la capacidad de los aislamientos de producir lípidos intracelulares y su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas (Martinez *et al.* 2016). De ellos obtenidos se seleccionaron los que presentaron mayor capacidad de acumulación de triglicéridos intracelulares. Se les determinó el perfil de ácidos grasos acumulados a diferentes temperaturas, de manera de conocer si un biodiésel producido a partir de dichos ácidos cumpliría con la Norma UNIT 1100:2014. A su vez, en base a la mezcla de ácidos grasos obtenidos en cada caso se determinaron parámetros asociados con la fluidez en frío. De estos resultados, se seleccionó la cepa que presentó mayor porcentaje de acumulación en las diferentes condiciones, la cual fue identificada como *C. glabrosa* 12D. Con la finalidad de explorar

posibles sustratos para la producción de la cepa seleccionada, se estudió la asimilación de distintas fuentes de carbono presentes en diferentes subproductos industriales.

I.2. Materiales y métodos

I.2.1. Sitios de muestreo:

El aislamiento de levaduras psicrótrofas se realizó a partir de muestras de agua oceánica y continental y de muestras de suelo recolectadas en diferentes sitios de la Península Fildes, de la isla Rey Jorge (Lat 62°11'04S; Long 58°54"W), situada a 120 km de la península Antártica en el océano Antártico. Las muestras fueron recolectadas durante las expediciones organizadas por el Instituto Antártico Uruguayo (IAU) en enero 2012 y marzo 2013. En la figura I.1 se indican los sitios de muestreo. En cada uno de ellos se recolectaron diferente número de muestras (indicado entre paréntesis) de suelo y agua, 3 Bahía Collins (12), Caleta Norma (11), Isla Aldrey (16), Caleta Aldrey (3), Lago Uruguay (10), Bahía Drake (14) y el Glaciar Collins (4). En ambos años se recolectaron un total de 70 muestras. En cada caso, se registró la temperatura y las coordenadas geográficas. Las muestras se colectaron en tubos de 50 mL estériles y se mantuvieron a 0°C hasta el momento de ser procesadas.

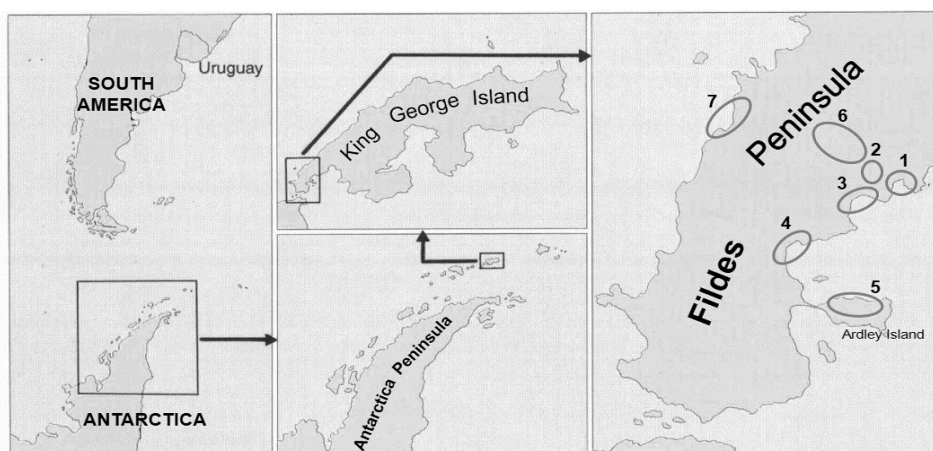


Figura I.1: Ubicación de sitios de muestreo en la Isla Rey Jorge. 1 Bahía Collins; 2 Lago Uruguay; 3 Caleta Norma; 4 Caleta Aldrey; 5 Isla Aldrey; 6 Surrounding Glaciar Collins y 7 Bahía Drake.

I.2.2. Procesamiento de muestra y aislamiento de levaduras:

Se adoptaron estrategias diferentes de acuerdo a las características de la muestra para aislar levaduras adaptadas al frío. Para las muestras sólidas se pesaron asépticamente 10 g de suelo y se resuspendieron en 90 mL de suero fisiológico estéril (dilución 1/10). A partir de esta se realizó la dilución 1/100 en suero fisiológico estéril. Se sembraron

100 µL en superficie de la dilución 1/10 y 1/100 en placa de Dicloran rosa de bengala cloranfenicol agar (DRBCA) (Merk, Darmstadt, Germany) (Anexo 1.1). Para el caso de muestras de agua, 100 µl de la muestra y las diluciones correspondientes se sembraron en superficie en el mismo medio. En ambos casos las placas fueron incubadas a 20°C durante 7 días. En las muestras en donde no se recuperaron levaduras mediante esta técnica, se realizaron enriquecimientos a partir de las mismas. Para ello, 10 g o mL de cada muestra se sembraron en 90 mL de caldo a base de extracto de levadura y nitrógeno (YNB) (Difco, Sparks, USA) (Anexo 1.2) suplementado con 2% de glucosa y 100 µg/mL de cloranfenicol y fueron incubados a 20°C durante 7 días en un *shaker* orbital a 150 rpm. Las levaduras obtenidas de estos enriquecimientos fueron aisladas en placas de DRBCA. En todos los casos las levaduras obtenidas fueron examinadas macro y microscópicamente. De cada muestra se seleccionaron aquellas que presentaron diferente morfotipo y fueron reaisladas en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Oxoid, Hampshire, UK) (Anexo 1.3) a 20°C para obtener cepas puras. Todas las cepas obtenidas fueron almacenadas en caldo Cerebro Corazón (BHI) (Anexo 1.4) con glicerol al 20% a -80°C.

I.2.3. Identificación de levaduras:

Todos los aislamientos fueron identificados a nivel de especie a través del análisis de la secuencia D1/D2, correspondiente al dominio variable del extremo 5' de la subunidad mayor del gen rARN (26SADNr). La extracción de ADN se realizó según Schena *et al.* (1999) con el agregado de perlas de vidrio. El procedimiento consistió en suspender, para cada cepa, una concentración de cultivo fresco equivalente a 1×10^8 cel/mL en 300 µL de buffer de extracción (Anexo 2.1). A dicha suspensión se agregó 0.1 g de perlas de vidrio de 0.5 mm (BioSpec Products, Inc. USA) y 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). Luego de agitar en *vortex* durante 5 minutos, se centrifugó 10 minutos a 7000 rpm. A 200 µL de la fase acuosa obtenida se le agregó 200 µL de isopropanol, y se precipitó a -20°C durante 2 horas. Finalmente se centrifugó 10 minutos a 7000 rpm y descartó el sobrenadante, obteniendo un *pellet* de ADN el cual fue secado a 45°C y resuspendido en 50 µL de agua miliq®. Se amplificó por PCR el segmento mencionado utilizando los primers ITS1v (White *et al.* 1990) y D2R (Peterson *et al.* 2003), cubriendo las regiones ITS1–ITS2 y D1/D2. La reacción se

realizó en un volumen final de 25 μL conteniendo 2,5 μL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16.9 μL de agua miliq® estéril, 1 μL de cada primer (25 μM), 2.5 μL de dNTP (2 mM), 0.1 μL de Taq polimerasa 5 U/ μL (DreamTaq DNA polimerasa, Fermentas International Inc., Canada) y 1 μL de ADN de concentración aproximada 100 ng/ μL . El perfil de temperaturas fue 96°C 2 min, seguido por 35 ciclos de 96°C 30 seg, 51°C 45 seg, 72°C 120 seg, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%, utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). El gel se reveló bajo una lámpara UV. El tamaño del amplicón fue verificado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá). La secuencia nucleotídica de los productos de PCR fue determinada en ambas direcciones, empleando el servicio de secuenciación automática de Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el software MEGA 7 (Kumar *et al.* 2016) y corregidas visualmente. El análisis filogenético de la secuencia D1/D2 de los aislamientos fue realizado con el programa MEGA versión 7. Las secuencias de ADN fueron alineadas con secuencias de regiones homologas de cepas tipo estrechamente relacionadas obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se construyeron 2 árboles filogenéticos, uno para las especies pertenecientes al phylum Ascomycota y otro para las especies del phylum Basidiomycota. En ambos casos, se calcularon las distancias evolutivas usando el método de Jukes–Cantor y los árboles filogenéticos fueron obtenidos por Neighbor-Joining. Todas las posiciones conteniendo *gaps* luego del alineamiento o datos faltantes fueron eliminadas de forma previa al análisis solo en el caso de las comparaciones de secuencia de a pares (*pairwise deletion option*). La estabilidad de los grupos fue alcanzada con 1000 repeticiones (*bootstrap*).

I.2.4. Diversidad de levaduras cultivables:

La diversidad, la abundancia y la dominancia de las levaduras cultivables, fue cuantificada usando los índices de Shannon, Margalef's y Simpson respectivamente, con la ayuda del software PAST, versión 3.11 (Hammer *et al.* 2001). La dominancia fue calculada como 1-el índice Simpson.

I.2.5. Determinación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los aislamientos de levaduras:

Se evaluó la capacidad de los aislamientos de crecer a diferentes temperaturas (4, 20, y 28°C) en placas de PDA. Las placas fueron inoculadas con cultivos frescos (24-48 h) de levaduras, e incubados a diferentes temperaturas. El crecimiento fue monitoreado diariamente durante 1 semana, salvo para las placas incubadas a 4 °C, en donde el monitoreo fue por 2 semanas. Se evaluó cualitativamente el crecimiento de las colonias (De García *et al.* 2007).

I.2.6. Screening de levaduras oleaginosas:

A los aislamientos de levaduras se les evaluó la capacidad de acumular lípidos en su citoplasma, con la finalidad de identificar aquellos aislamientos que fueran oleaginosos. Los aislamientos se incubaron a 20°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de un cultivo con limitación de nitrógeno descrito por Thakur *et al.* (1989) para la acumulación de lípidos intracelulares (anexo 1.5). Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo de estos ensayos se emplearon, para cada cepa, 5 mL de suspensiones (turbidez = McFarland 1) preparadas en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 20°C durante 48 horas. Luego de 5 días de incubación, los cultivos fueron centrifugados (7000 rpm, 6 minutos). Los *pellets* fueron lavados y resuspendidos en agua destilada estéril de manera de tener una suspensión de células, que cuando fuera diluida 40 veces, tuviera una $DO_{600nm} = 0.6$. Se incluyó en el ensayo dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como levaduras no oleaginosas (Vorapreea *et al.* 2012). La mismas fueron obtenidas a partir de dos productos comerciales de levadura activa seca diferente (Fleischman® y Lesaffre®). El contenido lipídico fue estimado de acuerdo a lo descrito por Sitepu *et al.* (2012) con modificaciones. En cada caso, a 160 µL de suspensión de levadura, preparada como fue descrito anteriormente, se le agregó 800 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) y se disolvió en 2240 µL de agua destilada. A la mezcla se le agregó 14.7 µL de una solución de rojo de Nilo en acetona de concentración 0.1 mg/mL. Luego de una incubación de 2 minutos en la oscuridad se le determinó la fluorescencia en un espectrofluorímetro Shimadzu—RF-5301PC. La longitud de onda de excitación fue 488 nm y se midió el espectro de emisión entre 400 a 700 nm. El valor

de fluorescencia considerado para cada muestra se determinó en la longitud de onda donde el valor de fluorescencia fuera máximo en el espectro (Kimura *et al.* 2004).

Los tratamientos se realizaron por duplicado. Los resultados fueron comparados por un ANOVA (análisis de varianza) de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD (*least significant difference*) de Fisher usando el *software* Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $P < 0.05$ fueron consideradas significativas.

I.2.7. Determinación del contenido de lípidos saponificables intracelulares y del porcentaje de acumulación:

Posteriormente, se determinó para los aislamientos que mostraron los mayores niveles de fluorescencia, para las cepas no oleaginosas de *Saccharomyces cerevisiae* comercial y para una cepa que obtuvo un valor intermedio de fluorescencia (*C. sake* 41E), se les determinó gravimétricamente por duplicado la cantidad de lípidos intracelulares saponificables acumulados por volumen de cultivo en litros (L) y el porcentaje de acumulación por biomasa seca (p/p). Las cepas se incubaron en el mismo medio de cultivo empleado para el análisis de *screening*, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL, a 20°C con agitación a 150 rpm. Como inóculo de estos ensayos se emplearon para cada cepa cultivos de 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparadas en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 20°C durante 48 horas. Los lípidos fueron extraídos a los 5 días de incubación por saponificación directa según Pereyra *et al.* (2014). Para la extracción de lípidos se centrifugó 40 mL de cada cultivo, seguido por un lavado con agua destilada. Al *pellet* obtenido se agregó 5 mL de KOH 30% (p/v) y 5 mL de etanol 95% (v/v). La mezcla se incubó a 70°C durante una noche. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y la materia insaponificable se extrajo mediante 2 lavados con 10 mL de hexano. El pH de la fase acuosa fue ajustado a 1 mediante el agregado de HCl, y se recuperó la fracción de ácidos grasos mediante 2 lavados con 10 mL de hexano. Los lípidos saponificables recuperados de esta forma en la fase orgánica fueron pesados luego de la evaporación del solvente bajo presión reducida. De forma paralela se determinó la biomasa de cada cepa por peso seco a partir de 2 mL de cada cultivo. A partir de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de acumulación de lípidos por peso seco para cada aislamiento. Estos

ensayos se realizaron por duplicado, determinando para cada uno el valor promedio y el intervalo de confianza (IC) correspondiente ($\alpha=0.05$) utilizando la herramienta de análisis de Excel 2010. Los resultados obtenidos de lípidos saponificables de cada cepa se compararon mediante un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD de Fisher usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p<0.05$ fueron consideradas significativas

I.2.8. Determinación de perfiles de ácidos grasos de los lípidos acumulados a diferentes temperaturas:

Con la finalidad de determinar el perfil de ácidos grasos de los lípidos acumulados a diferentes temperaturas, estas se cultivaron en condiciones de acumulación de lípidos (limitación de nitrógeno), utilizando el medio descrito por Thakur *et al.* (1989) (anexo 1.5) a dos temperaturas diferentes: 4°C y 20°C, durante 8 y 5 días respectivamente. El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL, con agitación a 150 rpm. Como inóculo de estos ensayos se emplearon para cada cepa cultivos de 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparadas en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 20°C durante 48 horas. Posteriormente se les determinó el perfil de ácidos grasos de los lípidos acumulados según Burja *et al.* (2007), mediante la esterificación de los ácidos grasos con catálisis ácida. En primer lugar se agregaron 3 mL de metanol:HCl:cloroformo (10:1:1 v/v/v) a 20 mg de los lípidos extraídos por saponificación directa. Luego de calentar a 90°C durante 2 horas se agregó 1 mL de agua destilada, y se extrajeron los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante 3 ciclos de agregado de 2 mL de hexano:cloroformo (4:1 v/v). Se recuperó la fase orgánica conteniendo los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), a la cual se agregó 0.5 g de Na₂SO₄ anhidro para eliminar restos de agua. El análisis de los FAMES se realizó por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) usando Agilent Technologies, Inc. 7820A GC equipado con una columna DB-225 Agilent Technologies, Inc. (20 m, 0.100 mm ID, 0.10 μ m). Las condiciones de operaciones fueron: N₂ gas *carrier* 0.2 mL/min, la temperatura del puerto de inyección y del detector fue 250°C. Al horno se le aplicó el siguiente programa de temperatura: 40°C por 0.5 min, aumento de 25°C/min hasta 195°C, aumento de 3°C/min hasta 205°C, aumento de 8°C/min hasta 230°C, y se mantuvo a

230°C durante 10 min. La identificación de los FAMES se realizó comparando los tiempos de retención con obtenidos con un estándar (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich 1891) analizado con las mismas condiciones de cromatografía gaseosa. Se utilizó como estándar interno nonadecanoato de metilo (74208-1G Fluka Analytical Sigma-140 Aldrich 1891) en una concentración de 1.5 mg/mL. El total de los FAMES se calculó como la suma de las áreas de cada pico individual y se relacionó con el área del estándar interno. El porcentaje en la mezcla de cada éster metílico se determinó en función de la relación del área de cada pico con respecto a la suma total de áreas. Finalmente se determinaron en forma teórica algunos parámetros a partir del perfil de ésteres metílicos de los ácidos grasos encontrados. Se calculó el número de cetano (CN), a partir del índice de yodo (IV) y el índice de saponificación (SN) según Azam *et al.* (2005). El índice de insaturación (DU), a partir de la concentración de ácidos grasos saturados (MUFA) y la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) según Wu & Miao (2014). El punto de taponamiento de filtro en frío (CFPP) y punto de enturbiamiento (CP) se calcularon a partir del factor de saturación de cadena larga (LCSF) según Caldeira *et al.* (2017). Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$SN = \sum (560 \times A_i / MW_i)$$

$$IV = \sum (254 \times D \times A_i) / MW_i$$

$$CN = 46.3 + 5458 / SN - 0.225 \times IV$$

$$DU = MUFA + (2 \times PUFA)$$

$$LCSF (\%) = (0.1 \times C16:0) + (0.5 \times C18:0) + (1 \times C20:0) + (1.5 \times C22:0) + (2 \times C24:0)$$

$$CFPP (^{\circ}C) = (3.417 \times LCSF) - 16.477$$

$$CP (^{\circ}C) = (CFPP + 2.9) / 1.0191$$

donde A_i es el porcentaje relativo (m/m), D es el número de dobles enlaces, y MW_i es la masa molecular de cada ácido graso componente de los lípidos analizados. MUFA = % en peso de ácidos grasos monoinsaturados y PUFA = % en peso de ácidos grasos poliinsaturados. A su vez, los valores obtenidos se compararon con los requisitos establecidos en la norma UNIT 1100:2014.

I.2.9. Temperatura de crecimiento de la cepa seleccionada:

Se realizaron cultivos por triplicado incubando a 10, 15, 20, 25 y 28°C con agitación (150 rpm) en medio líquido YNB (anexo 1.2) con 0.5% de glucosa en matraces

Erlenmeyer de 100 mL con un volumen de 20 mL, con agitación a 150 rpm. Como inóculo de estos ensayos se emplearon para cada cepa cultivos de 0.5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparadas en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 20°C durante 48 horas. Para cada temperatura se midió número de células cada 3 horas aproximadamente por recuento directo en cámara de Thoma durante 48 horas. Se determinó la velocidad específica de crecimiento de cada temperatura. Para ello, se graficó $\ln(X/X_0)$ en función del tiempo, siendo X_0 el número de células inicial, siendo la pendiente de esta gráfica la velocidad específica de crecimiento. Se seleccionó la temperatura en donde el valor de velocidad de crecimiento fuera máximo.

I.2.10. Asimilación de fuentes carbonadas:

Para evaluar los posibles sustratos para la producción de lípidos de la cepa seleccionada (*C. glabrosa* 12D), se estudió la asimilación de distintas fuentes de carbono mediante auxonogramas según metodología de Kurtzman *et al.* (2011). Se seleccionaron los sustratos carbonados (sacarosa, lactosa y glicerol) identificados como principales componentes de 3 subproductos industriales obtenidos en Uruguay: melaza, suero de leche y glicerina cruda, respectivamente. Se eligió al sustrato glucosa como control positivo. Todos los ensayos se realizaron en medio sólido (YNB (anexo 1.2), agar 1.5%), con excepción del ensayo de asimilación de glicerol que se realizó en medio líquido (YNB). En este caso, para detectar asimilación de glicerol se midió absorbancia a 600 nm del cultivo en glicerol (volumen 25 mL) luego de 6 días de incubación a 20°C con agitación a 150 rpm y se comparó con la absorbancia obtenida en el medio sin agregado de fuente de carbono. Los auxonogramas en medio sólido se realizaron por siembra incorporada de 1 mL de una suspensión de la cepa en suero fisiológico ajustada a la escala 4 de Mc Farland, en 10 mL de medio de cultivo. Las placas se incubaron a 20°C hasta la observación de crecimiento en el control positivo.

I.3. Resultados

I.3.1. Aislamiento de levaduras:

De todas las muestras recolectadas durante las expediciones antárticas, dos tercios ($n = 43$) fueron muestras sólidas provenientes de suelo o sedimentos, mientras que el resto ($n = 27$) correspondieron a aguas terrestres y marinas. Las temperaturas de los sitios de muestreo variaron entre -0.4 a 11°C . No fue posible aislar levaduras de todas las muestras. En el 64 % de los casos, las levaduras no pudieron recuperarse directamente de las muestras sin un enriquecimiento previo, lo que demuestra que en estos casos la concentración de levaduras fue inferior a 10 ufc/g o 1 ufc/mL en muestras sólidas y de agua, respectivamente. En estos casos, después de un enriquecimiento de 10 g o 10 mL de muestra, sólo se pudieron recuperar levaduras del 60% de las muestras procesadas, lo que significa que en 18 muestras la concentración de levaduras psicotolerantes cultivables fue inferior a 1 ufc en 10 g o 10 mL. De hecho, el recuento de levaduras en todas las muestras fue bajo, siendo 5×10^4 cfu/g la concentración más alta detectada, la cual correspondió a una muestra de suelo de la isla Ardley (S $62^{\circ}12'45''$; W $58^{\circ}55'16.9''$). En la tabla I.1 se detallan las levaduras aisladas, su origen y su capacidad de crecer a diferentes temperaturas.

Tabla I.1: Identificación, fuente y rango de temperatura de crecimiento de las levaduras aisladas.

Cepa	Muestra	4°C	20°C	28°C	Identificación
4E	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus aerius</i>
4BE	Suelo	+	+	-	<i>Cryptococcus keelungensis</i>
4CE	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus aerius</i>
5E	Suelo	+	+	-	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
7AE	Suelo	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
7BE	Suelo	-	+	-	<i>Candida davisiana</i>
8E	Suelo	+	+	+	<i>Guehomyces pullulans</i>
10E	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus victoriae</i>
12R	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
12D	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
13R	Suelo	+	+	-	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
14E	Agua	+	+	+	<i>Cryptococcus victoriae</i>
14BE	Agua	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
15E	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
17E	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
19R	Suelo	+	+	-	<i>Cryptococcus victoriae</i>
19DA	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus victoriae</i>
19DB	Suelo	+	+	+	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
20E	Agua	+	+	-	<i>Metschnikowia australis</i>
21R	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
22AE	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus gastricus</i>
22BE	Suelo	+	+	-	<i>Cryptococcus gilvescens</i>
24E	Suelo	+	+	+	<i>Candida glabrosa</i>
29AE	Agua	+	+	+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
29BE	Agua	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
32R	Suelo	+	+	-	<i>Metschnikowia australis</i>
33AE	Agua	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
35E	Agua	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
36E	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>
37E	Agua	+	+	+	<i>Cryptococcus tephrensensis</i>
37BE	Agua	+	+	+	<i>Metschnikowia australis</i>
39E	Agua	-	+	-	<i>Metschnikowia australis</i>
41E	Suelo	+	+	+	<i>Candida sake</i>
F3A	Suelo	+	+	-	<i>Candida davisiana</i>
F3B	Suelo	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
F3C	Suelo	+	+	-	<i>Candida davisiana</i>
F3E	Suelo	-	+	+	<i>Rhodotorula minuta</i>
F4A	Suelo	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
F6E	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F7A	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F9D	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F9H	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>

Tabla I.1 (cont): Identificación, fuente y rango de temperatura de crecimiento de las levaduras aisladas

Cepa	Muestra	4°C	20°C	28°C	Identificación
F12B	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F12C	Suelo	+	+	-	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
F12D	Suelo	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
F13D	Agua	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F13E	Agua	+	+	+	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>
F18A	Agua	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F20A	Suelo	+	+	-	<i>Leucosporidiella muscorum</i>
F22B	Agua	+	+	+	<i>Candida zeylanoides</i>
F24A	Agua	+	+	+	<i>Debaryomyces macquariensis</i>
F26A	Suelo	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
F26D	Suelo	+	+	+	<i>Cryptococcus victoriae</i>
F27A	Suelo	+	+	-	<i>Metschnikowia australis</i>
F32A	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F33B	Agua	+	+	+	<i>Rhodotorula laryngis</i>
F39A	Suelo	+	+	+	<i>Debaryomyces hansenii</i>

I.3.2. Identificación de levaduras:

Se obtuvieron un total de cincuenta y ocho aislamientos de levaduras. Se pudieron identificar todos a nivel de especie mediante análisis molecular. Esto fue posible debido a que en el análisis de BLAST de las secuencias D1/D2 de los aislamientos, en todos los casos, se logró encontrar una similitud superior al 99 % con secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a cepas tipo de una sola especie en cada caso. Se realizaron 2 árboles filogenéticos, basado en secuencias de la región D1/D2, uno para los aislamientos del phylum Ascomycota y otro para los aislamientos del phylum Basidiomycota (figuras I.2 y I.3 respectivamente). En todos los casos se corroboró el agrupamiento de los diferentes aislamientos en clados junto a cepas tipo de las diferentes especies cuyas secuencias se encontraban depositadas en el GenBank. El agrupamiento conseguido corroboró los resultados obtenidos mediante BLAST.

Los aislamientos se pudieron clasificar en ocho géneros diferentes (*Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Rhodotorula*, *Guehomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cystofilobasidium*, y *Debaryomyces*). En la figura I.4 se muestra en un gráfico el porcentaje de cepas pertenecientes a los diferentes géneros encontrados con respecto al total. La mayoría de los aislamientos pertenecieron al phylum Ascomycota, distribuidos en solamente 3 géneros (*Candida*, *Metschnikowia* y *Debaryomyces*).

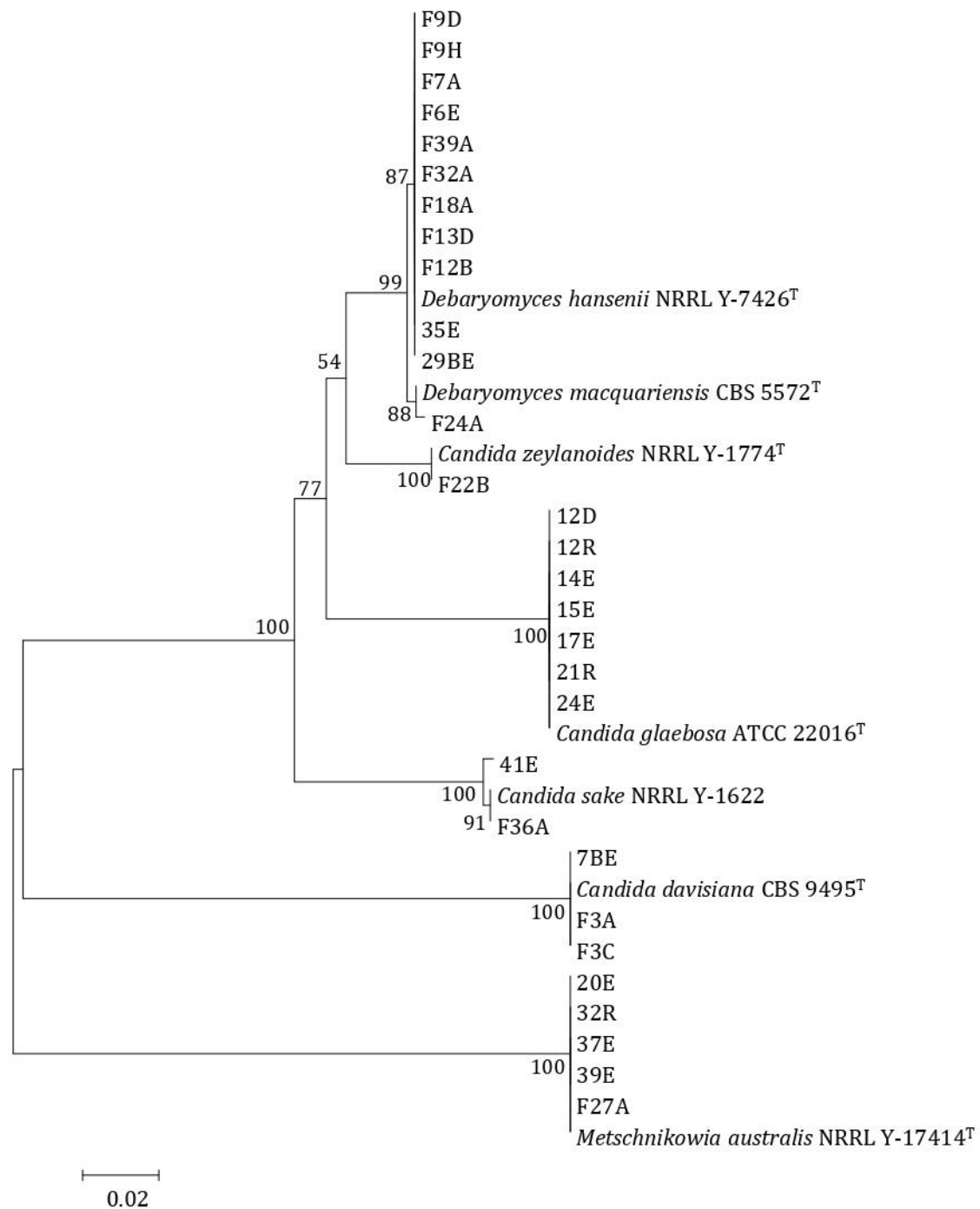


Figura I.2: Árbol filogenético construido en base a secuencias de la región D1/D2 de las levaduras, pertenecientes al phylum Ascomycota, aisladas de la isla Rey Jorge, Antártida. El árbol fue construido empleando el método Neighbor-Joining. Los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) se indican en los nodos, exceptuando los valores menores a 50.

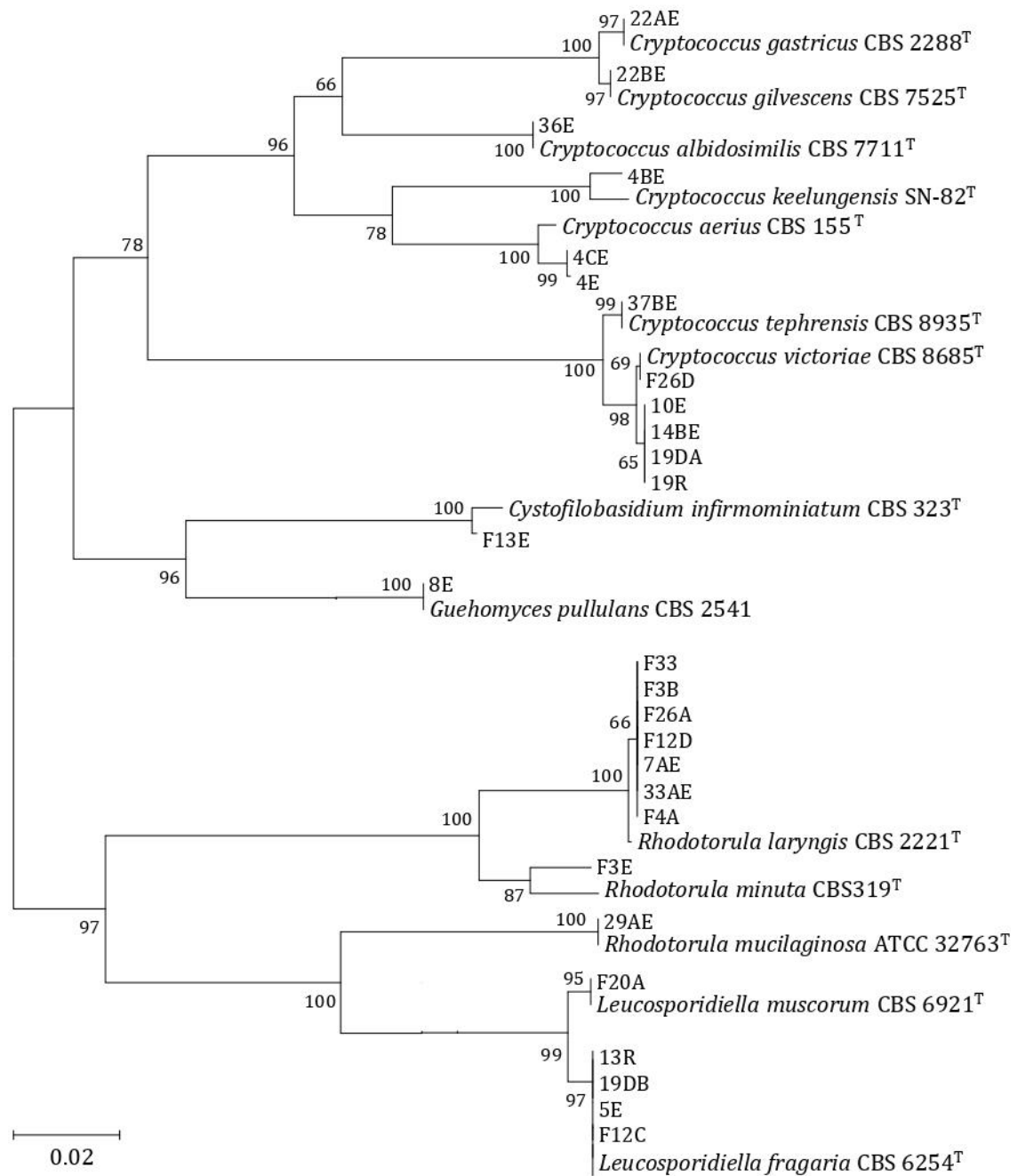


Figura I.3: Árbol filogenético construido en base a secuencias de la región D1/D2 de las levaduras, pertenecientes al phylum Basidiomycota, aisladas de la isla Rey Jorge, Antártida. El árbol fue construido empleando el método Neighbor-Joining. Los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) se indican en los nodos, exceptuando los valores menores a 50.

El género encontrado en mayor proporción, fue el género *Candida*, con 13 aislamientos, seguido por los géneros *Cryptococcus* y *Debaryomyces*, con 12 aislamientos cada uno. La especie más abundante fue *Debaryomyces hansenii*, con un total de 11 aislamientos perteneciente a esta especie. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a la región D1/D2 de todos los aislamientos se encuentran depositadas en GenBank bajo los números de acceso KU659485 – KU659542.

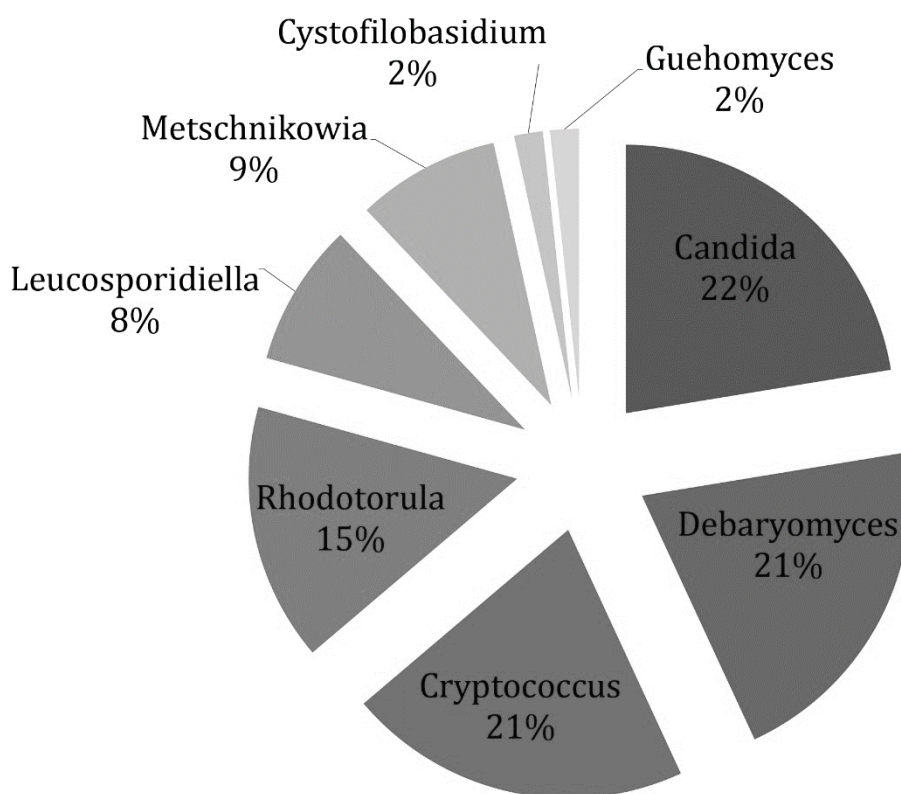


Figura I.4: Gráfico de torta con el porcentaje de los distintos géneros identificados de levaduras aisladas de la isla Rey Jorge, Antártida.

I.3.3. Diversidad de levaduras cultivables:

La comunidad fúngica mostró, en general, una diversidad moderada (Índice Shannon = 2.78), una alta abundancia de especies (Índice Margalef = 5.59) y una dominancia baja (Índice de Simpson = 0.915 e Índice Dominancia = 0.085).

I.3.4. *Screening* de levaduras oleaginosas:

El contenido lipídico de cada cepa fue estimada utilizando rojo de Nilo. Esta sonda fluorescente se une a los lípidos intracelulares emitiendo fluorescencia cuando es excitada con una fuente lumínica adecuada. En la figura I.5. y I.6 se presentan los resultados de las unidades de fluorescencia obtenidas al analizar las diferentes cepas, tanto oleaginosas como no oleaginosas. La categorización en los dos grupos se hizo tomando en cuenta los valores de fluorescencia obtenidos con cada cepa en relación a los observados para dos cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* (especie no oleaginosa) producidas por las empresas Fleischman® y Lesaffre® denominadas como F* y L* respectivamente. A su vez, para dichas cepas comerciales se determinaron los lípidos saponificables acumulados por gravimetría (de acuerdo a lo descrito en I.2.7), los cuales representaron el $(17 \pm 1) \%$ y $(15 \pm 1) \%$ de su biomasa seca, respectivamente, lo cual confirma que se trata de cepas no oleaginosas. En presencia de rojo de Nilo, las cepas F* y L* exhibieron (335 ± 9) y (309 ± 2) unidades de fluorescencia, respectivamente. Ventiocho aislamientos exhibieron niveles de fluorescencia que no presentaron diferencias significativas o fueron inferiores a los niveles de fluorescencia de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas, por lo que se consideraron como levaduras no oleaginosas. A su vez, se determinó que la cepa *Candida sake* 41E que presentaba un nivel intermedio de fluorescencia, era capaz de acumular lípidos saponificables que representaban el $(24.2 \pm 0.7) \%$ de su biomasa seca y, por lo tanto, podría considerarse una cepa oleaginosa. De acuerdo a ello, treinta cepas mostraron valores de fluorescencia significativamente iguales o superiores a esta cepa y se consideraron como potenciales microorganismos oleaginosos. El aislamiento 8E, identificado como *Guehomyces pullulans*, mostró los valores más altos de unidades de fluorescencia.

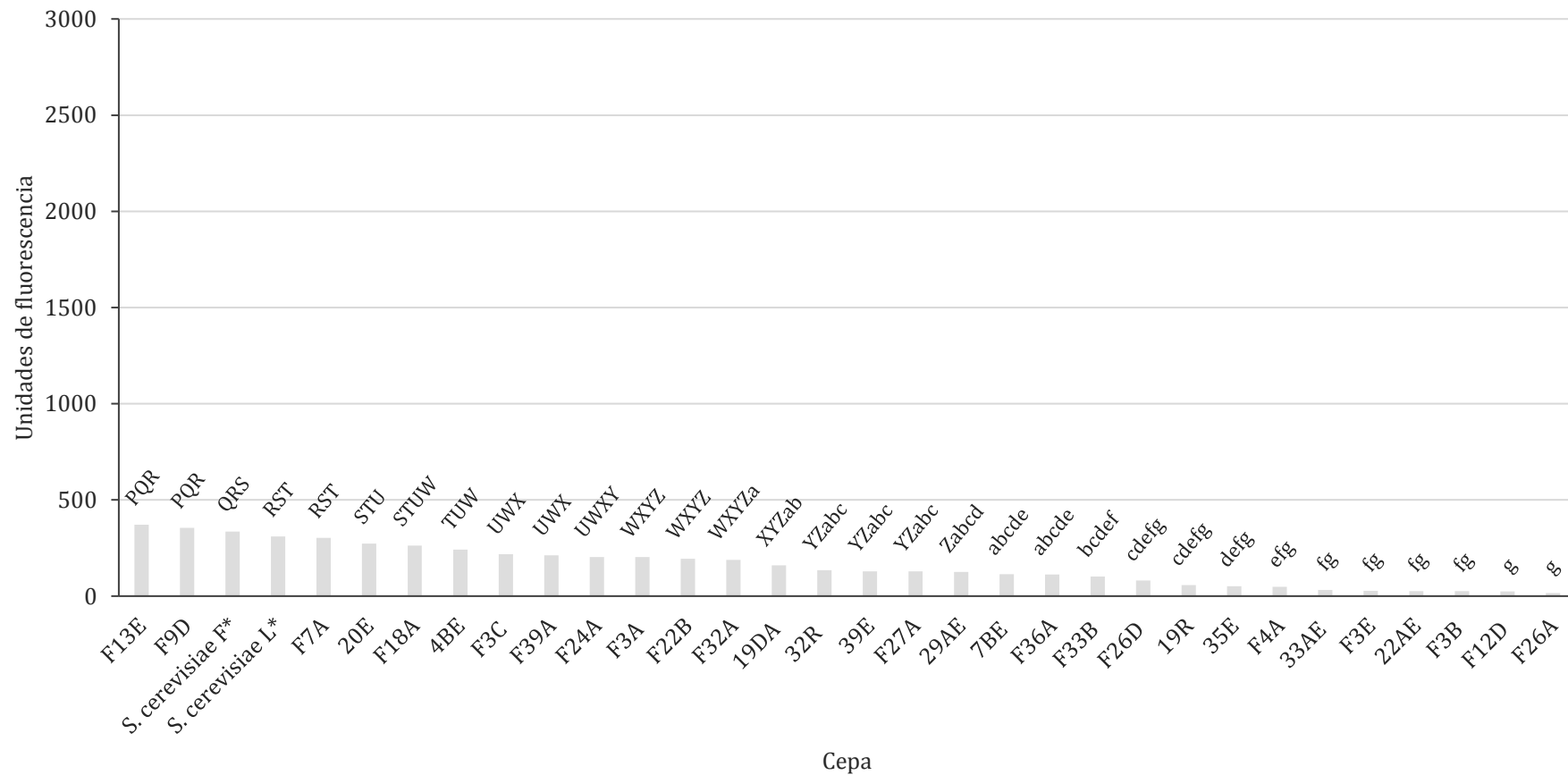


Figura I.5: Unidades de fluorescencia de los aislamientos de levaduras no oleaginosas. Las cepas comerciales *S. cerevisiae* F* (Fleischman®) y *S. cerevisiae* L* (Lesaffre®). Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher FSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

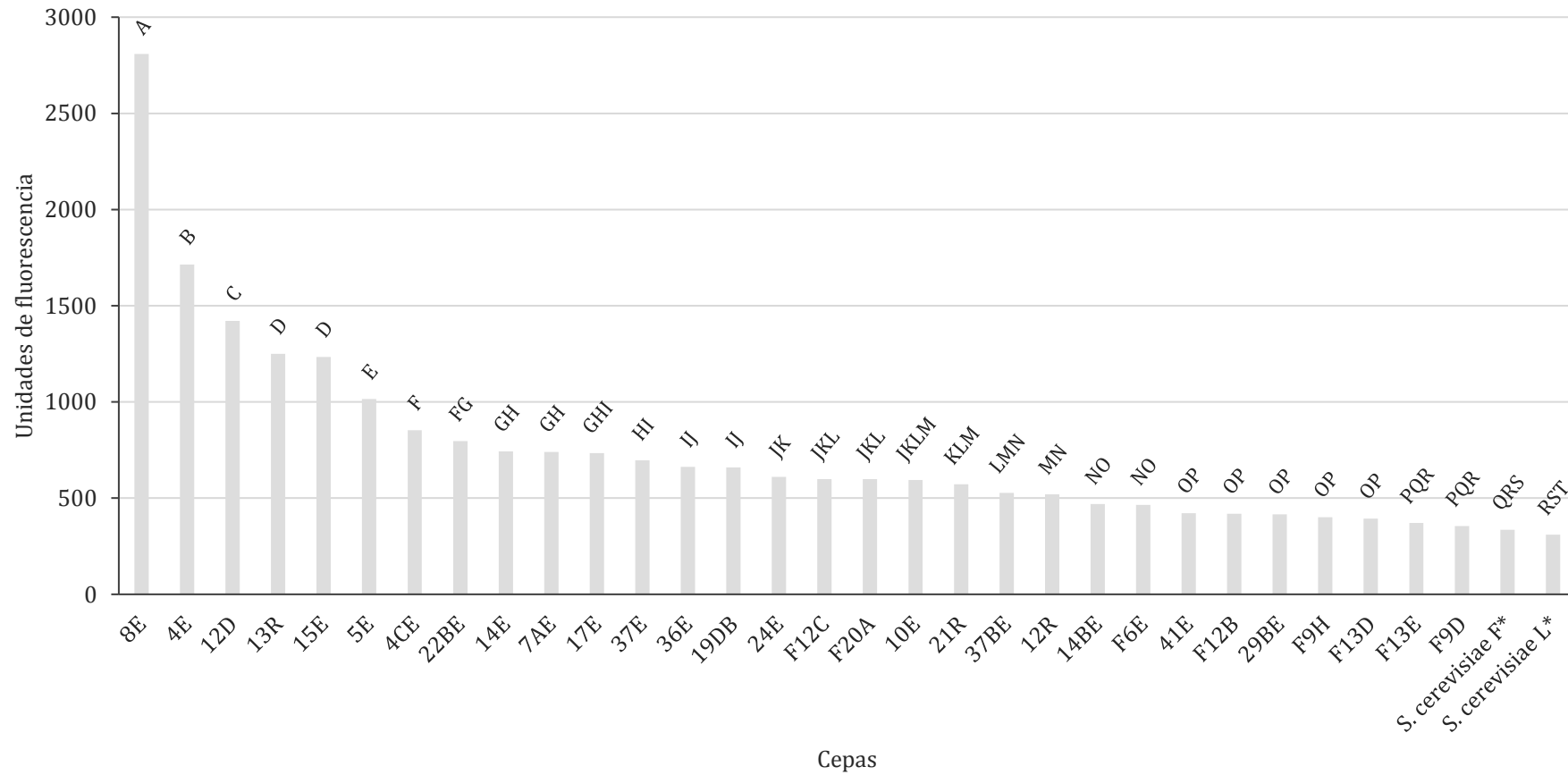


Figura I.6: Unidades de fluorescencia de los aislamientos de potenciales levaduras oleaginosas. Las cepas comerciales *S. cerevisiae* F* (Fleischman®) y *S. cerevisiae* L* (Lesaffre®). Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher FSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras

I.3.5. Determinación de lípidos saponificables intracelulares y porcentaje de acumulación:

Para las seis cepas que presentaron niveles de fluorescencia significativamente mayores que el resto de las levaduras, se determinaron los lípidos intracelulares saponificables acumulados por gravimetría de acuerdo a lo descrito en I.2.7. Los aislamientos analizadas fueron 8E (*Guehomyces pullulans*), 4E (*Cryptococcus aerius*), 12D (*Candida glabrosa*), 13R (*Leucosporidiella fragaria*), 15E (*Candida glabrosa*) y 5E (*Leucosporidiella fragaria*). Los resultados se expresaron en gramos de lípidos saponificables por litro de cultivo y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD ($\alpha=0.05$). Estos resultados se muestran en la figura I.7. En la comparación se incluyen los resultados obtenidos para las cepas 41E, F* y L*. Como se puede ver en la figura I.7 las seis cepas que mostraron mayor fluorescencia en el *screening* acumularon una cantidad de lípidos saponificables significativamente mayor que la cepa *C. sake* 41E y que ambas cepas comerciales. de *S. cerevisiae*. Sin embargo, también se evidenció que los valores de fluorescencia obtenidos en el análisis con rojo de Nilo (figura I.6), no se correlacionaron exactamente con el contenido de lípidos saponificables de las cepas. De acuerdo al análisis gravimétrico, las concentraciones de lípidos en cultivo más elevadas se obtuvieron con las cepas 12D y 8E, las cuales resultaron significativamente mayores que las producidas por el resto de las cepas.

En la tabla I.2 se presentan los porcentajes de acumulación de lípidos por biomasa seca de cada una de las cepas ensayadas. Como puede observarse todas las cepas evaluadas acumularon más del 20 % de lípidos en su peso seco, por lo cual es correcto clasificarlos como microorganismos oleaginosos, a diferencias de las cepas F* y L* (*S. cerevisiae*).

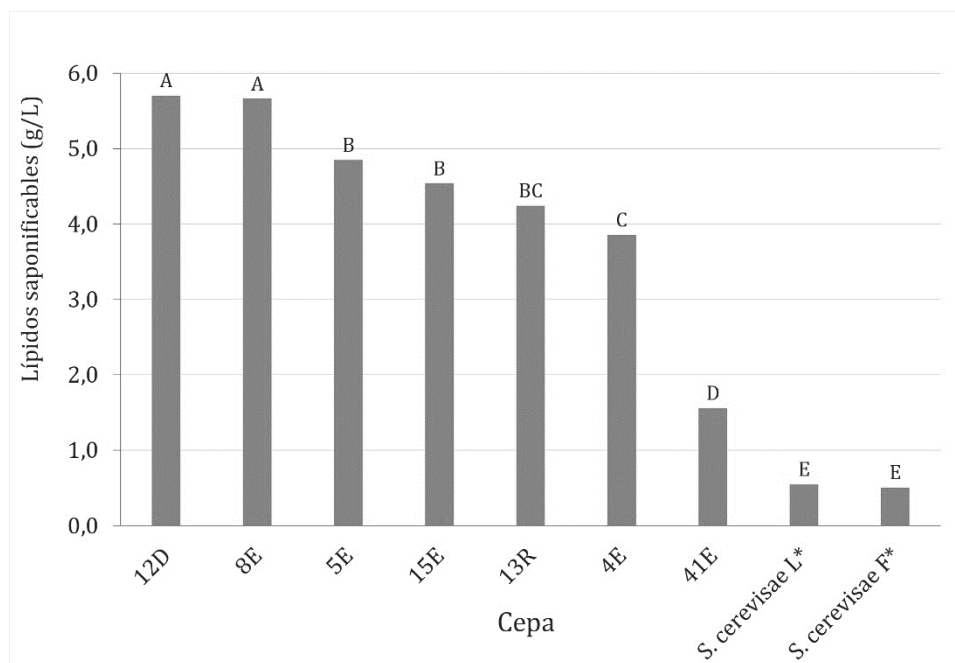


Figura I.7: Lípidos saponificables en g/L de cultivo de los aislamientos incubados a 20°C. Las cepas comerciales *S. cerevisiae* F* (Fleischman®) y *S. cerevisiae* L* (Lesaffre®). Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

Tabla I.2: Porcentaje de acumulación de los aislamientos seleccionados a 20°C y de las cepas comerciales *S. cerevisiae* F* (Fleischman®) y *S. cerevisiae* L* (Lesaffre®).

Cepa	%Acumulación
12D	(51 ± 1) ^A
15E	(43 ± 4) ^B
8E	(42 ± 1) ^B
5E	(41 ± 3) ^{BC}
13R	(37 ± 4) ^{CD}
4E	(36 ± 2) ^D
41E	(24 ± 1) ^E
<i>S. cerevisiae</i> F*	(17 ± 1) ^F
<i>S. cerevisiae</i> L*	(15 ± 1) ^F

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD (least significant difference). Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras.

Los aislamientos seleccionados en I.3.5 por sus mayores valores de fluorescencia, presentaron porcentajes de acumulación significativamente mayores que la cepa *C. sake* 41E. A su vez, la cepa *C. glabrosa* 12D evidenció un porcentaje de acumulación superior al 50%, el cual fue significativamente mayor que el obtenido para el resto de los aislamientos. Es de destacar que, en esta selección, 4 cepas lograron acumular lípidos saponificables que representaron más del 40% de su peso seco.

I.3.6. Determinación de lípidos saponificables y perfiles de ácidos grasos de los lípidos acumulados a diferentes temperaturas:

Las cepas seleccionadas en el punto anterior, fueron incubadas en las condiciones descritas en el punto I.2.8. a dos temperaturas diferentes: 20°C y 4°C. Se extrajeron los lípidos saponificables y se cuantificaron según el punto I.2.7. Las cantidades de lípidos saponificables por volumen de cultivo obtenidas a partir de los aislamientos incubados a 4°C se muestra en la figura I.8.

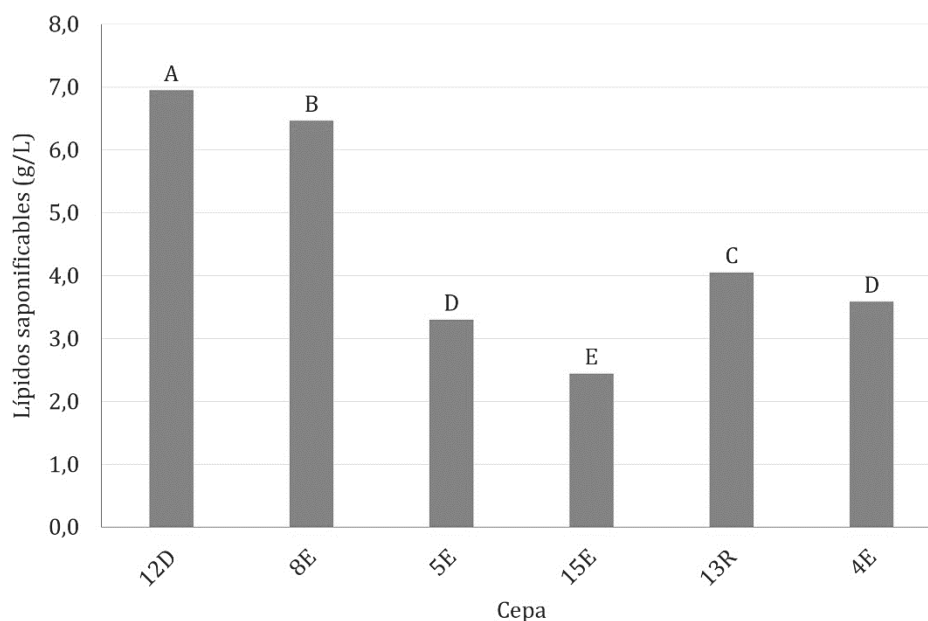


Figura I.8: Lípidos saponificables en g/L de cultivo de los aislamientos incubados a 4°C. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

El aislamiento 12D a 4°C acumuló una cantidad de lípidos saponificables significativamente mayor que el resto de los aislamientos. A esta temperatura, este

aislamiento logró acumular una cantidad de lípidos significativamente mayor que el aislamiento 8E, a diferencia de lo que sucedió a 20°C, en donde no se observó diferencia significativa en la cantidad de lípidos saponificables entre ambas (figura I.7). En la tabla I.3 se muestran los porcentajes de acumulación a 4°C de las cepas seleccionadas.

Tabla I.3: Porcentaje de acumulación a 4°C de los aislamientos seleccionados.

Cepa	%Acumulación
12D	(62 ± 2) ^A
15E	(29 ± 1) ^D
8E	(52 ± 1) ^B
5E	(32 ± 2) ^D
13R	(38 ± 3) ^C
4E	(30 ± 2) ^D

Nota. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras.

Es de destacar los elevados niveles de acumulación de lípidos de las cepas 12D y 8E, los cuales superaron el 50%. A su vez, los aislamientos 12D, 8E y 13R presentaron a 4°C mayor porcentaje de acumulación que a 20°C. Sin embargo, para los aislamientos 5E, 4E y 15E, los mayores porcentajes de acumulación se dieron a 20°C.

A continuación, se presenta una tabla comparativa entre los porcentajes de acumulación y concentración de lípidos acumulados de cada cepa a diferentes temperaturas (tabla I.4).

Tabla I.4: Porcentajes de acumulación y lípidos saponificables a diferentes temperaturas de los aislamientos seleccionados.

Cepa	Temperatura de incubación	% de acumulación	Lípidos saponificables (g/L)
4E	4°C	(30 ± 2) ^A	(3.6 ± 0.3) ^A
	20°C	(36 ± 1) ^B	(5.6 ± 0.2) ^B
5E	4°C	(32 ± 2) ^A	(3.3 ± 0.3) ^A
	20°C	(41 ± 3) ^A	(5.6 ± 0.9) ^B
8E	4°C	(53 ± 1) ^A	(6.5 ± 0.1) ^A
	20°C	(42 ± 1) ^A	(4.7 ± 0.6) ^B
12D	4°C	(62 ± 2) ^A	(6.9 ± 0.3) ^A
	20°C	(51 ± 1) ^A	(6.1 ± 0.4) ^A
13R	4°C	(38 ± 3) ^A	(4.1 ± 0.2) ^A
	20°C	(37 ± 4) ^A	(5.7 ± 0.8) ^B
15E	4°C	(29 ± 1) ^A	(2.44 ± 0.03) ^A
	20°C	(37 ± 4) ^A	(4.5 ± 0.8) ^B

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$; las mimsas están indicadas por diferentes letras.

Al comparar los porcentajes de acumulación a diferentes temperaturas de cada cepa, puede observarse que, salvo para la cepa 4E, no existieron diferencias significativas en los porcentajes de acumulación a 4 y 20°C. En cuanto a la concentración de lípidos acumulados por volumen de cultivo las cepas 4E, 5E, 13R y 15E acumularon significativamente más lípidos a 20°C que a 4°C, a diferencia de la cepa 8E que acumuló una cantidad significativamente mayor a 4°C. Para la cepa 12D no existieron diferencias significativas en la concentración de lípidos saponificables obtenidos a ambas temperaturas. Los lípidos saponificables producidos a 4°C y a 20°C por cada cepa se esterificaron como fue descrito en I.2.8. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizaron por cromatografía gaseosa. En la tabla I.5. se presenta la composición en porcentaje, de los ésteres metílicos obtenidos.

Tabla I.5: Porcentaje e identificación de los ésteres metílicos acumulados por los aislamientos seleccionados.

Cepa	Temperatura de incubación	% 14:0	% .16:0	% 16:1n7	% 18:0	% 18:1n9	% 18:2n6	% 18:3n3
4E	4°C	0 ^A	17 ^A	9 ^A	4 ^A	60 ^A	6 ^A	1 ^A
	20°C	0 ^A	25 ^B	2 ^B	4 ^A	57 ^B	4 ^B	0 ^B
5E	4°C	0 ^A	23 ^A	1 ^A	2 ^A	57 ^A	17 ^A	3 ^A
	20°C	1 ^B	25 ^B	1 ^A	2 ^A	53 ^B	11 ^B	2 ^B
8E	4°C	0 ^A	17 ^A	1 ^A	3 ^A	58 ^A	15 ^A	3 ^A
	20°C	0 ^A	21 ^B	0 ^B	3 ^A	51 ^B	13 ^B	0 ^B
12D	4°C	1 ^A	16 ^A	10 ^A	2 ^A	63 ^A	3 ^A	2 ^A
	20°C	0 ^B	19 ^B	7 ^B	2 ^A	53 ^B	2 ^B	1 ^B
13R	4°C	1 ^A	21 ^A	2 ^A	1 ^A	54 ^A	15 ^A	8 ^A
	20°C	1 ^B	28 ^B	1 ^B	3 ^B	49 ^B	13 ^B	3 ^B
15E	4°C	1 ^A	16 ^A	7 ^A	3 ^A	61 ^A	5.4 ^A	4 ^A
	20°C	0 ^B	19 ^B	3 ^B	7 ^B	53 ^B	4.5 ^B	2 ^B

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras.

Como puede observarse en la tabla I.5 en todos los aislamientos a 4°C hay una disminución significativa en el porcentaje correspondiente al éster metílico del ácido palmítico (16:0). A su vez, a 4°C se observa un aumento significativo en los porcentajes de todos los ésteres metílicos de los ácidos insaturados, palmitoleico (16:1n7), oleico (18:1n9), linoléico (18:2n6) y linolénico (18:3n3).

Tabla I.6: Valores de número de cetano (CN), índice de insaturación (DU), punto enturbiamiento (CP) y punto de obstrucción del filtro en frío (CFPP) de los aislamientos seleccionados a diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura de incubación	Número de cetano (CN)	Índice de insaturación (DU)	CP (°C)	CFPP (°C)
4E	4°C	57	0.8	4.1	-4.5
	20°C	61	0.7	8.1	-1.7
5E	4°C	52	1.0	6.9	-5.3
	20°C	58	0.8	8.0	-4.3
8E	4°C	54	1.0	3.9	-6.3
	20°C	60	0.8	6.3	-5.0
12D	4°C	57	0.8	3.2	-7.7
	20°C	63	0.7	5.2	-5.9
13R	4°C	53	1.0	6.0	-7.8
	20°C	57	0.8	9.8	-3.1
15E	4°C	57	0.9	3.7	-6.6
	20°C	63	0.7	4.8	0.6

Nota: Los valores fueron calculados con los valores promedio de los el perfil de ácidos grasos en cada caso.

Se puede observar que, en todos los casos, tanto a 4°C como a 20°C, el porcentaje correspondiente al éster metílico del ácido linolénico (18:3n3) está por debajo de 12%. Además, no hay presencia ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados (≥ 4 dobles enlaces), cumpliendo con los requisitos establecidos por la norma UNIT 1100:2014.

En la tabla I.6 pueden observarse los valores calculados para el número de cetano y para los tres parámetros que tienen relación con la fluidez en frío del biodiésel, estos son: el índice de insaturación (DU), el punto enturbiamiento (CP) y el punto de obstrucción del filtro en frío (CFPP). En todos los casos, el número de cetano está por encima de 45, cumpliendo con uno de los requisitos establecidos por la norma UNIT 1100:2014. Para CP y CPFF a 4°C se obtuvieron valores menores que a 20°C, y para DU este comportamiento fue al contrario, siendo a 4°C superior que a 20°C, en todos los casos.

I.3.7. Temperatura de crecimiento de la cepa seleccionada:

Se determinó la temperatura de crecimiento del aislamiento 12D. Para ello se determinó la velocidad específica de crecimiento a 10, 15, 20, 25 y 28°C. Los resultados de las velocidades específicas de crecimiento para cada temperatura se presentan en la tabla I.7. Como puede observarse a 20°C la velocidad específica de crecimiento es significativamente mayor que al resto de las temperaturas ensayadas, por lo cual se considera esta temperatura como la temperatura óptima de crecimiento del aislamiento 12D dentro de las temperaturas ensayadas.

Tabla I.7: Velocidades específicas de crecimiento

Temperatura (°C)	10	15	20	25	28
μ 1(h ⁻¹)	0.168	0.181	0.251	0.192	0.157
μ 2(h ⁻¹)	0.178	0.224	0.238	0.190	0.152
μ 3(h ⁻¹)	0.171	0.224	0.239	0.189	0.158
Media (μ)	(0.173 ±	(0.210 ±	(0.243 ±	(0.190 ±	(0.156 ±
(h ⁻¹)	0.006) ^{CD}	0.003) ^B	0.008) ^A	0.002) ^{BC}	0.004) ^D

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras.

En la figura I.9 se muestra el gráfico de velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura, en donde se puede observar las diferentes velocidades específicas de crecimiento en función de la temperatura.

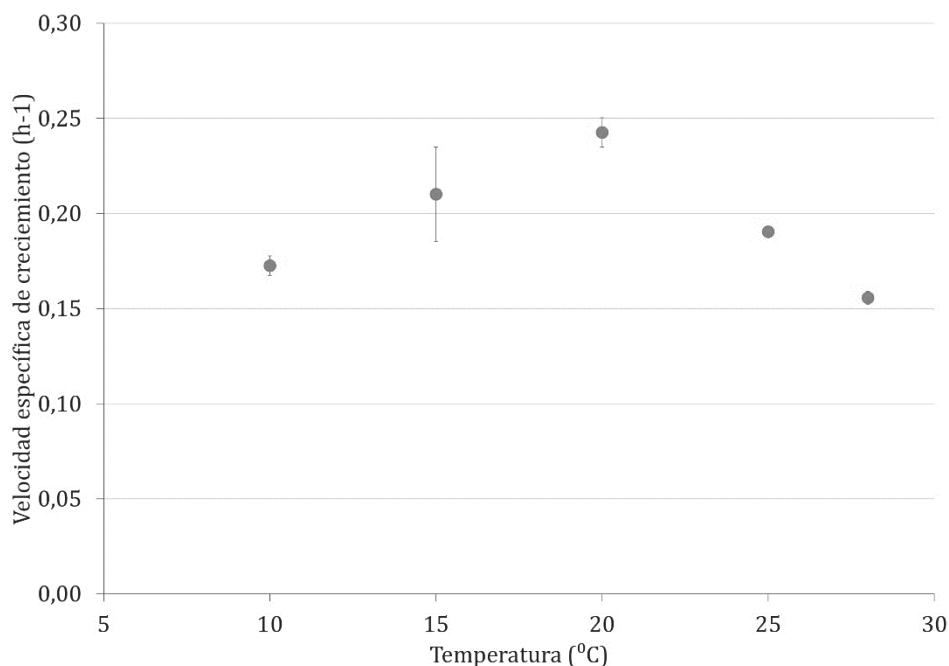


Figura I.9: Relación entre la velocidad específica de crecimiento y la temperatura. Las barras corresponden al intervalo de confianza de 3 repeticiones con $\alpha=0.05$

I.3.8. Asimilación de fuentes carbonadas:

En la tabla I.8 se muestran el resultado de la evaluación de la capacidad de asimilación de diferentes fuentes de carbono para la cepa 12D. La misma fue capaz de utilizar sacarosa, lactosa y glicerol como única fuente de carbono.

Tabla I.8: Evaluación de la capacidad de asimilación de las la cepa 12D

Cepa	Sacarosa	Lactosa	Glicerol
12D	+	+	+

Nota: El símbolo + representa que la cepa fue capaz de asimilar la fuente ensayada,

Para el caso del glicerol, para el cual el ensayo se realizó en medio líquido, la absorbancia obtenida en presencia del mismo fue mayor que la observada en el blanco sin fuente de carbono, lo que significó que el aislamiento seleccionado tuvo la capacidad de utilizar este compuesto como única fuente.

I.4. Discusión del capítulo

Se aislaron cincuenta y ocho levaduras adaptadas al frío de muestras terrestres y marinas de la Isla Rey Jorge. Los aislamientos se agruparon en 21 especies, de las cuales *Rhodotorula laryngis*, *Candida glabrata* y *Debaryomyces hansenii* fueron las más especies mayoritarias. En general, la comunidad mostró diversidad moderada con valores similares a los observados en otros ambientes fríos (Baeza *et al.* 2019) y una elevada riqueza a nivel de especie lo cual resultó favorable para el hallazgo de nuevas especies oleaginosas. Ninguna de las especies de levadura encontradas en este trabajo es endémica de la Antártida, ya que se han reportado previamente en otros ambientes fríos como la región del Ártico, los glaciares europeos o incluso hábitats más templados (Kurtzman *et al.* 2011). En realidad, la mayoría de los hongos cultivables que se han encontrado en la Antártida pertenecen a especies cosmopolitas (Godinho *et al.* 2015; Gomes *et al.* 2018). Todos los aislamientos de levaduras obtenidos fueron analizados para determinar su potencial oleaginoso. El método seleccionado para realizar este *screening* inicial se basó en el uso de una sonda fluorescente llamada rojo de Nilo que se une a los lípidos saponificables en los cuerpos lipídicos intracelulares (Sitepu *et al.* 2012). Este método sencillo permite el análisis de un gran número de cepas en poco tiempo, por lo cual se considera una buena alternativa al método gravimétrico tradicional (Montalbo-Lomboy *et al.* 2014). En base a este método, en este trabajo se consideraron como levaduras no oleaginosas todas aquellas cepas que exhibieron un valor de fluorescencia significativamente menor o igual a los valores obtenidos para las cepas de *S. cerevisiae* (especie reconocida como no oleaginoso). A su vez, aquellas cepas que mostraron una fluorescencia significativamente mayor o igual a la presentada por la cepa 41E, la cual acumuló un porcentaje de lípidos saponificables de 24.2%, se consideraron como potenciales oleaginosas. De los 58 aislamientos evaluados, 30 fueron caracterizados como potenciales levaduras oleaginosas. El hallazgo de este tipo de levaduras en la Antártida era previsible, ya que muchas especies oleaginosas ocupan hábitats oligotróficos relativamente secos, característica extendida en ambientes antárticos (Yarzabal 2016; Villarreal *et al.* 2018; Baeza *et al.* 2019). Esto podría explicarse por la mayor resistencia a la desecación que presentan los lípidos intracelulares frente a los carbohidratos como material de almacenamiento (Sitepu *et*

al. 2014). Es de destacar que, en este ensayo, todas las cepas de las especies *Candida glabrosa* y *Leucosporidella fragaria*, especies no reportadas previamente como oleaginosas, evidenciaron valores de fluorescencia significativamente mayores que los correspondientes a la cepa *C. sake* 41E. De confirmarse por gravimetría que estas cepas son capaces de acumular más del 20% de lípidos en su biomasa seca, podría considerarse que se trata de dos nuevas especies oleaginosas. A su vez, los resultados obtenidos evidencian que pueden existir diferencias significativas en la magnitud de lípidos acumulados por cepas de la misma especie.

Se seleccionaron seis cepas potencialmente oleaginosas (8E, 4E, 12D, 12R, 15E y 5E) por presentar valores de fluorescencia significativamente mayores al resto. Para estas cepas se determinó por gravimetría la concentración de lípidos saponificables producidos por volumen de cultivo y el porcentaje de acumulación en su biomasa. Los resultados obtenidos no se correspondieron exactamente con los valores obtenidos en el *screening* por fluorescencia. Las cepas que exhibieron mayor fluorescencia no fueron necesariamente las que produjeron mayor cantidades de lípidos saponificables por volumen de cultivo.

Por ejemplo, la cepa 4E que resultó la segunda cepa en nivel de fluorescencia, fue la cepa con la que se obtuvo menor concentración de lípidos por cultivo, de las seis seleccionadas. A su vez, la concentración de lípidos obtenida con la cepa 8E no evidenció diferencias significativas con la obtenida con la cepa 12D, a pesar de que en el análisis con rojo de Nilo la fluorescencia exhibida por la 8E fue significativamente mayor. Esta falta de correlación entre los dos métodos podría deberse a la existencia de componentes celulares que causarían la sobreestimación de la cantidad de lípidos saponificables en presencia de rojo de Nilo, y que no se expresarían de igual manera en todas las levaduras (Montalbo-Lomboy *et al.* 2014). En ese sentido, se ha descrito la interferencia de fosfolípidos y de proteínas solubles, debido a propiedades intrínsecas de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos (Lakowicz 2013; Montalbo-Lomboy *et al.* 2014). Sin embargo, a pesar de las discrepancias encontradas, se considera que el método desarrollado por Sitepu *et al.* (2014). Resulta de gran utilidad para realizar un *screening* inicial de levaduras oleaginosas. Los porcentajes de acumulación de lípidos intracelulares con respecto a la biomasa seca no se correspondieron exactamente con

la concentración de lípidos saponificables por volumen de cultivo, lo cual se debe a las diferentes velocidades de crecimiento de las distintas cepas en las mismas condiciones.

La temperatura de cultivo de las levaduras influyó sobre la composición en ácidos grasos de los lípidos intracelulares. En todos los casos, se constató un aumento significativo de la cantidad relativa de los ácidos grasos palmitoleico (16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3) cuando las cepas fueron incubadas a 4°C con una consecuente disminución de la cantidad relativa del ácido palmítico (16:0). Este resultado siguió el comportamiento descrito por Rossi *et al.* (2009) para levaduras psicrótrofas, quien reportó que la característica adaptativa de esas levaduras consiste en un aumento en la producción de ácidos grasos de 18 carbonos (en particular C18: 1, C18: 2 y C18: 3) cuando crecen a bajas temperaturas. Al igual que lo reportado por otros autores (Suutari *et al.* 1993; Rossi *et al.* 2009; Amaretti *et al.* 2010b), la disminución en la temperatura de incubación tuvo un impacto en la tasa de crecimiento y en la cantidad y perfil de ácidos grasos acumulados. Sin embargo, este parámetro no afectó el porcentaje de acumulación. Esto sugiere que la acumulación de lípidos no es una adaptación a la disminución en la temperatura, como si lo es el cambio en el perfil de ácidos grasos acumulados (Rossi *et al.* 2009).

Cabe destacar que para ambas temperaturas ensayadas los perfiles de ácidos grasos de todas las cepas seleccionadas presentaron un número de cetano mayor a 45, lo que concuerda con lo exigido por la norma UNIT 1100:2014. A su vez se observó un aumento en el índice de insaturación (DU) al disminuir la temperatura, lo cual era esperado ya que esta adaptación ha sido ampliamente estudiada (Suutari *et al.* 1993; Rossi *et al.* 2009; Amaretti *et al.* 2010a; Villarreal *et al.* 2018). En cuanto a los valores de punto enturbiamiento (CF) y punto de taponamiento de filtro en frío (CPFF), si bien cada país determina su valor de acuerdo con las condiciones climáticas que posea, valores bajos mejorarían el despeño a bajas temperaturas del biodiésel obtenido. El CP se define como la temperatura más baja en la cual se puede observar una suspensión turbia a causa de la formación de cristales en biodiésel (Sanford *et al.* 2009), y el CFPP corresponde a la temperatura más baja a la que un volumen dado de biodiésel puro (B100) todavía pasa a través de un filtro estandarizado en 60 segundos (Knothe 2005). Como puede observarse estos valores bajan en todos los aislamientos al disminuir la

temperatura de incubación, lo que convierte a estos lípidos en buenos candidatos para su uso a menores temperaturas. Esto demuestra que a partir de levaduras oleaginosas se podría obtener biodiésel de composición variada, adecuado para su uso en diferentes climas. Sin embargo, en todos los casos es imprescindible la correcta selección de la cepa y la optimización de las condiciones de cultivo.

Como resultado de este trabajo se seleccionó la cepa *Candida glabrata* 12D para continuar los estudios, ya que la misma logró un porcentaje de acumulación significativamente mayor al resto de las levaduras oleaginosas, siendo a su vez la cepa con la cual se obtuvo la mayor concentración de lípidos saponificables por volumen de cultivo. Esta especie fue descrita por primera vez por Komagata & Nakase (1965), quien la aisló a partir de calamar congelado en Japón, por lo cual no fue una sorpresa encontrarla en la Antártida. Posteriormente esta especie también fue encontrada en vino y en kéfir (González *et al.* 2007; Kivanç & Yapıcı 2015). La cepa seleccionada fue capaz de asimilar las tres fuentes de carbono ensayadas, sacarosa, lactosa y glicerol, lo cual le da mayor versatilidad para su producción a partir de subproductos industriales.

*Utilización de melaza de caña para la
producción de levaduras oleaginosas*

Capítulo II

II.1. Introducción al capítulo

En nuestro país, la melaza y la vinaza de caña de azúcar son subproductos agroindustriales generados por la industria sucro-alcoholera (Perugorría 2011; Valeiro *et al.* 2017). La melaza se utiliza de manera frecuente para la producción de bioetanol debido a la presencia de azúcares fermentables, siendo una buena fuente de carbono para el metabolismo de los microorganismos (Cazetta & Celligoi 2006). La vinaza es el subproducto de producción de bioetanol (Valeiro *et al.* 2017) y se ha utilizado principalmente en prácticas de fertirrigación (Christofolletti *et al.* 2013; Filoso *et al.* 2015; Rodrigues Reis & Hu 2017).

En el contexto del desarrollo de procesos de buen rendimiento y con bajos costos de producción, el objetivo de este capítulo fue la determinación de las condiciones de cultivo y la composición adecuada del medio para la producción de lípidos transformables en biodiésel a partir de la levadura oleaginosa *C. glabrosa* 12D (seleccionada en el capítulo anterior), utilizando los subproductos mencionados. En primer lugar, se optimizó la producción de lípidos en un medio mineral suplementado con extracto de levadura y melaza de caña como fuente de carbono. En segundo lugar, buscando reducir aún más los costos se estudió la posibilidad de realizar la producción en un medio a base de vinaza de caña, suplementado solamente con melaza de caña de azúcar como fuente de carbono.

II.2. Materiales y métodos

II.2.1. Melaza y vinaza de caña de azúcar:

La melaza utilizada en esta tesis fue un subproducto producido durante la zafra 2017 y la vinaza utilizada fue un subproducto producido durante las zafras 2017 y 2018. Ambos fueron obtenidos en el Complejo Agroenergético de la empresa Alcoholes del Uruguay -ALUR (Bella Unión, Artigas, Uruguay) Se conservaron a 4°C hasta su uso. A estos subproductos se les determinó la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa por cromatografía líquida (HPLC) como esta descrito en el punto II.2.10.1 y la concentración de nitrógeno de las muestras de melaza y vinaza por método colorimétrico como esta descrito en el punto II.2.10.2.

II.2.2. Determinación de la concentración de melaza que no inhiba el crecimiento de la cepa seleccionada:

Se evaluaron diferentes concentraciones de melaza de caña con la finalidad de conocer la concentración máxima que no inhibiera el crecimiento en las concentraciones ensayadas. Para ello, la cepa 12D se cultivó en caldo a base de extracto de levadura y nitrógeno (YNB) (Difco, Sparks, USA) (Anexo 1.2) y en presencia de diferentes concentraciones de melaza (50, 100, 150 y 200 g/L). Los cultivos se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca, como esta descrito en el punto II.2.10.3, al quinto día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado, determinando para cada uno el valor promedio y el intervalo de confianza (IC) correspondiente ($\alpha=0.05$), utilizando la herramienta de análisis de Excel 2010. Los resultados experimentales fueron comparados por un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD (*Least significant difference*) usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p<0.05$ fueron consideradas significativas.

II.2.3. Determinación del efecto de la melaza en la acumulación de lípidos:

Para este estudio se utilizó como medio de cultivo base el definido por Thakur *et al.* (1989), sustituyendo la glucosa por la melaza de caña de azúcar (concentración de 100 g/L) y conservando los restantes componentes del medio base (anexo 1.5). El cultivo de la cepa 12D se incubó a 25°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca y de lípidos saponificables (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos II.2.10.3 y II.2.10.4, respectivamente al quinto día de incubación. El cultivo se realizó por duplicado.

II.2.4. Determinación de componentes del medio que influyen en la producción de biomasa y acumulación de lípidos intracelulares:

Para estudiar la influencia de los diferentes componentes del medio en la producción de biomasa y en la acumulación intracelular de lípidos, se utilizó como medio de cultivo base el definido por Thakur *et al.* (1989), sustituyendo la glucosa por melaza de caña de azúcar. Se evaluó el efecto de la concentración de los restantes componentes del medio base: KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , extracto de levadura (EL), CaCl_2 y MgSO_4 sobre la producción de biomasa y lípidos intracelulares de la levadura seleccionada. Para poder determinar la influencia de estas variables se realizó un diseño estadístico factorial fraccionado de dos niveles en el programa DesignExpert10 (StatEase Inc.). En todos los casos, la concentración de melaza se mantuvo en 100 g/L, máxima concentración que no afectó el crecimiento de la cepa, determinada en el punto II.2.3. Cada variable se ensayó en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), de acuerdo a la Tabla II.1. Para las 5 variables a estudiar se realizó un diseño con 16 ensayos (tabla II.2), de resolución V con 3 puntos centrales.

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

Tabla II.1. Variables y sus niveles ensayados en el diseño factorial fraccionado

Factor	Niveles	
	-1	1
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	1.50
Extracto de levadura (g/L)	0	3.00
NH ₄ NO ₃ (g/L)	0	0.57
CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)	0	0.80
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0	0.80

Como respuesta en cada caso se determinó la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables (en gramos por litro de medio de cultivo) obtenidos a partir del cultivo según lo descrito en los puntos II.2.10.3 y II.2.10.4, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 25°C durante 5 días con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas.

II.2.5. **Sustitución de componentes del medio acumulación por vinaza de caña de azúcar:**

Se evaluó la sustitución de los componentes del medio de acumulación de lípidos descrito por Thakur (1989) (KH₂PO₄, EL, NH₄NO₃, CaCl₂ y MgSO₄) por vinaza de caña de azúcar, sobre la producción y acumulación de lípidos. Para esto, la cepa 12D se cultivó en el medio con 100 g/L de melaza de caña sustituyendo el resto de los componentes del medio por diferentes diluciones de vinaza (relación Vinaza:H₂O: 25:75; 50:50; 75:25 y 100:0). Los cultivos se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos II.2.10.3 y II.2.10.4, respectivamente, al octavo día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado. Los resultados experimentales fueron comparados por un

ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

II.2.6. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:

Se evaluó si la concentración de extracto de levadura tendría algún efecto sobre la acumulación de lípidos en la cepa *C. glabrosa* 12D. Para ello la cepa 12D se cultivó en el medio con 100 g/L de melaza de caña y vinaza sin diluir con diferentes concentraciones de extracto de levadura (0; 0.75; 1.5 y 2 g/L). Los cultivos se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 5.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca y de lípidos saponificables (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos II.2.10.3 y II.2.10.4, respectivamente, al octavo día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado. Los resultados experimentales fueron comparados por un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

II.2.7. Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza de caña de azúcar en batch:

El escalado de la producción se realizó mediante el cultivo de la cepa 12D en un fermentador de 3 L de capacidad, con 2 L de volumen de cultivo (Fermentador BLBIO-3GJ, Shanghai Bailun Bio-Technology.co, Ltd). El medio de cultivo empleado fue a base de vinaza de caña sin diluir con 100 g/L de melaza de caña de azúcar. Previo a la inoculación, 0.5 mL de antiespumante (Sigma- A6426) fue adicionado al medio. El fermentador se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo de la levadura 12D, obtenido en el mismo medio del fermentador, incubado durante 48 horas a 25°C y con agitación a 150 rpm. Para la preparación del pre-inóculo se inoculó con 20 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 25°C durante 48 horas. El cultivo en fermentador se monitoreó durante cinco días, y se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente. A cada

muestra se le determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa remanente (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos II.2.10.3, II.2.10.4 y II.2.10.1, respectivamente. Las condiciones de incubación del fermentador fueron las siguientes: 25°C; 250 rpm y 2 vvm de aire. Durante todo el proceso se controló la temperatura del cultivo con electrodo de platino (Pt100), y se registró continuamente el pH y la concentración de oxígeno disuelto (%OD) a través de los electrodos 405-DPAS-SC-K8S (Mettler, Toledo) y InPro 6800 (Mettler, Toledo), respectivamente. No se controló el oxígeno disuelto durante el proceso. Al final del cultivo se determinaron los coeficientes de rendimiento en lípidos y en biomasa basado en el consumo de sustrato ($Y_{(p/s)}$ y $Y_{(x/s)}$) (g/g) y la productividad máxima global del proceso (Q_p) (g/Lh).

II.2.8. Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza de caña, cultivo alimentado:

El cultivo se realizó en el fermentador descrito en el punto II.2.7, utilizando 2 L de volumen de cultivo. El medio de cultivo empleado fue a base de vinaza de caña sin diluir con 100g/L de melaza de caña de azúcar. El cultivo fue alimentado con melaza de caña cuando los azúcares fueron consumidos totalmente. Cada alimentación constó del agregado de melaza de caña concentrada de manera de alcanzar la concentración inicial del medio de cultivo. El fermentador se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo de la levadura 12D, obtenido en el mismo medio del fermentador, incubado durante 48 horas a 25°C y agitación a 150 rpm. Este pre-inóculo se preparó inoculando el matraz con 20 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el punto II.2.7. El cultivo en fermentador se monitoreó durante 14 días, y se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente. A cada muestra se les determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa remanente (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos II.2.10.3, II.2.10.4 y II.2.10.1, respectivamente. Durante todo el proceso se controló la temperatura, se registró el pH y la concentración de oxígeno disuelto, sin controlarse la concentración de este último parámetro. Al final del cultivo se determinaron los coeficientes de rendimiento en lípidos y en biomasa

basado en el consumo de sustrato ($Y_{(p/s)}$ y $Y_{(x/s)}$) (g/g) y la productividad máxima global del proceso (Q_p) (g/Lh). Este cultivo se realizó por duplicado.

II.2.9. Determinación de la calidad de la mezcla de FAMES obtenida:

A partir de la biomasa obtenida en el punto II.2.8 se determinó la concentración y perfil de metilésteres de ácidos grasos como se describe en el punto II.2.10.5. A partir del perfil obtenido, se estimaron algunas propiedades fisicoquímicas de la mezcla según el punto II.2.10.6. También se determinó el contenido de glicerol total y libre, y el contenido de mono, di y tri glicéridos en la mezcla según el punto II.2.10.7.

II.2.10. Métodos analíticos:

II.2.10.1. Determinación de la concentración de azúcares:

La concentración de sacarosa, glucosa y fructosa de las muestras se determinó por cromatografía líquida (HPLC) con detector de índice de refracción (RID-10A Shimadzu) equipado con una columna SUPELCOGEL C-610H, 30 cm x 7.8 mm. Las condiciones operativas utilizadas fueron, fase móvil 0.1% H_3PO_4 en agua miliq® con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 30°C.

II.2.10.2. Determinación de la concentración de nitrógeno como amino libre:

La concentración de nitrógeno bajo la forma de amino libre (FAN) de los subproductos se determinó por un método colorimétrico según Spedding *et al.* (2012). Se tomaron 2 mL de muestra y se le agregó 1 mL del reactivo coloreado de ninhidrina (anexo 2.2). La mezcla se calentó en baño de agua a ebullición durante 16 minutos. Posteriormente las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente, se les agregó 5 mL de solución diluyente (anexo 2.3) y se les midió la absorbancia a 575 nm.

II.2.10.3. Determinación del crecimiento celular:

El crecimiento celular fue monitoreado determinando el peso seco. Para ello se tomaron 2 mL de cultivo y se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 minutos. Los *pellets* obtenidos se lavaron con agua destilada, se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y se transfirieron a una placa de Petri previamente pesada. Luego de dejar

secar la biomasa en estufa a 70°C durante 24 h, se dejó enfriar en desecador, y se pesaron nuevamente. Esta determinación se hizo por duplicado para cada cultivo.

II.2.10.4. Determinación de la concentración de lípidos saponificables:

La determinación de la concentración de lípidos por saponificación directa se realizó gravimétricamente según Pereyra *et al.* (2014). Para la extracción de lípidos se centrifugó 40 mL de cultivo, seguido por un lavado con agua destilada. Al *pellet* obtenido se agregó 5 mL de KOH 30% (p/v) y 5 mL de etanol 95% (v/v). La mezcla se incubó a 70°C durante una noche. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y la materia insaponificable se extrajo mediante 2 lavados con 10 mL de hexano. El pH de la fase acuosa fue ajustado a 1 mediante el agregado HCl, antes de recuperar la fracción de ácidos grasos por medio de dos ciclos de agregado de 10 mL de hexano. Los lípidos saponificables recuperados de esta forma en la fase orgánica fueron pesados luego de la evaporación del solvente bajo presión reducida a 45°C.

II.2.10.5. Determinación de concentración y perfil de metilésteres de ácidos grasos:

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo descrito por Martinez-Silveira *et al.* (2019a), calentando a 70°C durante 3 horas la biomasa seca en presencia de metanol (relación metanol-biomasa=60) usando H₂SO₄ como catalizador en una concentración de 0.4 M. El análisis de FAMES se realizó por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) usando Agilent Technologies, Inc. 7820A GC equipado con una columna DB-225 Agilent Technologies, Inc. (20 m, 0.100 mm ID, 0.10 µm). Las condiciones de operaciones fueron: N₂ gas carrier 0.2 mL/min, la temperatura del puerto de inyección y del detector fue 250°C. Se aplicó el siguiente programa de temperatura: 40°C por 0.5 min, aumento de 25°C/min hasta 195°C, aumento de 3°C/min hasta 205°C, aumento de 8°C/min hasta 230°C, y se mantiene a 230°C durante 10 min. La identificación de los FAMES se realizó comparando los tiempos de retención con los obtenidos con un estándar (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich 1891) analizado en las mismas condiciones de cromatografía gaseosa. Se utilizó como estándar interno nonadecanoato de metilo (74208-1G Fluka Analytical Sigma-140 Aldrich 1891) en una concentración

de 1.5 mg/mL. El total de los FAMES se calculó como la suma de las áreas de cada pico individual y se relacionó con el área del estándar interno.

II.2.10.6. Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:

El perfil de FAMES obtenido en el punto II.2.9.5 fue utilizado para estimar algunas propiedades importantes del biodiésel obtenido. Algunas de las especificaciones requeridas por la norma UNIT 1100:2014 están directamente relacionadas con la composición química de los FAMES. Estas son: viscosidad (ν), densidad (ρ), número de cetano (CN), índice de yodo (IV), factor de saturación de cadena larga (LCSF), punto de taponamiento de filtro en frío (CFPP), punto de enturbiamiento (CP) y la estabilidad oxidativa (OS). Se estimaron estas propiedades fisicoquímicas de acuerdo a Caldeira *et al.* (2017) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \nu \text{ a } 40^{\circ}\text{C} \text{ (mm}^2/\text{s)} &= \exp (\sum x_i \times \ln(\nu_i)) \\ \ln(\nu_i) &= -12.503 + 2.496 \times \ln (MW_i) - 0.178 \times DB \\ \rho \text{ a } 20^{\circ}\text{C} \text{ (kg/m}^3\text{)} &= (\sum x_i \times \rho_i) \times 1000 \\ \rho_i &= 0.8463 + (4.9/MW_i) + 0.0118 \times DB \\ SN &= \sum (560 \times A_i/MW_i) \\ IV &= \sum (254 \times DB \times A_i) / MW_i \\ CN &= 46.3 + 5458/SN - 0.225 \times IV \\ LCSF (\%) &= (0.1 \times C16:0) + (0.5 \times C18:0) + (1 \times C20:0) + (1.5 \times C22:0) + (2 \times C24:0) \\ CFPP (^{\circ}\text{C}) &= (3.417 \times LCSF) - 16.477 \\ CP (^{\circ}\text{C}) &= (CFPP+2.9)/1.0191 \\ OS (h) &= 117.9295 / (A_i C18: 2 + A_i C 18: 3) + 2.5905 \end{aligned}$$

donde MW_i = masa molecular de cada ácido graso componente, DB = número de enlaces dobles, A_i = es el porcentaje de cada componente de ácido graso, x_i = fracción molar de cada ácido graso.

II.2.10.7. Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido:

La determinación de glicerol libre, mono-, di- y triglicéridos se realizó de acuerdo a lo establecido en la norma UNIT 1133:2007 en el Laboratorio de la Unidad de

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

Cereales y Oleaginosos de ALUR. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases de inyección automática con detector de ionización de llama (GC-FID), usando Shimadzu Corp. GC-2014 equipado con una columna MET-Biodiésel Supelco, Inc. (14 m, 0.53 mm con pre-columna ID, 0.16 μ m integrada de 2m 0.53 mm ID, 0.16 μ m). Las condiciones de operaciones fueron: He como gas *carrier* a una presión de 24.7 kPa, la temperatura del puerto de inyección fue de 80°C y la del detector fue 400°C. Se aplicó al horno el siguiente programa de temperatura: 80°C, aumento de 15°C/min hasta 180°C, aumento de 8°C/min hasta 270°C, aumento de 30°C/min hasta 380°C, y se mantiene a 380°C durante 6 min. Para el análisis se tomaron 100 mg de muestra y se le agregó 80 μ L de una solución *stock* de (S)-(-)-1,2,4-butanetriol (estándar interno para glicerol) a una concentración 4.106 mg/ μ L y 80 μ L de una solución *stock* de tricaprina (estándar interno para los glicéridos.) a una concentración 31.97 mg/ μ L. La muestra con los estándares internos fueron derivatizados a través de una silinización con 100 μ L MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 8 mL de n-heptano e inyectaron 2 μ L de la mezcla obtenida. Se expresaron los contenidos de monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), de triglicéridos (TG) y glicerol libre como porcentaje en peso (% (m/m)). Para el cálculo de estos porcentajes se utilizaron las siguientes ecuaciones descritas en la norma UNIT 1133:2009:

$$G = [a_g (A_{gi}/A_{ei1}) + b_g] \times (M_{ei1}/m) \times 100$$

$$MAG = [a_{mag} (\Sigma A_{mi}/A_{ei2}) + b_{mag}] \times (M_{ei2}/m) \times 100$$

$$DAG = [a_{dag} (\Sigma A_{di}/A_{ei2}) + b_{dag}] \times (M_{ei2}/m) \times 100$$

$$TAG = [a_{tag} (\Sigma A_{ti}/A_{ei2}) + b_{tag}] \times (M_{ei2}/m) \times 100$$

En donde G, MAG, DAG y TAG son los porcentajes en %m/m de glicerol libre, mono-, di- y triglicéridos presentes en la muestra, respectivamente. A_{gi} es el área del pico del glicerol y ΣA_{mi} , ΣA_{di} y ΣA_{ti} son las sumas de las áreas de los picos de los mono-, di- y triglicéridos. A_{ei} y A_{ei2} son las áreas de los estándares internos (S)-(-)-1,2,4-butanetriol y tricaprina, respectivamente. M_{ei} , M_{ei2} y m son las masas en miligramos de los estándares internos (S)-(-)-1,2,4-butanetriol y tricaprina, y la muestra, respectivamente. a_g y b_g son constantes del método de regresión para el glicerol. a_{mag}

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

y b_{mag} son constantes del método de regresión para la monooleína. a_{dag} y b_{dag} son constantes del método de regresión para la dioleína. a_{tag} y b_{tag} son constantes del método de regresión para la trioleína. El glicerol total fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$G_T (\% (m/m)) = G + 0.225 MAG + 0.146 DAG + 0.103 TAG$$

En donde GT es el porcentaje en % m/m de glicerol total (libre y acomplexado) presente en la muestra; G es el porcentaje en % m/m de glicerol libre presente en la muestra; MAG es el porcentaje en % m/m de monoglicéridos presente en la muestra; DAG es el porcentaje en % m/m de diglicéridos presentes en la muestra y TAG es el porcentaje en % m/m de triglicéridos presente en la muestra. El instrumento fue calibrado usando glicerol, monooleína, dioleína y trioleína en soluciones de n-heptano de acuerdo con la norma UNIT 1133:2007.

II.3. Resultados

II.3.1. Melaza y vinaza de caña de azúcar utilizadas:

La determinación de la concentración de azúcares se realizó por HPLC, siendo la composición de la melaza de caña utilizada: sacarosa (286 ± 10) g/L, glucosa (164 ± 13) g/L y fructosa (166 ± 14) g/L. Para el caso de la vinaza de caña, no se detectaron picos en los tiempos de retención esperados. Por lo tanto, la concentración de estos azúcares en este subproducto fue menor al límite de cuantificación del método (0.125 g/L). En el anexo 3.1 se encuentran las curvas de calibración utilizadas para realizar estas determinaciones.

La determinación del contenido de nitrógeno de los subproductos se determinó midiendo el contenido de amino libre por un método colorimétrico. La concentración de nitrógeno en la muestra de melaza de caña fue: (223.7 ± 0.3) mgN/L y para el caso de la vinaza de caña fue: (140.8 ± 0.1) mgN/L. En el anexo 3.2 se encuentra la curva de calibración utilizada.



Figura II.1: Aspecto de la melaza de caña obtenida en el Complejo Agroenergético de la empresa Alcoholes del Uruguay -ALUR (Bella Unión, Artigas, Uruguay).

II.3.2. Determinación de la concentración de melaza de caña que no inhiba el crecimiento de la levadura seleccionada:

Se determinó la concentración máxima de melaza de caña que no inhibiera el crecimiento de la cepa seleccionada para la producción. Para ello la cepa 12D se cultivó en medio YNB (anexo 1.2) con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar. En la figura II.2 se muestra la biomasa seca obtenida con las diferentes concentraciones

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

de melaza, luego del quinto 5 día de incubación. Como puede observarse las concentraciones de melaza 50 y 100 g/L fueron las que generaron una cantidad de biomasa seca significativamente mayor al resto de las concentraciones ensayadas; pero no existió diferencia significativa entre ellas, seleccionando la concentración de 100 g/L para continuar.

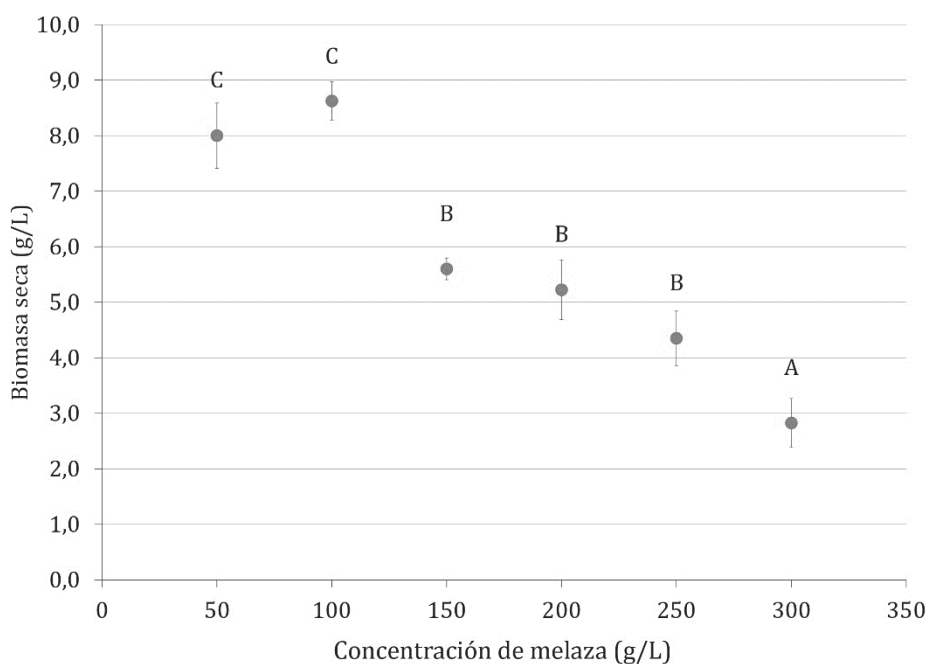


Figura II.2: Biomasa seca obtenida en medio YNB con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar a los 5 días de cultivo. Las barras corresponden al intervalo de confianza de 2 repeticiones con $\alpha=0.05$. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p<0.05$; las mismas están indicadas por diferentes letras.

II.3.3. Determinación del efecto de la melaza en la acumulación de lípidos:

La cepa seleccionada *C. glabrosa* 12D fue incubada en las condiciones descritas en el punto II.2.3 en el medio descrito por Thakur *et al.* (1989) sustituyendo glucosa por melaza de caña en una concentración de 100g/L. Luego del quinto día de incubación la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables (en g/L de cultivo) fueron (11.4 ± 0.7) y (3.2 ± 0.3) , respectivamente. Con estos valores se calculó el porcentaje de acumulación en estas condiciones y el mismo fue $(28 \pm 2) \%$. También se calculó la relación molar C/N del medio a partir de la concentración de azúcares y nitrógeno de la melaza, obtenidas en el punto II.3.1. La relación C/N obtenida fue 147.

II.3.4. Determinación de componentes del medio que influyen en la producción de biomasa y acumulación de lípidos intracelulares:

Tomando como base el medio Thakur *et al.* (1989) y la concentración de melaza seleccionada en el punto II.3.3 se realizó un diseño factorial fraccionado para determinar los componentes del medio que influyen en la producción de biomasa y acumulación de lípidos a partir de la cepa *C. glabrosa* 12D.

En la tabla II.2 se presenta el diseño realizado y la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables (en g/L de cultivo) obtenidos en cada caso a partir de la transesterificación directa de los lípidos acumulados por la cepa 12D cultivada en dichas condiciones. Para todos los factores se incluyó la concentración 0 g/L de forma de evaluar la necesidad de su presencia en el medio.

Con los resultados obtenidos se realizaron dos ANOVA, uno para determinar el efecto de las variables sobre la concentración de biomasa seca (tabla II.3) y otro sobre la concentración lípidos saponificables (tabla II.4). Para el caso de la biomasa seca, dentro de las variables ensayadas, se determinó que en el rango evaluado las concentraciones de EL, NH_4NO_3 y la interacción entre estas variables fueron las únicas con efecto significativo ($p < 0,0001$). Se observó una curvatura significativa, con un $p = 0,0001$, lo cual significa que en el centro del espacio del diseño el comportamiento de las respuestas no es lineal, por lo cual en este espacio las predicciones por parte del modelo ajustado no serían correctas. En el caso de la influencia de las diferentes variables sobre la concentración de lípidos saponificables, las variables que tuvieron un efecto significativo en el rango evaluado fueron la concentración de EL y la interacción entre la concentración de EL y NH_4NO_3 ($p < 0,0001$). Para esta respuesta la curvatura no resultó significativa ($p = 0.6526$).

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

Tabla II.2. Concentración de biomasa seca y lípidos saponificables obtenidos de la cepa 12D en los ensayos del diseño factorial fraccionado.

Matraz	Tipo	KH ₂ PO ₄ (g/L)	EL (g/L)	NH ₄ NO ₃ (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Lípidos saponificables (g/L)	Biomasa seca (g/L)
1	Fact	1.5	0.0	0.57	0.6	0.0	2.5	8.8
2	Fact	0.0	3.0	0.57	0.0	0.8	4.3	13.8
3	Fact	1.5	3.0	0.57	0.6	0.8	3.4	14.1
4	Fact	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	4.8	13.3
5	Central	0.75	1.5	0.28	0.3	0.4	2.9	10.7
6	Fact	1.5	3.0	0.0	0.0	0.8	5.5	13.1
7	Fact	1.5	3.0	0.0	0.6	0.0	4.7	12.8
8	Fact	0.0	3.0	0.57	0.6	0.0	4.0	13.7
9	Fact	0.0	0.0	0.57	0.6	0.8	2.3	8.6
10	Fact	1.5	3.0	0.57	0.0	0.0	3.2	13.9
11	Fact	0.0	0.0	0.57	0.0	0.0	2.9	9.0
12	Central	0.75	1.5	0.28	0.3	0.4	3.5	12.0
13	Fact	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.8	4.1
14	Fact	0.0	0.0	0.0	0.6	0	1.3	4.3
15	Fact	0.0	3.0	0.0	0.6	0.8	5.5	12.3
16	Fact	1.5	0.0	0.0	0.6	0.8	1.9	4.2
17	Central	0.75	1.5	0.28	0.3	0.4	3.1	11.5
18	Fact	1.5	0.0	0.57	0.0	0.8	2.7	7.4
19	Fact	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	3.8

Nota: Se señalan los puntos factoriales (Fact) y los puntos centrales (Central).

Tabla II.3: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de biomasa seca en el diseño factorial fraccionado

Fuente de variación	SC	gl	CM	F Valor	p-valor Prob> F	
Modelo	242.0	3	80.7	356.9	< 0.0001	significativo
B-EL	201.6	1	201.6	892.2	< 0.0001	
C-NH ₄ NO ₃	29.2	1	29.2	129.0	< 0.0001	
BC	11.2	1	11.2	49.6	< 0.0001	
Curvatura	6.2	1	6.2	27.4	0.0001	
Residuo	3.2	14	0.2			No significativo
Falta de ajuste	2.3	12	0.2	0.4	0.8	
Error	0.9	2	0.4			
Total	251.4	18				

Nota: SM: suma de cuadrados; CM: Cuadrado medio; gl: grados de libertad.

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

Tabla II.4: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de lípidos saponificables en el diseño factorial fraccionado

Fuente de variación	SC	gl	CM	F Valor	p-valor Prob> F	
Modelo	25.8	3	8.6	59.8	< 0.0001	significativo
B-EL	20.4	1	20.4	141.7	< 0.0001	
C-NH ₄ NO ₃	0.3	1	0.3	1.9	0.2	
BC	5.1	1	5.1	35.7	< 0.0001	
Curvatura	0.03	1	0.03	0.2	0.6	
Residuo	2.0	14	0.1			No significativo
Falta de ajuste	1.9	12	0.2	2.0	0.4	
Error	0.1	2	0.08			
Total	27.9	18				

Nota: SM: suma de cuadrados; CM: Cuadrado medio; gl: grados de libertad.

El modelo propuesto para la respuesta biomasa seca resultó significativo ($F = 356.9$; $p < 0.0001$) con un R^2 de 0.987, lo que significa que se podría explicar el 98.7% en la variabilidad en la respuesta. Se obtuvo un valor de R^2 ajustado de 0.984, que concuerda con el valor predicho de R^2 (0.975), lo cual indica una buena relación entre los datos experimentales y los predichos por el modelo para la concentración de biomasa seca. Para el caso de la concentración de los lípidos saponificables, el modelo también resultó significativo ($F = 59.8$; $p < 0.0001$) con un R^2 de 0.928, lo que significa que se podría explicar el 92.8% en la variabilidad en la respuesta. Se obtuvo un valor de R^2 ajustado de 0.912, que concuerda con el valor obtenido de R^2 predicho (0.869), lo cual indica una buena relación entre los datos experimentales y los predichos por el modelo para la concentración de lípidos saponificables. Como resultado se obtuvieron dos ecuaciones en función de las variables significativas en el rango estudiado (1 y 2). Se puede visualizar el efecto positivo (coeficiente positivo) de la concentración de EL y de NH₄NO₃ y el efecto negativo (coeficiente negativo) de la interacción entre la concentración entre EL y NH₄NO₃ sobre ambas variables de respuesta. Para el caso de la respuesta concentración de lípidos saponificables, la concentración de NH₄NO₃ no tiene un efecto significativo sobre esta respuesta.

$$(1) [\text{Biomasa seca}] \text{ (g/L)} = +4.1 + 2.9*(\text{EL}) + 7.7*(\text{NH}_4\text{NO}_3) - 2.0*(\text{EL} * \text{NH}_4\text{NO}_3)$$

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

$$(2) \text{ [lípidos saponificables] (g/L) } = +1.7 + 1.1*(EL) + 1.5 *(NH_4NO_3) - 1.3 *(EL * NH_4NO_3)$$

Posteriormente se realizó en el programa Design Expert 10.0 la optimización numérica de los factores incluidos en el diseño factorial fraccionado, con la finalidad de maximizar la concentración de biomasa seca y de lípidos saponificables.

Como resultado se obtuvo el siguiente el medio de cultivo:

- EL = 3.0 g/L
- $NH_4NO_3 = 0$ g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 0$. g/L
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O = 0$ g/L
- $KH_2PO_4 = 0$ g/L.

Para las variables no significativas se seleccionó la mínima concentración posible dentro del rango ensayado. La relación molar C/N del medio optimizado fue 167, y se calculó a partir de la concentración de nitrógeno proveniente del extracto de levadura y de la concentración de azúcares y nitrógeno de la melaza, obtenidas en el punto II.3.1. El modelo obtenido en el diseño factorial fraccionado, predice con un 95% de probabilidad que en dicho medio de cultivo la concentración de biomasa seca estará entre 11.7 - 14.02 g/L y la concentración de lípidos saponificables entre 4.2 - 6.0 g/L. El resultado de esta condición corresponde a uno de los tratamientos del diseño factorial, por lo que el resultado predicho podría ser comparado con el valor experimental obtenido (13.3 g/L de biomasa seca y 4.8 g/L de lípidos saponificables) demostrando que el resultado experimental está dentro del rango esperado. Al comparar las medias con el resultado experimental, en el caso de la biomasa seca hay una desviación del 3.6% del valor teórico y para el caso de los lípidos saponificables esta desviación es de 6.2%. Estos resultados validan los modelos propuestos para explicar la concentración de biomasa seca y de lípidos saponificables en el rango estudiado.

II.3.5. Cambio de medio base de acumulación por vinaza de caña de azúcar:

Debido a que el extracto de levadura fue el único componente que debería agregarse al medio, se buscó una fuente alternativa de nitrógeno, por lo cual se optó por el cambio del medio base por vinaza de caña. En primer lugar, la cepa 12D se cultivó en presencia de diferentes diluciones de vinaza y con 100 g/L de melaza de caña. Luego de 8 días de incubación se determinó la concentración de biomasa seca y lípidos producidos en las diferentes condiciones. Los resultados se muestran en la figura II.3.

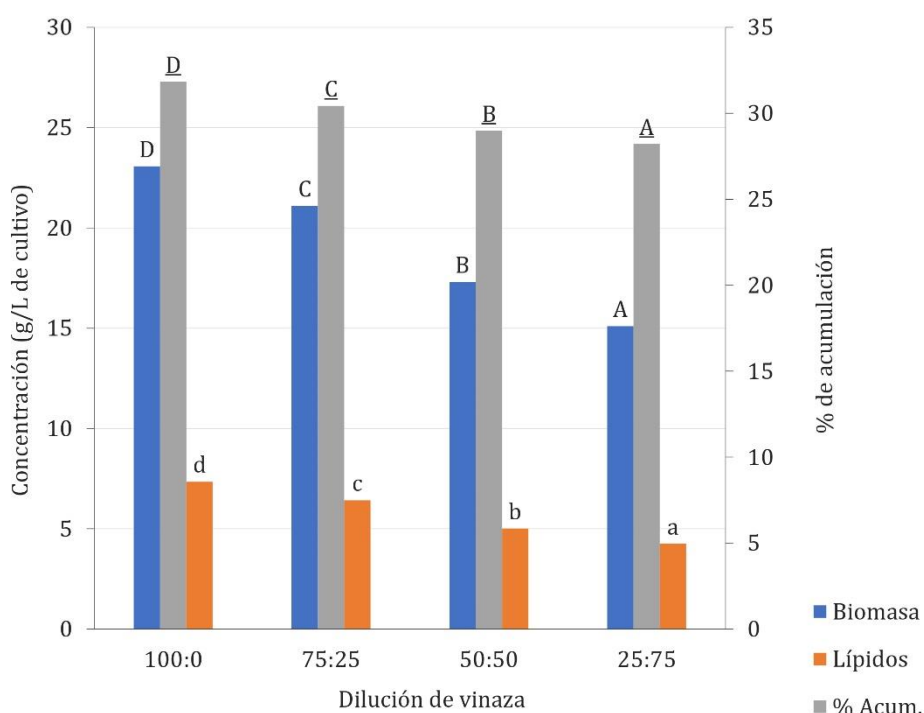


Figura II.3 Biomasa seca, lípidos saponificables en g/L de cultivo y porcentaje de acumulación de la cepa 12D en medio con melaza 100g/L con diferentes diluciones de vinaza, al octavo día de cultivo. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras

Cuando el medio base se sustituyó por vinaza sin diluir se obtuvo una concentración de biomasa seca y lípidos saponificables significativamente mayor al resto de las diluciones. Por ello se seleccionó la vinaza sin diluir como sustituto al resto de los componentes del medio descrito por Thakur *et al* (1989). La relación molar C/N del medio fue 181 y se calculó a partir de las concentraciones de azúcares y nitrógeno de los subproductos obtenidas en el punto II.3.1.

II.3.6. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:

Teniendo la concentración máxima de melaza de caña que no inhibe el crecimiento y con la dilución de vinaza que produce la mayor concentración de biomasa seca y lípidos saponificables, se evaluó si el agregado de extracto de levadura tenía algún efecto en la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables. Para ello al medio a base de vinaza sin diluir con 100 g/L de melaza de caña, se le agregaron diferentes concentraciones de extracto de levadura, y luego de 8 días de cultivo se determinó la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables; así como el porcentaje de acumulación en cada caso. Estos resultados se presentan en la figura II.4.

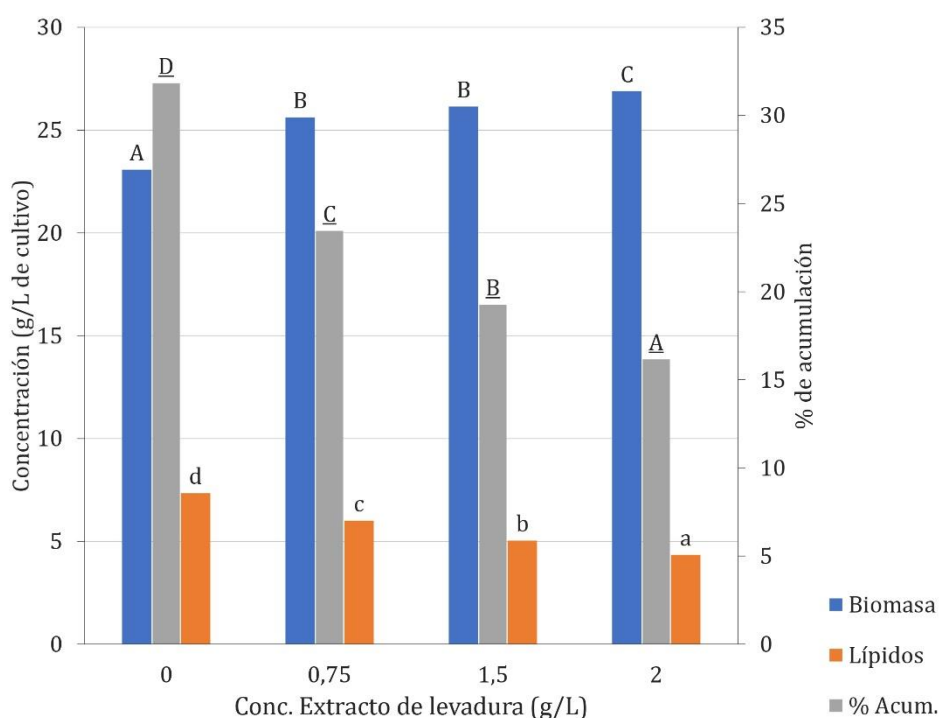


Figura II.4: Biomasa seca, lípidos saponificables en g/L de cultivo y porcentaje de acumulación de la cepa 12D en medio con 100 g/L de melaza con vinaza sin diluir con diferentes concentraciones de extracto de levadura, al octavo día de cultivo. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

El resultado obtenido muestra que a la concentración de 2.0 g/L de extracto de levadura se logró una concentración de biomasa seca significativamente mayor el

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

resto, pero la cantidad de lípidos saponificables obtenidos fue significativamente menor que el resto de las concentraciones ensayados. Si bien la concentración de biomasa seca obtenida con 0 g/L fue significativamente menor que para el resto, sin el agregado de extracto de levadura se logró una concentración de lípidos saponificables y un porcentaje de acumulación significativamente mayor que en el resto de las condiciones ensayadas. Con estos resultados se decidió no agregar extracto de levadura al medio, y se pasó a la etapa de producción en fermentador.

En la tabla II.5 se presenta los resultados resumidos de los medios utilizados hasta el momento.

Tabla II.5: Resumen de los resultados del cultivo de la cepa 12D en los diferentes medios utilizados.

Medio	Fuente de Carbono (g/L)	Biomasa seca (g/L)	Lípidos saponificables (g/L)	% acumulación	C/N
Thakur ⁺	Glucosa [*]	(12.1 ± 0.5)	(6.1 ± 0.4)	(51 ± 1)	105
Thakur con melaza ⁺⁺	Melaza ^{**}	(11.4 ± 0.7)	(3.2 ± 0.3)	(28 ± 2)	147
Thakur optimizado ^{\$}	Melaza ^{**}	13.3	4.8	36.0	167
Melaza y vinaza s.d.	Melaza ^{**}	(23.1 ± 0.2)	(7.34 ± 0.08)	(32 ± 1)	181
Melaza y vinaza s.d.+ 0.75 EL	Melaza ^{**}	(25.6 ± 0.5)	(6.01 ± 0.03)	(23 ± 1)	146
Melaza y vinaza s.d.+ 1.5 EL	Melaza ^{**}	(26.1 ± 0.3)	(5.0 ± 0.3)	(19 ± 1)	123
Melaza y vinaza s.d.+ 2.0 EL	Melaza ^{**}	(26.9 ± 0.1)	(4.3 ± 0.1)	(16 ± 1)	111

Nota: Thakur⁺: Medio definido por Thakur *et al* (1989). Thakur con melaza⁺⁺: Medio definido por Thakur *et al* (1989) con melaza en lugar de glucosa. Thakur optimizado^{\$}: medio optimizado en el punto II.3.5. Glucosa ^{*}: concentración 40 g/L. Melaza^{**}: concentración 100 g/L equivalente a 55 g/L de azúcares totales en equivalentes de glucosa. s.d.: sin diluir. EL: extracto de levadura. Los datos experimentales están expresados con su valor promedio y el intervalo de confianza correspondiente ($\alpha=0.05$)

II.3.7. Escalado en fermentador con medio a base de vinaza y melaza en batch:

Se escaló el cultivo de la cepa 12D en el medio seleccionado a 250 rpm y 2 vvm sin realizar control de la concentración de oxígeno, ni de pH. El cultivo se monitoreó durante 5 días, analizando la concentración de biomasa seca, concentración de lípidos saponificables, el consumo de sacarosa, glucosa y fructosa y el oxígeno disuelto a lo

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

largo del tiempo. Los resultados de este experimento se muestran en la figura II.5. En el quinto día de cultivo se logró la mayor concentración de lípidos saponificables y biomasa seca 9.6 y 25.0 g/L de cultivo, respectivamente. Los rendimientos en biomasa y en lípidos al quinto día de cultivo fueron 0.52 g biomasa/g azúcar consumido y 0.20 g lípidos/g azúcar consumido, respectivamente, siendo la productividad volumétrica 0.084 g/Lh. Como se observa en la figura II.6 los rendimientos máximos en biomasa y lípidos se alcanzan al tercer día de cultivo, siendo este día donde se alcanza la productividad volumétrica máxima (0.10 g/Lh).

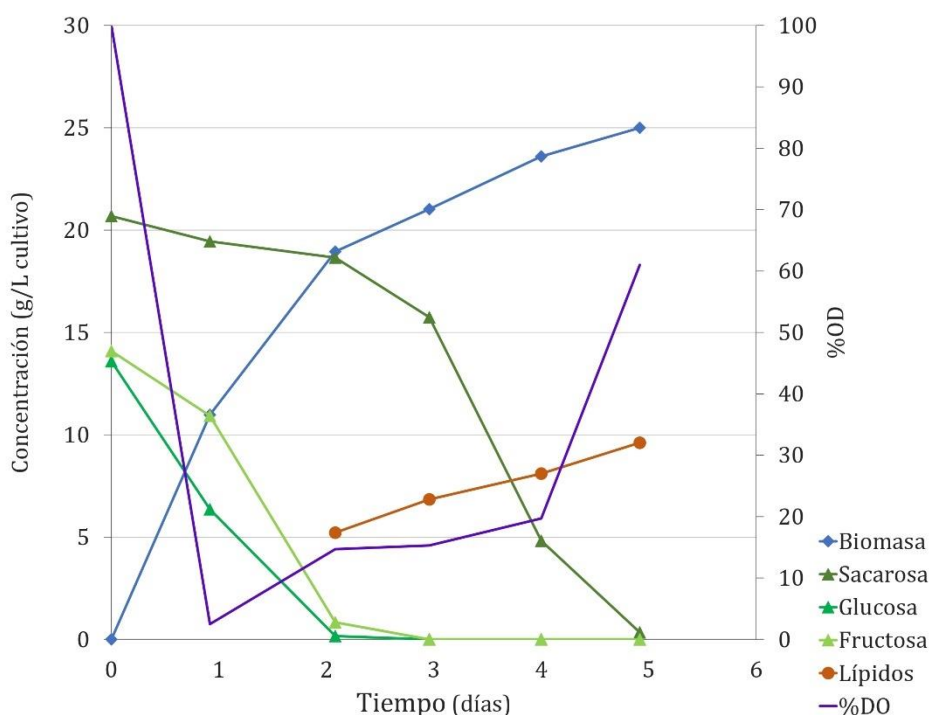


Figura II.5: Cultivo en batch en fermentador con 100g/L melaza de caña equivalente a 55 g/L de azúcares totales en equivalentes de glucosa y vinaza sin diluir como base. Están representados los parámetros medidos: oxígeno disuelto (OD%) (eje vertical primario) medido de manera continua, sacarosa residual (g/L), glucosa residual (g/L), fructosa residual (g/L) biomasa seca (g/L de cultivo) y lípidos saponificables (g/L de cultivo) (eje vertical secundario), medido en intervalos periódicos.

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

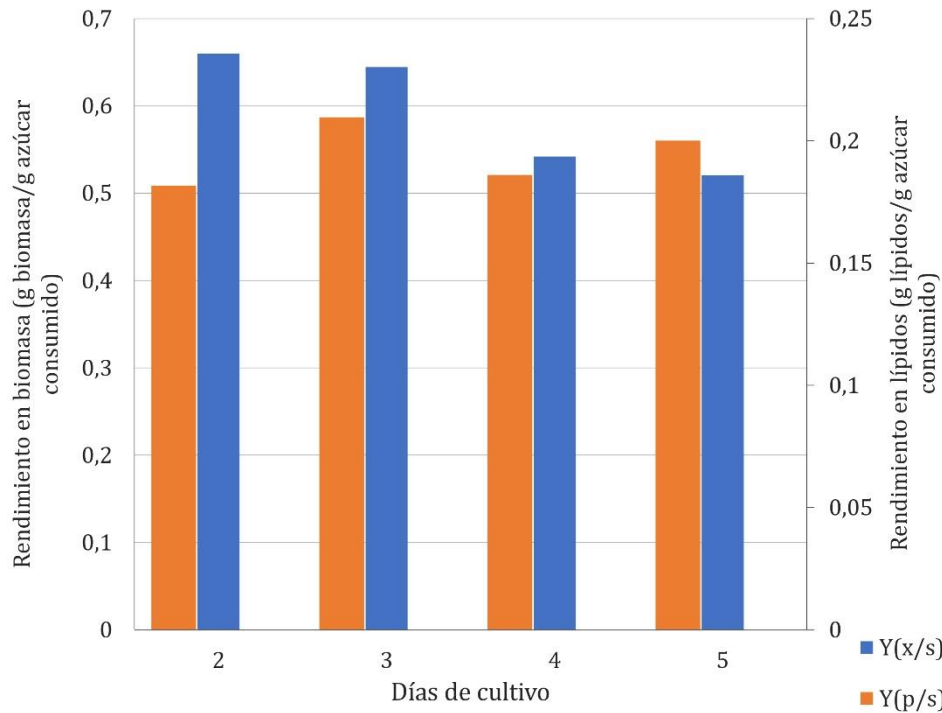


Figura II.6: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables. Rendimiento en biomasa por gramo de azúcar consumido ($Y_{(x/s)}$) (eje vertical primario) y rendimiento en lípidos saponificables por gramo de azúcar consumido ($Y_{(p/s)}$) (eje vertical secundario).

II.3.8. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo alimentado:

En las condiciones descritas en el punto II.2.8 se realizó cultivo en modalidad alimentado, el cual se monitoreó durante 14 días, analizando la concentración de biomasa seca, concentración de lípidos saponificables, el consumo de sacarosa, glucosa y fructosa y el oxígeno disuelto a lo largo del tiempo. Se realizaron de 2 alimentaciones (quinto y décimo día de cultivo) con melaza de caña hasta alcanzar la concentración de 100 g/L. La primera alimentación se realizó cuando la concentración tanto de sacarosa, glucosa y fructosa residual fue indetectable y la segunda cuando únicamente quedaban 3.7 g/L de sacarosa residual. En estas condiciones, al cabo de 14 días de cultivo, se logró un consumo de sacarosa de 67.2 g, un consumo de glucosa de 41.9 g y un consumo de fructosa de 24.3 g, logrando un consumo total de azúcar de 133.1 g. Los resultados de este experimento se muestran en la figura II.7. Al noveno día de cultivo se alcanzó el rendimiento máximo en lípidos (0.19 g/g). Ese día la concentración de lípidos saponificables y biomasa seca fue 18.4 y 37.9 g/L de cultivo, respectivamente. Los

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

rendimientos en biomasa ($Y_{(x/s)}$) y en lípidos ($Y_{(p/s)}$) a partir del primer día de cultivo pueden observarse en la figura II.8. La productividad volumétrica alcanzada ese día de cultivo fue de 0.087g/Lh. La productividad volumétrica máxima se alcanzó el sexto día de cultivo y fue 0.094 g/Lh. El cultivo no se continuó debido a que la biomasa obtenida era demasiada y quedaba adherida sobre las paredes del fermentador, que impedían una toma de muestra representativa.

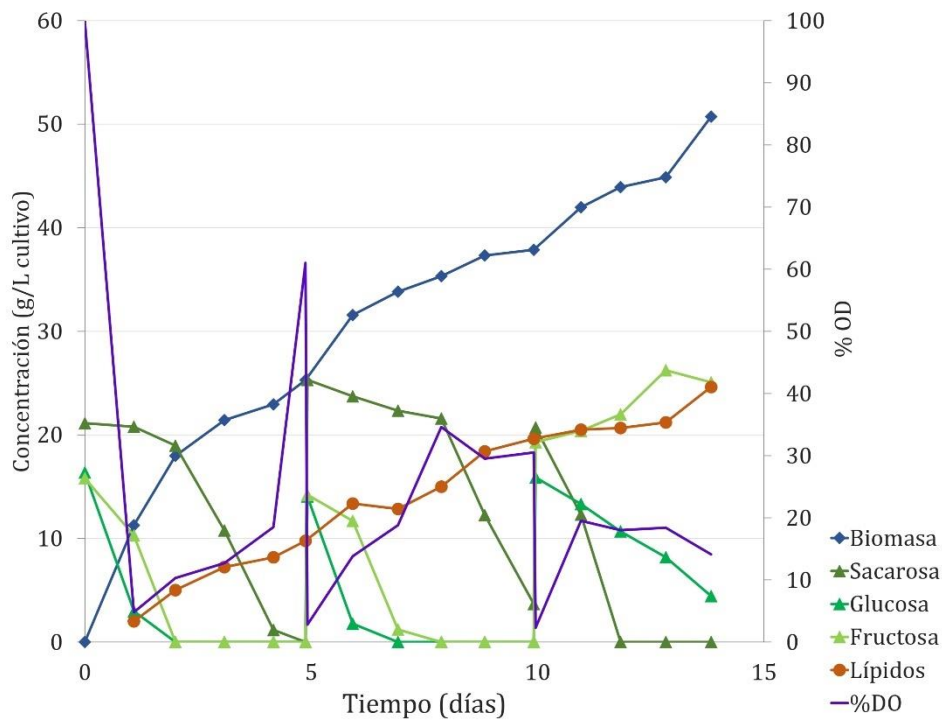


Figura II.7: Cultivo en alimentado en fermentador con 100 g/L melaza de caña y vinaza sin diluir como base. Están representados los parámetros medidos: oxígeno disuelto (OD%) (eje vertical primario) medido de manera continua, sacarosa residual (g/L), glucosa residual (g/L), fructosa residual (g/L) biomasa seca (g/L de cultivo) y lípidos saponificables (g/L de cultivo) (eje vertical secundario), medido en intervalos periódicos.

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

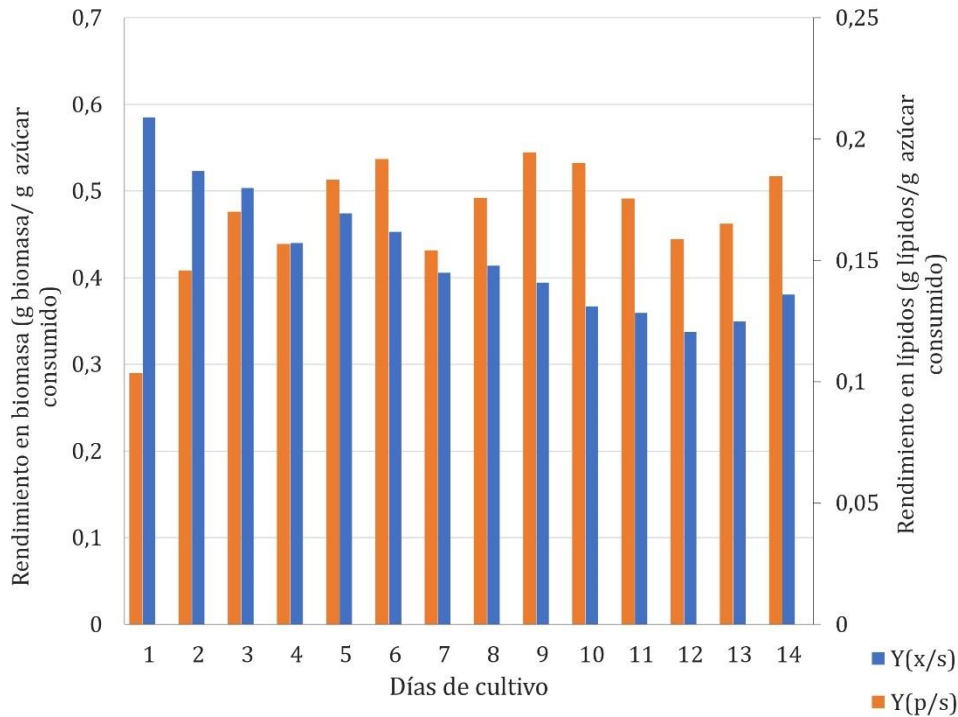


Figura II.8: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables. Rendimiento en biomasa por gramo de azúcar consumido ($Y_{(x/s)}$) (eje vertical primario) y rendimiento en lípidos saponificables por gramo de azúcar consumido ($Y_{(p/s)}$) (eje vertical secundario).

II.3.9. Determinación del perfil de metilésteres de los lípidos acumulados:

En la tabla II.6 se presentan el perfil de FAMES del biodiésel obtenido a partir de la biomasa de la cepa *C. glabrosa* 12D producida en el cultivo del fermentador alimentado del punto II.3.9, utilizando el medio con vinaza sin diluir como base y 100 g/L de melaza como fuente de carbono.

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

Tabla II.6: Porcentaje e identificación de los ésteres metílicos obtenidos a partir de la biomasa del cultivo de la cepa 12D en fermentador alimentado.

Identificación	%
14:0	(0.25 ± 0.01)
16:0	(14 ± 2)
16:1	(6.1 ± 0.7)
18:0	(7.4 ± 0.7)
18:1	(61 ± 1)
18:2	(7.2 ± 0.3)
18:3	(0.65 ± 0.04)
20:0	(0.56 ± 0.02)
24:0	(0.19 ± 0.04)

Nota: Los datos experimentales de cada éster metílico identificado su valor promedio y el intervalo de confianza correspondiente ($\alpha=0.05$)

II.3.10. Estimación de otras propiedades de la mezcla de metilésteres obtenida a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:

Se estimaron algunas propiedades fisicoquímicas de la mezcla usando el perfil de FAMES obtenido en el punto II.3.8, utilizando las ecuaciones formuladas por Caldeira *et al.* (2017) (II.2.13). Estos resultados se muestran en la tabla II.7. La mezcla de metilésteres obtenida cumple con estos requerimientos exigidos por la Norma UNIT 1100:2014.

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

Tabla II.7: Propiedades fisicoquímicas del biodiésel obtenido a partir de la biomasa de la cepa 12D en cultivo alimentado en fermentado.

Propiedad	Valor estimado	Norma UNIT 1100:2014
ν a 40°C (mm ₂ /s)	3.86	3.50-6.00
ρ a 20°C (kg/m ³)	856	850-900
% C 18:3	0.65	<12
IV	76	<120*
CN	57	>45
CFPP (°C)	2.6	
CP (°C)	2.3	
OS (h)	17.6	>8

Nota: Siendo ν : viscosidad; ρ : densidad; IV: índice de iodo; CN: número de cetano; CFPP: punto de taponamiento de filtro en frío; CP: punto de enturbiamiento y OS: estabilidad oxidativa. <120*: límite establecido EN 14214:2004.

II.3.11. Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos de la mezcla de metilésteres obtenida:

La Norma UNIT 1100:2014, establece límites en el contenido de glicerol libre, de glicerol total, de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos en el biodiésel. Los resultados obtenidos para mezcla de metilésteres obtenida a partir del cultivo alimentado de la cepa 12D que se muestran en la tabla II.8 cumplen con los requisitos de la Norma 1100:2014 salvo para el contenido de glicerol libre.

Tabla II.8: Contenido de glicerol libre, glicerol total y mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido a partir de la cepa 12D cultivada en cultivo alimentado en fermentador.

	Contenido en % (m/m)	Norma UNIT 1100:2014
Contenido de glicerol libre	(0.03 ± 0.01)	<0.020 %
Contenido de glicerol total	(0.15 ± 0.02)	<0.25 %
Contenido de monoglicéridos	(0.48 ± 0.06)	<0.70 %
Contenido de diglicéridos	(0.022 ± 0.001)	<0.20%
Contenido de triglicéridos	(0.030 ± 0.001)	<0.20 %

II.4. Discusión del capítulo

En general, a partir de procesos industriales se obtienen subproductos de menor valor, que coyunturalmente pueden convertirse en materiales de desecho dependiendo de la oferta y la demanda. Algunos subproductos o incluso residuos industriales, aún contienen sustancias que son económicamente valiosas, como azúcares complejos y simples, nitrógeno y sales inorgánicas (Gajdoš *et al.* 2015), convirtiéndose en esos casos en potenciales insumos para procesos biotecnológicos o requiriendo un tratamiento previo en caso de ser desechados. En nuestro país, la melaza de caña y la vinaza son claros ejemplos de este tipo de subproductos industriales. La melaza se obtiene durante la producción de azúcar, mediante la evaporación del agua del jugo clarificado de la caña, donde se da la separación de cristales de sacarosa. Se trata de un producto rico en carbohidratos (45-55% de azúcar fermentable; principalmente sacarosa), utilizado mundialmente para la producción de bioetanol (Ortiz *et al.* 2012; Arshad *et al.* 2014; He *et al.* 2014; Xia *et al.* 2014; Ganatsios *et al.* 2017). A su vez, la melaza de caña sola o en mezcla con otros sustratos ha sido utilizado en diversos bioprocesos incluida la producción de SCO (Andersen *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2016; Vieira *et al.* 2016). La melaza de caña es un subproducto con múltiples componentes, y su composición varía de un ingenio industrial a otro dependiendo de los procesos de producción y de la materia prima utilizada (Qi *et al.* 2018). Este subproducto tiene alto contenido en sales que pueden inhibir el crecimiento del microorganismo. La melaza utilizada en esta tesis tenía un contenido de sacarosa de $(29 \pm 1) \%$, $(16 \pm 1) \%$ de glucosa y $(17 \pm 1) \%$ de fructosa (II.3.1), lo cual la convierte en una excelente fuente de carbono para microorganismos que puedan asimilar dichos azúcares.

La vinaza es un subproducto de la producción de bioetanol. En Uruguay se obtienen entre 7 a 10 litros por litro de combustible, llegando a una producción anual de 250 millones de litros de vinaza según informe de ALUR (2014) (http://www.miem.gub.uy/documents/10192/6384758/biour_2014_-_alur.pdf). En el mismo informe se establece que la vinaza contiene ácidos grasos volátiles (3.9 g/L), 0.4 g /L de nitrógeno total determinado por Kjeldahl, 40 mg/L de fosfato soluble, 3.8 g/L de potasio, 1.5 g/L de calcio y 1.5 g/L de sulfato. De acuerdo con Robertiello *et al.* (1982), la vinaza de caña también puede contener magnesio, hierro, sodio, cloruro,

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

además de aminoácidos. La composición cualitativa parece adecuada para promover el crecimiento de levaduras si se adiciona una adecuada fuente de carbono y energía. En la actualidad, la vinaza de caña obtenida en Bella Unión como subproducto de la producción de etanol se dispone en piletas y se utiliza en fertirriego.

En este trabajo se evaluó el crecimiento y la capacidad de acumulación de SCO de la levadura oleaginosa *C. glabrosa* 12D utilizando estos subproductos industriales como componentes del medio de cultivo.

En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración de melaza de caña en el crecimiento de la cepa seleccionada. Se determinó que no había un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura, en concentraciones de melaza menores o iguales a 100 g/L, por lo que se seleccionó esta concentración para continuar trabajando. La inhibición del crecimiento causada por el aumento de la concentración de melaza por encima del valor seleccionado, pudo deberse a una elevada osmolaridad y salinidad (Oliva-Neto *et al.* 2013; Scoma *et al.* 2017). En segundo lugar, se evaluó el efecto de la melaza en la acumulación de lípidos. Para ello se utilizó melaza (100 g/L) en sustitución de glucosa en el medio definido por Thakur *et al.* (1989), siendo la relación C/N de este medio 147. La biomasa producida luego de 5 días de cultivo fue (11.4 ± 0.7) g/L y los lípidos saponificables (3.2 ± 0.3) g/L.

Buscando optimizar la producción se realizó un diseño factorial fraccionado tomando como base el medio definido por Thakur *et al.* (1989), manteniendo constante la concentración de melaza y variando la concentración de los demás componentes del medio. A partir del modelo generado se determinó que el medio óptimo, dentro del rango de condiciones ensayadas, sería más sencillo que el de partida, compuesto solamente por melaza de caña (100 g/L) y extracto de levadura (3.0 g/L) con una relación C/N de 167. En dicho medio se obtuvieron experimentalmente 13.3 g/L de biomasa seca y 4.8 g/L de lípidos saponificables, concentraciones mayores que las obtenidas en el medio completo. Al optimizarse el medio, la relación molar C/N aumentó de 147 a 167, lográndose a su vez un aumento en la acumulación de lípidos de 8 %. Este aumento en el porcentaje de acumulación al aumentar la relación C/N ya ha sido descrito previamente por varios autores (Sitepu *et al.* 2014; Shen *et al.* 2015; Calvey *et al.* 2016). Sin embargo, debe considerarse que un aumento desmedido de la

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

relación C/N puede tener efectos negativos (Sitepu *et al.* 2014). Por ejemplo, Shen *et al.* (2015) lograron un aumento en el porcentaje de acumulación de lípidos en *Trichosporum fermentans* al incrementarse la relación C/N del medio hasta un valor de 163. Por encima de ese valor, los porcentajes de acumulación lipídica eran menores.

Comparando el porcentaje de acumulación de lípidos obtenidos en el medio Thakur completo con melaza (C/N=147) con los obtenidos en el mismo medio con glucosa (C/N=105) (cap. I) se aprecia una disminución del 22% en el medio con mayor relación C/N, sin que la producción de biomasa se vea significativamente afectada. En este caso, además de la relación C/N es importante considerar la diferencia en el tipo y concentración de la fuente de carbono y la presencia de otros compuestos en el medio aportados por la melaza. Se ha demostrado que el tipo y concentración de fuentes de carbono influyen en la óptima relación C/N para la acumulación de lípidos a partir de una cepa, por lo cual, esta relación podría ser diferente en presencia de glucosa o melaza. Según Sitepu *et al.* (2014), la óptima relación molar C/N para la acumulación de lípidos en *Yarrowia lipolytica* cambió de 35 en presencia de glucosa como fuente de carbono a 180 cuando se utilizó una mezcla de glucosa y glicerol.

La concentración de otros nutrientes también puede tener influencia en la acumulación de lípidos en levaduras oleaginosas. En trabajos recientes (Patel *et al.* 2017) se demostró que limitando la cantidad de fosfato en el medio, el metabolismo lipídico en levaduras oleaginosas se altera, ocurriendo el desvío de la producción de fosfolípidos hacia la acumulación de triglicéridos. Por ello, un aumento de la relación carbono-fósforo favorecería la acumulación de lípidos transformables en biodiésel. A su vez, la concentración de otros nutrientes tales como magnesio, calcio, cobre y hierro también puede afectar los porcentajes de acumulación (Li *et al.* 2006). En ese contexto se debe considerar que las melazas de caña no son solamente fuente de carbohidratos. Según Amorim *et al.* (2009) y de Oliveira Lino *et al.* (2018) la melaza de caña también contiene nitrógeno (0.08-0.3 g/L), fósforo (0.02-0.1 g/L), calcio(0.1-0.5 g/L), magnesio(0.1-0.5 g/L), potasio(0.7-1.5 g/L), otros minerales trazas e incluso vitaminas. La presencia de los mismos puede haber sido la causa por la cual, en el caso de la cepa *C. glabrosa* 12D, el agregado de sales de calcio, magnesio o fosfato al medio de cultivo con melaza no

haya resultado significativo para el crecimiento de la levadura ni para la acumulación de lípidos saponificables.

Con la sustitución de los componentes del medio definido por Thakur *et al.* (1989) por vinaza de caña, se logró aumentar al doble la concentración lípidos saponificables obtenidos en el cultivo de la cepa *C. glabrosa* 12D. A su vez, esta concentración también fue mayor que la obtenida en el medio optimizado conteniendo extracto de levadura. Los beneficios del agregado de extracto de levadura dependen de la cepa y de las condiciones de cultivo. El extracto de levadura contiene una mezcla de péptidos, aminoácidos, carbohidratos y vitaminas (en especial del complejo B) y elementos utilizados como macro y micronutrientes en el crecimiento celular. Según Sha (2013), el EL es una de las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas en la producción de lípidos intracelulares en levaduras. Su uso para favorecer la producción de biomasa y la acumulación de lípidos ha sido confirmado por Kumar *et al.* (2010) para *Rhodotorula glutinis* y *Lipomyces starkeyi*. En algunos casos, se han requerido concentraciones de hasta 8 g/L para lograr la máxima acumulación de lípidos intracelulares (Zhao *et al.* 2008). Sin embargo, en nuestro caso el agregado de extracto de levadura al medio en base vinaza y melaza no tuvo un efecto positivo en la acumulación. El porcentaje de acumulación y la cantidad de lípidos obtenidos sin el agregado de este suplemento fue significativamente mayor en todos los casos. El hecho de no necesitar extracto de levadura reduce en gran medida los costos del medio de cultivo, haciendo más rentable el proceso. El uso de un medio de cultivo compuesto por subproductos industriales reduce los costos del proceso y a su vez, permite la recuperación de parte del contenido energético o nutricional de los mismos para la producción de un producto de mayor valor agregado (Nair & Taherzadeh 2016) en consonancia con el concepto de economía circular (<http://biovalor.gub.uy/economia-circular/>).

Con este medio definido en base a subproductos se escaló el cultivo de la cepa 12D en fermentador, obteniéndose un aumento en el porcentaje de acumulación (38.4%) con respecto a lo obtenido en matraz (31.8%). Este aumento al escalar de matraz a fermentador, ya ha sido reportado previamente. Por ejemplo, Guerreiro *et al.* (2019) lograron un aumento en el porcentaje de lípidos acumulados de 22% a 47% en una cepa de *Rhodospiridium toruloides* al escalar el cultivo. Estos autores postulan que un

Capítulo II: Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas

mayor aporte de oxígeno al medio favorecería la producción de biomasa y la acumulación de lípidos intracelulares en microorganismos aeróbicos. Sin embargo, si bien el crecimiento celular de las cepas aerobias aumenta al aumentar la concentración de oxígeno disuelto, los efectos sobre la acumulación de lípidos varían ampliamente, por lo que deben determinarse empíricamente en cada caso (Sitepu *et al.* 2014; Calvey *et al.* 2016; Chopra & Sen 2018). Por ejemplo, Kavšček *et al.* (2015) obtuvieron mayores niveles de acumulación en *Yarrowia lipolytica* limitando el aporte de oxígeno al medio disminuyendo la aireación.

Luego del escalado en *batch*, se realizó un cultivo en *batch* alimentado de la cepa *C. glabrosa* 12D en un fermentador. El cultivo alimentado es una solución para evitar la inhibición de la alta concentración de fuente de carbono (Chen *et al.* 2017). En ese sentido se ha reportado que este tipo de cultivo mejora la producción de biomasa celular y la producción de lípidos, por encima de los cultivos en *batch* (Juanssilfero *et al.* 2018). A su vez se ha observado que el cultivo alimentado puede mejorar el porcentaje de acumulación. Por ejemplo, para *Lipomyces starkeyi* se logró una mejora de un 4% en la acumulación al pasar de un cultivo en *batch* a un cultivo alimentado (Wild *et al.* 2010). Para el caso de la cepa 12D se logró una mejora en aproximadamente 11% en el porcentaje de acumulación con esta estrategia.

La productividad máxima (0.094 g/Lh) fue alcanzada al sexto día de incubación. Este valor fue menor a lo reportado previamente por Faife *et al.* (2011) utilizando un medio en base a melaza y vinaza. Este autor obtuvo productividades de 0.15 g/Lh y 0.17 g/Lh para *Candida vini* y *Y. lipolytica*, respectivamente. Sin embargo, la concentración de lípidos saponificables obtenidos para la cepa de *C. glabrosa* 12D fue claramente superior, 13.4 g/L con respecto a 3.57 g/L y 2.80 g/L para *C. vini* y *Y. lipolytica*, respectivamente (Faife *et al.* 2011).

Los resultados presentados en este capítulo muestran que es posible obtener lípidos saponificables transformables en biodiésel de buena calidad, a partir de la cepa *C. glabrosa* 12D en un medio de bajo costo compuesto exclusivamente por dos subproductos industriales de producción regular, lo cual asegura la disponibilidad. Dado que los subproductos proceden de la misma zona del país, sería ideal realizar este

Capítulo II: *Utilización de melaza de caña para la producción de levaduras oleaginosas*

proceso en una planta de producción ubicada en la misma zona, lo cual minimizaría los costos de transporte.

*Utilización de glicerina cruda para la
producción de levaduras oleaginosas*

Capítulo III

III.1. Introducción al capítulo

Existen varios destinos alternativos para la glicerina cruda, como por ejemplo el uso de la misma como suplemento para alimentación animal. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de aplicaciones, el mercado de este producto se ha saturado debido en gran parte al crecimiento constante de la producción de biodiésel. En este nuevo contexto, los precios del glicerol han disminuido provocando que en muchos casos la purificación a partir de glicerina cruda no sea económicamente viable. Esta situación ha alentado la búsqueda de nuevas aplicaciones eficientes y económicamente viables para este subproducto del biodiésel, tales como la biotransformación en productos de mayor valor agregado (Vivek *et al.* 2017; Monteiro *et al.* 2018).

Nuestra propuesta abarca la producción de levaduras oleaginosas a partir de glicerina cruda, de manera de darle un uso alternativo a este subproducto, y reducir los costos de producción del biodiésel. También planteamos el uso de la vinaza de caña de azúcar como base para el medio de cultivo de forma de bajar aún más los costos de producción. En primer lugar, se evaluó la capacidad de la cepa *C. glabrosa* 12D seleccionada en el capítulo I, de acumular lípidos con glicerina cruda como fuente de carbono y se comparó su desempeño con una levadura oleaginosa aislada previamente por nuestro grupo e identificada como *Rhodotorula graminis* S1/2R (Pereyra *et al.* 2014). Como resultado de dicha comparación, la cepa S1/2R fue seleccionada por su mayor capacidad de acumular lípidos saponificables en las condiciones del ensayo. En un trabajo previo ya se había realizado la optimización de un medio de cultivo con glicerina cruda como única fuente de carbono (Martinez-Silveira *et al.* 2019 b) para la obtención de lípidos saponificables a partir de esta cepa. Dados los resultados alentadores obtenidos con vinaza para la producción de lípidos a partir de la cepa *C. glabrosa* 12 D, se decidió explorar también la posibilidad de utilizar el mismo subproducto como base del medio de cultivo para la cepa *R. graminis* S1/2R. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos, en cuanto a biomasa y lípidos saponificables obtenidos para la cepa *R. graminis* S1/2R en presencia de glicerina cruda como fuente de carbono y energía, y vinaza de caña de azúcar como medio base.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Glicerina cruda y vinaza de caña:

La glicerina cruda utilizada en esta tesis fue un subproducto producido durante la zafra del año 2017 en el Planta 2 Biodiésel de la empresa Alcoholes del Uruguay - ALUR (Capurro, Montevideo, Uruguay). La vinaza utilizada fue la misma que la descrita en el punto II.2.1. Los subproductos se mantuvieron a 4°C.

III.2.2. Tratamiento de la glicerina cruda y determinación del contenido de glicerol:

Para el tratamiento de la glicerina cruda se utilizó el procedimiento descrito por Pyle *et al.* (2008) con modificaciones, para lograr la separación de los jabones presentes en la misma. En primer lugar, la glicerina cruda se diluyó al 1:2 (v/v) con agua destilada para reducir su viscosidad. La solución se acidificó hasta pH=1 mediante el agregado de HCl 3N, dando lugar a la liberación de ácidos grasos al medio, los cuales fueron separados por centrifugación (5000 rpm, 15 minutos). La solución de glicerol crudo obtenida fue llevada a pH=5 con agregado de NaOH 1M, obteniéndose una solución traslúcida. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glicerol anhidro (Cicarelli® Calidad A.C.S), la misma se encuentra en el anexo 3.3. Luego se midió la concentración de una dilución preparada a partir de la muestra glicerina tratada, previamente filtrada (filtro 0.45 µm) y se le determinó la concentración de glicerol como esta descrito en el punto III.2.10.1.

III.2.3. Evaluación de capacidad de acumulación de lípidos con glicerina cruda como fuente de carbono:

Se evaluó la capacidad de acumulación de lípidos de la cepa seleccionada *C. glabrosa* 12D con glicerina cruda como fuente de carbono y se comparó con una cepa aislada por nuestro grupo. *R. graminis* S1/2R había sido previamente caracterizada por su capacidad de asimilar y acumular glicerina cruda (Pereyra *et al.* 2014; Martinez-Silveira *et al.* 2019b). Para este estudio se utilizó como medio de cultivo base el definido por Thakur *et al.* (1989), sustituyendo glucosa por glicerina cruda (con una concentración de glicerol correspondiente a 40 g/L) con los restantes componentes del medio base (anexo 1.5). Esta determinación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250

mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo líquido, en agitador orbital a 150 rpm a 25°C para la 12D y 28°C para la S1/2R durante 5 días. Se evaluó la producción de biomasa y lípidos intracelulares de las levaduras 12D y S1/2R. Se determinó la concentración (en gramos por litro de medio de cultivo) de biomasa seca y de lípidos saponificables, descrito en los puntos III.2.10.2 y III.2.10.3, respectivamente. Estos ensayos se realizaron por duplicado para cada concentración, determinando para cada uno el valor promedio y el intervalo de confianza (IC) correspondiente ($\alpha=0.05$) utilizando la herramienta de análisis de Excel 2010. Los resultados obtenidos se compararon mediante un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD de Fisher usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p<0.05$ fueron consideradas significativas.

III.2.4. Determinación de la concentración de glicerina cruda que maximice la concentración de lípidos intracelulares para la cepa *R. graminis* S1/2R:

Se evaluaron diferentes concentraciones de glicerol en forma de glicerina cruda con la finalidad de encontrar la concentración en donde la cantidad de lípidos intracelulares sea máxima. Para ello, se cultivó la cepa *R. graminis* S1/2R en el medio previamente optimizado por Martinez-Silveira *et al.* (2019b) (Anexo 1.6) en presencia de diferentes concentraciones de glicerol en forma de glicerina cruda (40, 45, 50, 60, 70 y 80 g/L). Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 6.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de glicerol remanente (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos III.2.10.2; III.2.10.23 y III.2.10.1 respectivamente, al octavo día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado, determinando para cada uno el valor promedio y el intervalo de confianza (IC) correspondiente ($\alpha=0.05$) utilizando la herramienta de análisis de Excel 2010. Los resultados experimentales fueron comparados por un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p<0.05$ fueron consideradas significativas.

III.2.5. Escalado en fermentador utilizando 50 g/L de glicerina cruda:

El cultivo se realizó en el fermentador de 3 L de capacidad, con 2 L de volumen de cultivo (Fermentador BLBIO-3GJ, Shanghai Bailun Bio-Technology.co, Ltd). El medio de cultivo empleado fue TKo (anexo 1.6) pero con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda en lugar de 40 g/L. El fermentador se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo de la levadura *R. graminis* S1/2R, obtenido en el mismo medio del fermentador, incubado durante 48 horas a 28°C y agitación a 150 rpm. Este había sido inoculado con 20 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Las condiciones de incubación del fermentador fueron las siguientes: 28°C; 250 rpm y 2 vvm de aire. Durante todo el proceso se controló la temperatura del cultivo con electrodo de platino (Pt100), y se registró continuamente el pH y la concentración de oxígeno disuelto (%OD) a través de los electrodos 405-DPAS-SC-K8S (Mettler, Toledo) y InPro 6800 (Mettler, Toledo), respectivamente. El cultivo en fermentador se monitoreó durante 11 días, y se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente. A cada muestra se les determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de glicerol remanente (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos III.2.10.2; III.2.10.3 y III.2.10.1 respectivamente. Durante todo el proceso se controló la temperatura, y se registró el pH y la concentración de oxígeno disuelto, sin controlarse la concentración de este último parámetro, de la misma manera que para los otros cultivos en fermentador. Al final del cultivo se determinaron los coeficientes de rendimiento en lípidos y en biomasa basado en el consumo de sustrato ($Y_{p/s}$ y $Y_{x/s}$) (g/g) y la productividad máxima global del proceso (Q_p) (g/Lh).

III.2.6. Producción de la levadura S1/2R en medio a base de vinaza de caña de azúcar con glicerol como fuente de carbono:

De manera de intentar abaratar y simplificar el medio de cultivo para la producción, se evaluó el cambio del medio base por vinaza de caña de azúcar. Para esto, la cepa S1/2R se cultivó en el medio con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda pero sustituyendo el resto de los componentes del medio optimizado (TKo) por diferentes diluciones de vinaza (Relación Vinaza:H₂O: 0:100; 12.5:87.5; 25:75 50:50 y 100:0).

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 6.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca (en g/L de cultivo) como esta descrito en el punto III.2.10.2 al octavo día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado. Los resultados experimentales fueron comparados por un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

III.2.7. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:

Se evaluó si el extracto de levadura tendría algún efecto sobre la acumulación de lípidos. Para ello, la cepa S1/2R se cultivó en el medio con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda y una relación vinaza:H₂O de 50:50 con diferentes concentraciones de extracto de levadura (0; 0.75; 1.5 y 2 g/L). Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación a 150 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio. Inicialmente, el pH del medio se ajustó a 6.0. Como inóculo se empleó 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Se les determinó la concentración de biomasa seca y de lípidos saponificables (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos III.2.10.2 y III.2.10.3 respectivamente al octavo día de incubación. Cada cultivo se realizó por duplicado. Los resultados experimentales fueron comparados por un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test LSD usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

III.2.8. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo en batch:

El cultivo se realizó en el fermentador descrito en el punto III.2.5, utilizando 2 L de volumen de cultivo. El medio de cultivo base empleado fue a base de vinaza de caña en una relación vinaza:H₂O de 50:50 con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

cruda. El fermentador se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo de la levadura S1/2R, obtenido en el mismo medio del fermentador, incubado durante 48 horas a 28°C y agitación a 150 rpm. Este pre inóculo se inoculó con 20 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el punto III.2.5. El cultivo en fermentador se monitoreó durante 12 días, y se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente. A cada muestra se les determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de glicerol remanente (en g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos III.2.10.2; III.2.10.3 y III.2.10.1 respectivamente. Durante todo el proceso se controló la temperatura, y se registró el pH y la concentración de oxígeno disuelto, sin controlarse la concentración de este último parámetro. Al final del cultivo se determinaron los coeficientes de rendimiento en lípidos y en biomasa basado en el consumo de sustrato ($Y_{p/s}$ y $Y_{x/s}$) (g/g) y la productividad máxima global del proceso (Q_p) (g/Lh). Este cultivo se realizó por duplicado.

III.2.9. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo alimentado:

El cultivo se realizó en el fermentador descrito en el punto III.2.5, utilizando 2 L de volumen de cultivo. El medio de cultivo base empleado fue a base de vinaza de caña en una relación vinaza:H₂O de 50:50 con 50g/L de glicerol en forma de glicerina cruda. El cultivo fue alimentado con glicerina cruda cuando el glicerol fue consumido totalmente. Cada alimentación constó del agregado de glicerina cruda concentrada de manera de alcanzar la concentración inicial del medio de cultivo. El fermentador se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo de la levadura S1/2R, obtenido en el mismo medio del fermentador, incubado durante 48 horas a 28°C y agitación a 150 rpm. Este pre inóculo se inoculó con 20 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el punto III.2.5. El cultivo en fermentador se monitoreó durante 17 días, y se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente. A cada muestra se les determinó la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables y la concentración de glicerol remanente (en

g/L de cultivo) como esta descrito en los puntos III.2.10.2; III.2.10.2 y III.2.10.3 respectivamente. Durante todo el proceso se controló la temperatura, y se registró el pH y la concentración de oxígeno disuelto. A diferencia de los otros cultivos en fermentador, la concentración de oxígeno disuelto se controló aumentando la velocidad de agitación cuando la concentración descendía por debajo de 10%. Al final del cultivo se determinaron los coeficientes de rendimiento en lípidos y en biomasa basado en el consumo de substrato ($Y_{p/s}$ y $Y_{x/s}$) (g/g) y la productividad máxima global del proceso (Q_p) (g/Lh).

III.2.10. Métodos analíticos:

III.2.10.1. Determinación de la concentración de glicerol:

La concentración de glicerol, se determinó a través del análisis de las muestras mediante cromatografía líquida (HPLC) con detector de índice de refracción (RID-10A Shimadzu) equipado con una columna Ultra amino 3 μ m, 150 x 4.6 mm. Las condiciones operativas utilizadas fueron, fase móvil acetonitrilo:H₂O 75:25 con un flujo de 0.8 mL/min y la temperatura de la columna fue de 35°C.

III.2.10.2. Determinación del crecimiento celular:

El crecimiento celular fue monitoreado determinando el peso seco como fue descrito en el punto II.2.10.3

III.2.10.3. Determinación de la concentración de lípidos saponificables:

La determinación de la concentración de lípidos por saponificación directa se realizó gravimétricamente como fue descrito en el punto II.2.10.4.

III.3. Resultados

III.3.1. Tratamiento de la glicerina cruda y determinación del contenido de glicerol:

El tratamiento utilizado permitió obtener una solución traslúcida (Figura III.1.a) a partir de la glicerina cruda (Figura III.1.c). En la figura III.2 pueden verse los ácidos grasos precipitados luego de la centrifugación.

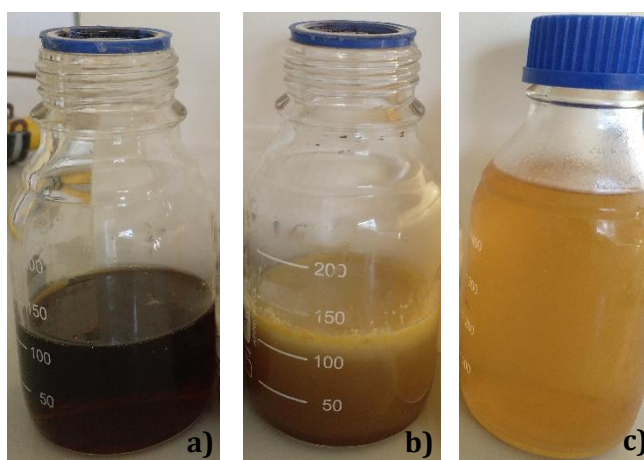


Figura III.1: Fotografías de las etapas del tratamiento realizado a la glicerina cruda. a) Glicerina cruda resultante de la producción de biodiésel con metilato de potasio como catalizador. b) Glicerina cruda diluida al 1:2 (v/v) y acidificada a pH 1. Se observan los ácidos grasos en la superficie. c) Solución de glicerina cruda luego de la separación de ácidos grasos por centrifugación.

Una vez obtenida la glicerina cruda tratada se determinó la concentración de glicerol por HPLC. La concentración del glicerol en la glicerina cruda fue: (0.8201 ± 0.036) g/mL.

III.3.2. Evaluación de la capacidad de acumulación de lípidos con glicerina cruda como fuente de carbono

Las cepas 12D y S1/2R fueron incubadas en las condiciones descritas en el punto III.2.3 con glicerina cruda como fuente de carbono. Se cuantificó la biomasa seca, los lípidos saponificables y se calculó el porcentaje de acumulación en cada caso. La tabla III.1 es una tabla comparativa, en donde se muestran los resultados de biomasa seca, concentración de lípidos acumulados y los porcentajes de acumulación para las cepas.

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

Tabla III.1: Biomasa seca, lípidos saponificables y porcentajes de acumulación de las cepas 12D y S1/2R con glicerina cruda como fuente de carbono.

Cepa	Biomasa (g/L)	Lípidos saponificables (g/L)	% acumulación
<i>C. glabosa</i> 12D	(3.5 ± 0.2) ^A	(0.28 ± 0.03) ^A	(8.0 ± 0.4) ^A
<i>R. graminis</i> S1/2R	(13.4 ± 0.2) ^B	(3.6 ± 0.2) ^B	(27 ± 1) ^B

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$; las mismas están indicadas por diferentes letras.

Como puede observarse en la tabla III.1, la cepa *R. graminis* S1/2R logró acumular una cantidad significativamente mayor de lípidos saponificables, y el porcentaje de acumulación también fue significativamente mayor al alcanzado por la cepa *C. glabosa* 12D.

III.3.3. Determinación de la concentración de glicerina cruda que maximice la concentración de lípidos intracelulares para la cepa S1/2R:

Se determinó la concentración inicial de glicerol en forma de glicerina cruda en donde la concentración de lípidos intracelulares fuera máxima. Para ello la cepa S1/2R se cultivó en medio Thakur optimizado (anexo 1.6) con diferentes concentraciones de glicerol bajo la forma de glicerina cruda. En la tabla III.2 se muestran los resultados de biomasa seca, lípidos saponificables y glicerol remanente en g/L luego de 8 días de incubación.

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

Tabla III.2: Resultados de biomasa seca, lípidos saponificables y glicerol remanente en (g/L) a los 8 días de incubación.

Concentración inicial de glicerol (g/L)	Biomasa seca (g/L)	Lípidos saponificables (g/L)	Glicerol remanente (g/L)	$Y_{L/S}$ (g/g)
40	(13.87 ± 0.05) ^a	(3.8 ± 0.8) ^{c*}	(0.6 ± 0.4) ^{a**}	(0.10 ± 0.01) ^E
45	(15.5 ± 0.4) ^{bc}	(4.3 ± 0.1) ^{d*}	(0.96 ± 0.07) ^{a**}	(0.10 ± 0.01) ^E
50	(16.4 ± 0.1) ^c	(4.60 ± 0.04) ^{e*}	(3.90 ± 0.02) ^{b**}	(0.10 ± 0.01) ^E
60	(16 ± 1) ^{bc}	(3.34 ± 0.05) ^{b*}	(21.7 ± 0.4) ^{c**}	(0.09 ± 0.01) ^C
70	(15.2 ± 0.1) ^b	(2.4 ± 0.3) ^{a*}	(36 ± 2) ^{d**}	(0.07 ± 0.01) ^B
80	(15.2 ± 0.4) ^b	(2.4 ± 0.3) ^{a*}	(35.3 ± 0.8) ^{d**}	(0.06 ± 0.01) ^A

Nota: Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras.

A los 8 días de incubación se logró un consumo completo de glicerol cuando la concentración inicial fue de 40 y 45 g/L. La concentración de biomasa seca obtenida con 40 g/L fue significativamente menor que la lograda con el resto de las concentraciones de glicerol ensayadas. Los valores máximos de rendimiento de lípidos por g de glicerol consumido se obtuvieron con concentraciones iniciales de glicerol de 45 y 50 g/L. Si bien no se evidenciaron diferencias significativas entre ambos rendimientos, cuando se trabajó con 50 g/L de glicerol se obtuvo una cantidad de lípidos saponificables significativamente mayor. Por ello, y buscando mejoras en el rendimiento y concentración final de lípidos se decidió ensayar la producción a mayor escala utilizando 50 g/L de glicerol.

III.3.4. Escalado en fermentador utilizando 50 g/L de glicerina cruda:

Se realizó el cultivo de la cepa S1/2R en *batch*, en fermentador, en las condiciones descritas en el punto III.2.5, utilizando una concentración inicial de glicerol de 50 g/L. El cultivo se monitoreó durante 11 días. Desde el inicio del cultivo se determinaron diariamente las concentraciones de glicerol, y de biomasa. La concentración de lípidos saponificables se analizó en forma diaria a partir del tercer día. La temperatura, la

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

agitación y la aireación se mantuvieron constantes durante todo el proceso. El pH, y el oxígeno disuelto se monitorearon, obteniéndose un registro continuo de este último. Los resultados de este experimento se muestran en la figura III.2. En el onceavo día de cultivo se obtuvo la mayor concentración de lípidos saponificables y biomasa seca (5.9 y 17.2 g/L de cultivo, respectivamente). En este mismo día se alcanzaron los máximos rendimientos en biomasa y en lípidos como puede observarse en la figura III.3. La productividad volumétrica máxima alcanzada fue de 0.023 g/Lh, y se dio al onceavo día de cultivo.

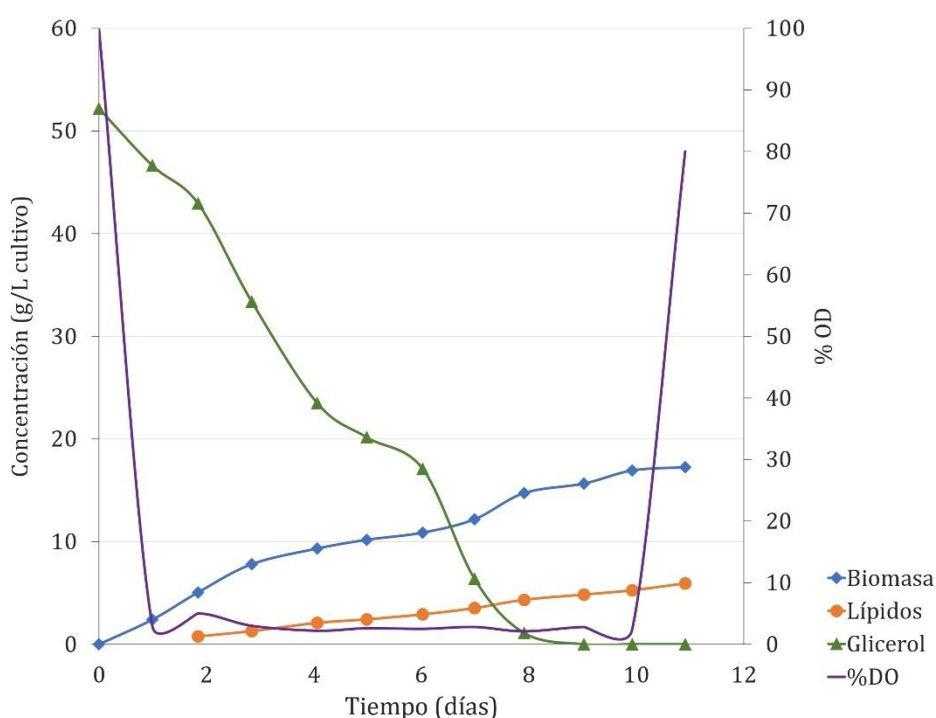


Figura III.2: Cultivo en *batch* en fermentador en el medio optimizado con 50g/L de glicerol en forma de glicerina cruda. Están representados los parámetros medidos: oxígeno disuelto (OD%) (eje vertical primario) registrado de manera continua, glicerol residual (g/L), biomasa seca (g/L) y lípidos saponificables (g/L) (eje vertical secundario), medidos en intervalos periódicos

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

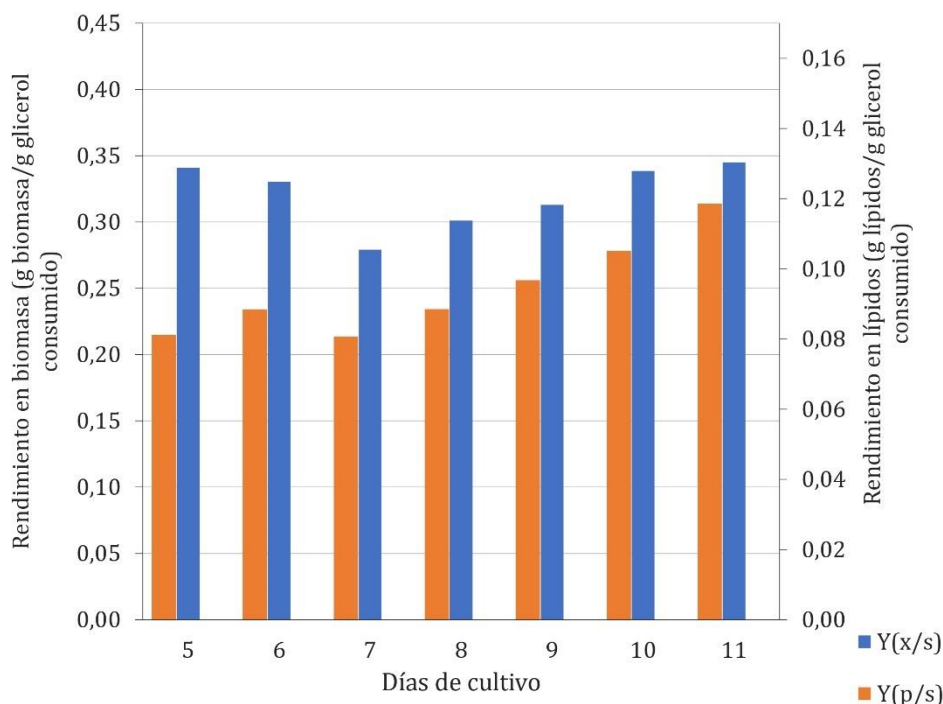


Figura III.3: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables. Rendimiento en biomasa por gramo de glicerol consumido ($Y_{x/s}$) (eje vertical primario) y rendimiento en lípidos saponificables por gramo de glicerol consumido ($Y_{p/s}$) (eje vertical secundario).

III.3.5. Producción de la levadura S1/2R en medio a base de vinaza de caña de azúcar con glicerol como fuente de carbono:

Se evaluó la posibilidad de sustituir la base mineral del medio utilizado hasta el momento por vinaza de caña para lograr el crecimiento y producción de lípidos a partir de la cepa S1/2R. Se realizaron cultivos en *batch*, utilizando como base del medio diferentes diluciones de vinaza y 50 g/L de glicerol en la forma de glicerina cruda tratada, como fuente de carbono. Luego de 8 días de incubación se determinó la concentración de biomasa seca producida en las diferentes condiciones. Los resultados se muestran en la figura III.4.

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

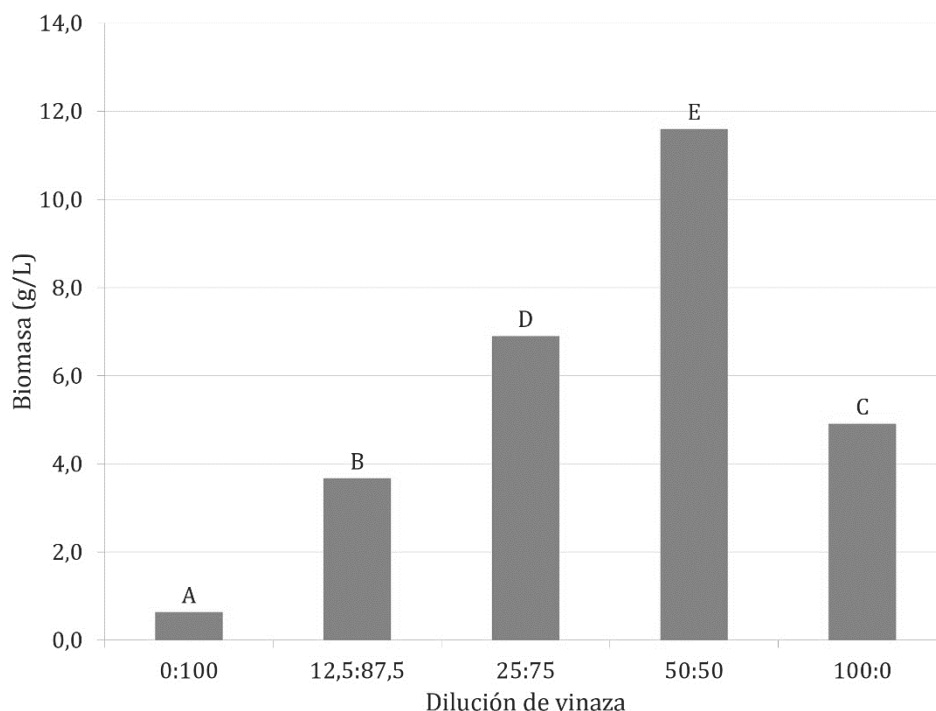


Figura III.4: Biomasa seca en g/L de cultivo de la cepa S1/2R en medios con diferentes diluciones de vinaza luego de 8 días de cultivo. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras

Cuando el medio base se sustituyó por una dilución 50:50 vinaza:H₂O se obtuvo una concentración de biomasa seca significativamente mayor al resto de las diluciones. Por ello se seleccionó esta dilución como base del medio de cultivo para la producción de la levadura.

III.3.6. Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la acumulación de lípidos:

Se evaluó el efecto del agregado de extracto de levadura en la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables obtenidos cuando la levadura era cultivada en vinaza diluida 50:50 con 50 g/L de glicerol como fuente de carbono. Luego de 8 días de cultivo se determinó la concentración de biomasa seca y lípidos saponificables; así como el porcentaje de acumulación en cada caso. Estos resultados se presentan en la figura III.5.

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

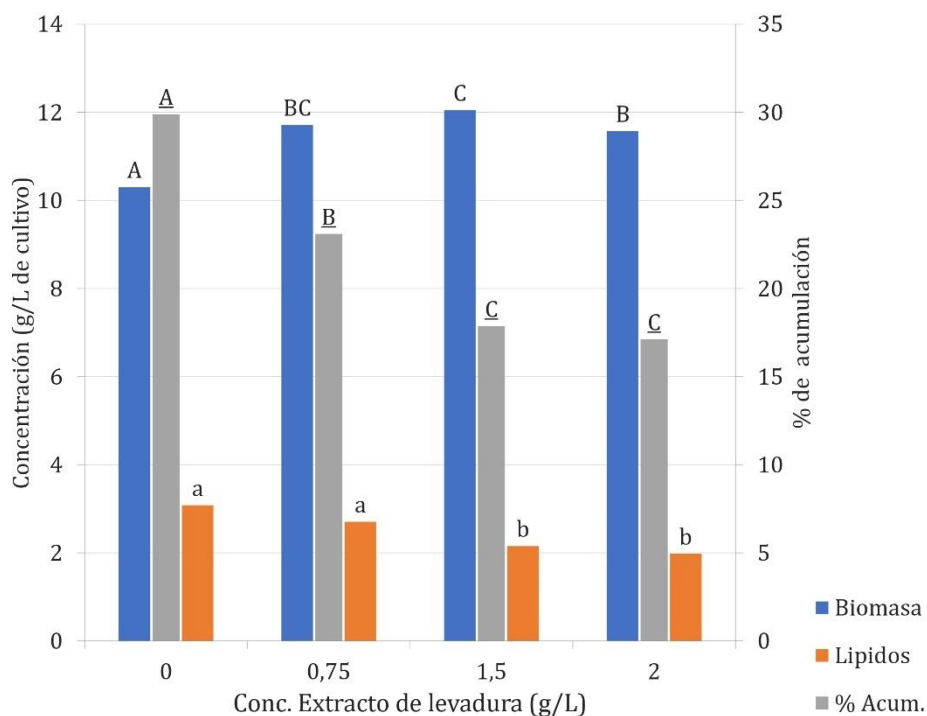


Figura III.5: Biomasa seca, lípidos saponificables en g/L de cultivo y porcentaje de acumulación de la cepa S1/2R en medios con diferentes concentraciones de extracto de levadura a los 8 días de cultivo. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Fisher LSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Fisher LSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

El resultado obtenido muestra que a la concentración de 1.5 g/L de extracto de levadura se logró una concentración de biomasa seca significativamente mayor. Sin embargo, las mayores concentraciones de lípidos saponificables se obtuvieron en presencia de con 0.75 y 0 g/L de extracto de levadura. La concentración de biomasa seca obtenida con 0 g/L fue significativamente menor que la obtenida con el resto de las concentraciones. Sin embargo, en ausencia de extracto de levadura se obtuvo el mayor porcentaje de acumulación de lípidos y la mayor concentración de lípidos saponificables en cultivo, siendo ésta última no significativamente diferente a la obtenida con 0.75 g/L. De acuerdo a estos resultados se decidió no agregar extracto de levadura al medio, y realizar el escalado de la producción a nivel de fermentador en vinaza diluida al medio con glicerol (50 g/L) como fuente de carbono.

III.3.7. Escalado en fermentador con vinaza de caña como medio base, cultivo en *batch*:

El cultivo en fermentador se realizó en las condiciones descritas anteriormente (III.2.5) utilizando como base del medio vinaza de caña diluida al medio con agua y 50g/L de glicerol. El cultivo se monitoreó durante 12 días, analizando la concentración de biomasa seca, de lípidos saponificables de glicerol en forma diaria. A su vez, se obtuvo un registro continuo del oxígeno disuelto en el medio durante todo el experimento. Este ensayo se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.6. En el onceavo día de cultivo se logró obtener la mayor concentración de lípidos saponificables y biomasa seca, 8.0 ± 0.8 y 17.1 ± 1.2 g/L de cultivo, respectivamente. En este día también se alcanzaron los máximos rendimientos en biomasa y en lípidos, (figura III.7). La productividad volumétrica máxima alcanzada fue de 0.030g/Lh.

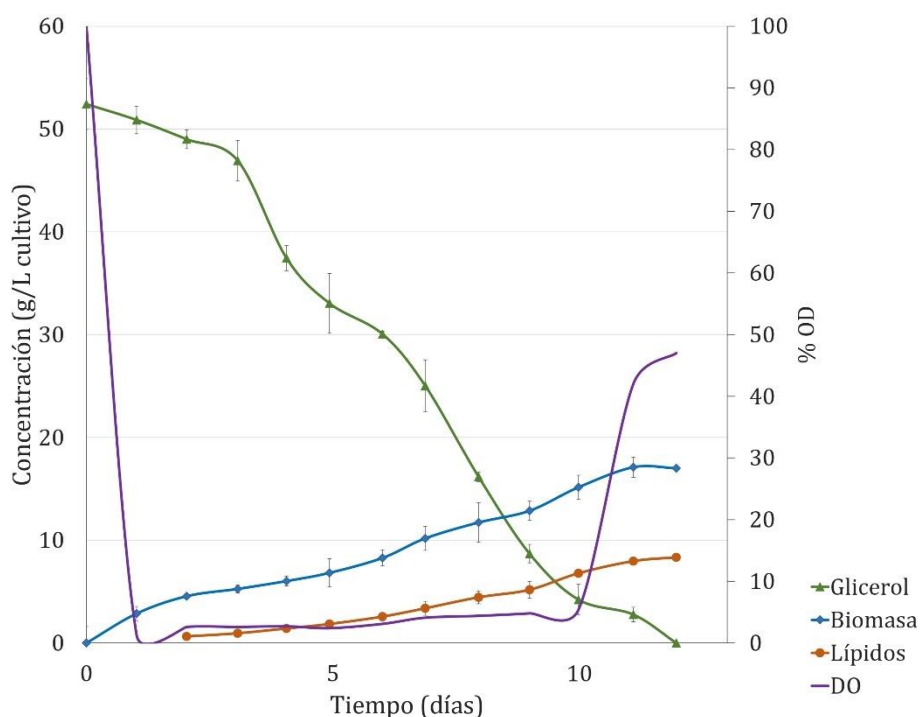


Figura III.6: Cultivo en *batch* en fermentador sin control de oxígeno con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda y 50:50 vinaza:H₂O como base. Están representados los parámetros medidos: oxígeno disuelto (OD%) (eje vertical primario) registrado de manera continua, glicerol residual (g/L), biomasa seca (g/L) y lípidos saponificables (g/L) (eje vertical secundario), medido en intervalos periódicos. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).

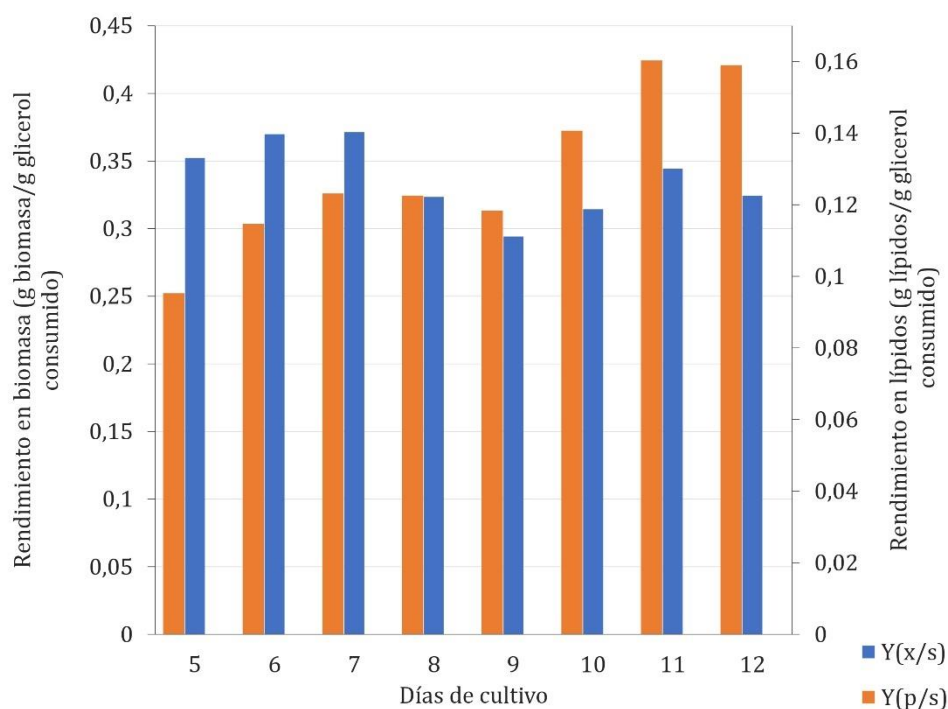


Figura III.7: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables. Rendimiento en biomasa por gramo de glicerol consumido ($Y_{x/s}$) (eje vertical primario) y rendimiento en lípidos saponificables por gramo de glicerol consumido ($Y_{p/s}$) (eje vertical secundario).

III.3.8. Cultivo alimentado en fermentador con vinaza de caña como medio base:

Se estudió el efecto de la aireación y la alimentación con glicerol en la producción de biomasa y lípidos por parte de la levadura S1/2R en fermentador de 1.5 litros de volumen de trabajo. El cultivo se monitoreó durante 17 días, analizando la concentración de biomasa seca, y de lípidos saponificables y el consumo de glicerol en forma diaria. El oxígeno disuelto fue controlado, de manera que el porcentaje nunca estuviera por debajo de 10% y se realizó un registro continuo de dicho parámetro a lo largo del cultivo. Se realizaron un total de 2 alimentaciones (séptimo y décimo tercer día de cultivo) con glicerol en forma de glicerina cruda tratada hasta alcanzar la concentración de glicerol inicial. La primera alimentación se realizó cuando la concentración de glicerol residual fue no detectable y la segunda 6 días después de la primera, para observar la respuesta del cultivo a nuevo pulso de glicerol. En estas condiciones se logró un consumo total de 116 g de glicerol durante 17 días de corrida. Los resultados de este experimento se muestran en la figura III.8. En el séptimo día de cultivo los rendimientos en biomasa y en lípidos son máximos

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

(0.38 y 0.13 g/g respectivamente), ese día la concentración de lípidos saponificables y biomasa seca fue 5.69 y 16.85 g/L de cultivo, respectivamente. Los rendimientos en biomasa ($Y_{x/s}$) y en lípidos ($Y_{p/s}$) a partir del quinto día de cultivo pueden observarse en la figura III.9. La productividad volumétrica máxima alcanzada fue de 0.035g/Lh.

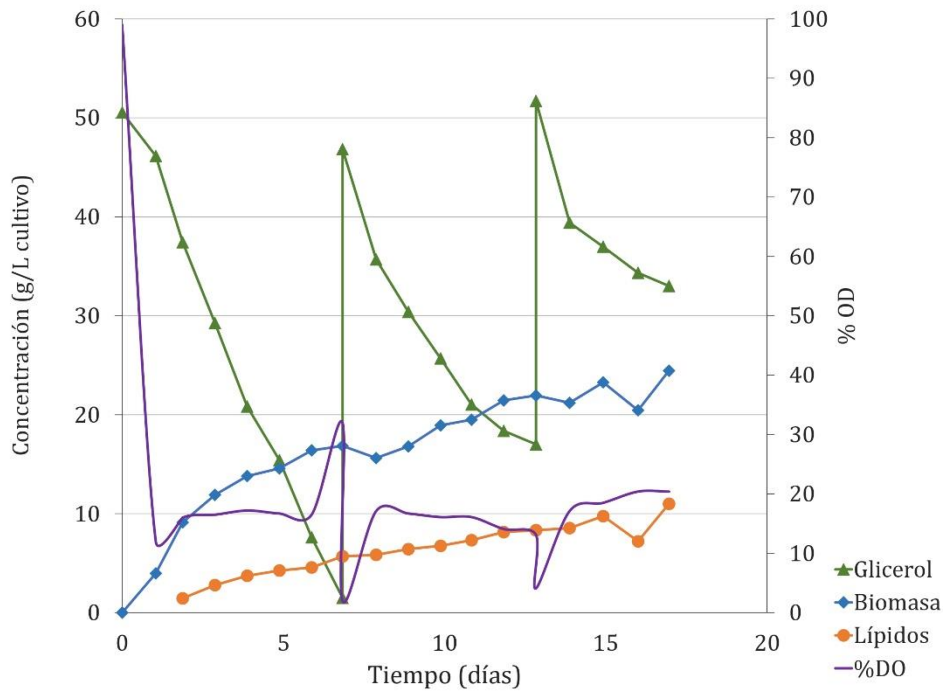


Figura III.8: Cultivo en alimentado en fermentador con control de oxígeno con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda y 50:50 vinaza:H₂O como base. Están representados los parámetros medidos: oxígeno disuelto (OD%) (eje vertical primario) registrado de manera continua, glicerol residual (g/L), biomasa seca (g/L) y lípidos saponificables (g/L) (eje vertical secundario), medido en intervalos periódicos

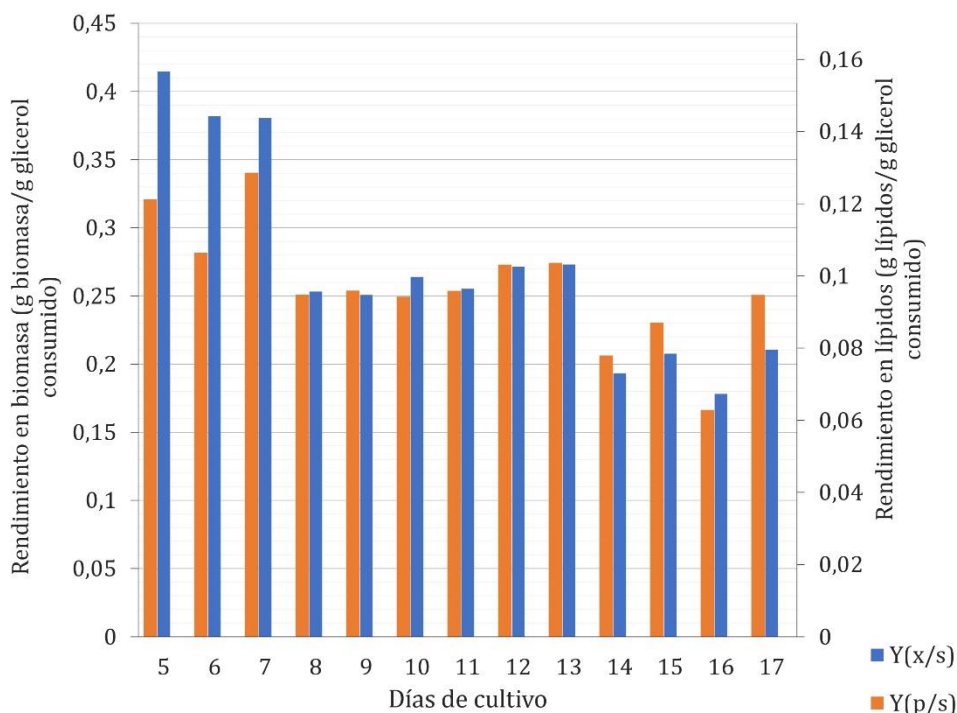


Figura III.9: Gráfico de rendimientos en biomasa y en lípidos saponificables. Rendimiento en biomasa por gramo de glicerol consumido ($Y_{x/s}$) (eje vertical primario) y rendimiento en lípidos saponificables por gramo de glicerol consumido ($Y_{p/s}$) (eje vertical secundario).

El cultivo no se volvió a alimentar luego del decimoséptimo día porque conjuntamente con la biomasa se produjo un subproducto extracelular que dificultó la formación del *pellet* celular y el filtrado del sobrenadante. Esto puede observarse en los rendimientos de lípidos y biomasa del decimosexto día de cultivo (figura III.10) en donde se ve una disminución acentuada en estos valores ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$), debido a la pérdida de células. La dificultad de formación del *pellet* se solucionó diluyendo en agua el volumen extraído previo a la centrifugación. Este comportamiento del cultivo hace pensar que el subproducto extracelular producido es de carácter tensoactivo. El problema con la formación del *pellet* de células se comenzó a evidenciar a partir del décimo cuarto día de cultivo y se fue incrementando a medida que pasaba el tiempo.

III.3.9. Comparación entre diferentes condiciones de cultivo en fermentador:

Para realizar la comparación entre las diferentes condiciones ensayadas en fermentado, se calculó el rendimiento máximo en lípidos por g de glicerol consumido ($Y_{p/s}$) en cada condición, y se determinó la concentración de biomasa seca y lípidos a

Capítulo III: *Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas*

la cual se da este rendimiento máximo, así como el tiempo de cultivo, la cantidad de glicerol consumido y la productividad volumétrica en cada caso. Estos resultados se resumen en la tabla III.3.

Como puede observarse en la tabla III.3, el mayor rendimiento en lípidos ($Y_{p/s}$: 0.16 g/g) se logró con el cultivo en *batch* sin control de oxígeno en el medio a base de vinaza de caña de azúcar en una dilución 50:50 (vinaza H₂O) y con 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda. Este rendimiento se logró a los 11 días de cultivo con un consumo de 50 g de glicerol.

Tabla III.3 Cuadro comparativo de las diferentes condiciones de cultivo en fermentador para la cepa *R. graminis* S1/2R:

Modo de fermentación	$Y_{(x/s)}$ (g/g)	$Y_{(p/s)}$ (g/g)	Q_p (g/Lh)	Biomasa seca (g/L)	Lípidos saponificables (g/L)	% acumulación (g/g)	Tiempo de fermentación (días)
<i>Batch</i> (III.3.4)	0.34	0.12	0.023	17.2	5.9	34.4	11
<i>Batch</i> (III.3.7)	0.34	0.16	0.030	17.1	8.0	46.6	11
<i>Fed Batch</i> (III.3.8)	0.38	0.13	0.035	16.8	5.7	33.8	7

Nota: $Y_{(x/s)}$: rendimiento en biomasa por gramo de glicerol consumido; $Y_{(p/s)}$: rendimiento en lípidos saponificables por gramo de glicerol consumido; Q_p productividad volumétrica.

III.4. Discusión del capítulo

El trabajo presentado en este capítulo se centró en el estudio de un medio compuesto exclusivamente de subproductos industriales para la producción de lípidos saponificables a partir de la levadura *R. graminis* S1/2R, previamente seleccionada (Pereyra *et al.* 2014). No se continuó el trabajo con la cepa *C. glabrosa* 12D debido a que la misma no logró acumular un porcentaje superior a 20% (8%) con glicerol como fuente de carbono. Dado que la viabilidad económica de la producción de biodiésel a partir de aceites microbianos está determinada principalmente por el costo del proceso de producción microbiana (Ageitos *et al.* 2011), un medio de cultivo económico resulta indispensable para la rentabilidad del proceso. En ese sentido, el uso de subproductos o incluso desechos de industrias en la formulación de dicho medio sería fundamental.

En este trabajo se seleccionó la glicerina cruda, subproducto de la propia industria del biodiésel, como fuente de carbono para la producción de levaduras oleaginosas. Su uso como componente de medios de cultivo para la producción de biomasa o de productos extra o intracelulares tales como los aceites microbianos, ya ha sido previamente explorada con éxito. Existen ejemplos donde se incorpora glicerina cruda sin tratar al medio de cultivo (Uprety *et al.* 2017) pero en la mayoría de los casos se realizan diferentes tipos de pretratamiento previo a su incorporación, para evitar inhibición del crecimiento microbiano. Por ejemplo, Rahim *et al.* (2019) ensayaron diferentes pretratamientos para la obtención de metabolitos de *Aspergillus terreus*. A su vez, Liang *et al.* (2010) realizaron la producción de levaduras oleaginosas a partir de glicerol crudo pretratado con ácido para la remoción de ácidos grasos libres, estrategia utilizada también en el presente trabajo. La separación de los jabones en nuestro caso se realizó para facilitar el análisis de las muestras tomadas del cultivo y no como estrategia para favorecer el crecimiento de la levadura, ya que en un trabajo previo (Pereyra *et al.* 2014) se constató que el crecimiento de la cepa *R. graminis* S1/2R no variaba al utilizar glicerina cruda sin tratar en lugar del sustrato pretratado.

La concentración a la cual se da la inhibición del crecimiento microbiano en presencia de glicerina cruda es variada y depende de la composición del sustrato y de la cepa a

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

cultivar. Uçkun Kiran *et al.* (2013) demostraron que la inhibición del crecimiento de *Rhodospiridium toruloides* ocurría en presencia de más de 50 g/L de glicerol en forma de glicerina cruda, mientras que Papanikolaou & Aggelis (2002) no detectaron inhibición del crecimiento en concentraciones entre 30 y 80 g/L de glicerol, en el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerina cruda.

Karamerou *et al.* (2016) resaltaron a su vez la importancia de la composición global del medio de cultivo al cual se incorpora la glicerina, afirmando que otros componentes podrían mitigar los efectos inhibitorios de las impurezas presentes en la glicerina cruda.

Por ello, la determinación de la concentración óptima de sustrato debe ser determinada en cada caso. Además del efecto inhibidor de las impurezas, debe tenerse en cuenta la inhibición causada por el glicerol mismo debido al estrés osmótico (Raimondi *et al.* 2014) y debe considerarse que, en ciertos casos, la concentración óptima para el crecimiento de levaduras oleaginosas no resulta ser la concentración a la cual se obtiene la mayor acumulación intracelular de lípidos (Karamerou *et al.* 2016).

La cepa *R. graminis* S1/2R, al ser cultivada en el medio de cultivo descrito por Thakur *et al.* (1989), sustituyendo la fuente de carbono de este medio (glucosa) por glicerol bajo la forma de glicerina cruda pretratada, en la misma concentración (40 g/L), fue capaz de acumular lípidos saponificables. La composición del medio se optimizó para maximizar la acumulación de lípidos y se escaló a nivel de fermentador, obteniéndose un aumento de casi tres veces en la cantidad de lípidos y un rendimiento de 0.11 g de biodiésel por gramo de glicerol consumido (Martinez-Silveira *et al.* 2019b).

Dado que el glicerol pareció ser el nutriente limitante en estos trabajos (Karamerou *et al.* 2016; Martinez-Silveira *et al.* 2019b), en esta tesis se estudió el efecto de la concentración inicial de glicerol en el crecimiento de la levadura y la cantidad de lípidos producidos, así como los rendimientos de ambos parámetros respecto al consumo de glicerol. Para ello y considerando el glicerol como reactivo limitante, *R. graminis* S1/2R se cultivó durante 8 días con diferentes concentraciones iniciales de glicerina cruda, que variaron de 40 a 80 g/L de glicerol. Los resultados indicaron que la cantidad de biomasa obtenida no varió por encima de 45 g/L y que la máxima concentración de lípidos se logró con una concentración inicial de glicerol de 50 g/L.

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

Utilizando 50 g/L como concentración inicial se realizó un cultivo en *batch* en fermentador, obteniéndose mayores cantidades de biomasa y lípidos que los obtenidos por Martinez-Silveira *et al.* (2019b), en las mismas condiciones, pero con 40 g/L de glicerol inicial bajo la forma de glicerina cruda. También se obtuvo un mayor rendimiento en lípidos por gramo de glicerol consumido (0.10 vs 0.12) y una biomasa final con mayor acumulación de lípidos, 34% en lugar del 28% alcanzado con menor cantidad de glicerol. Sin embargo, se observó una disminución en la velocidad de consumo del glicerol y de producción de biomasa con respecto al cultivo con 40 g/L de glicerol. Este resultado concuerda con lo planteado por Ratledge & Wynn (2002) quienes demostraron mediante estudios en cultivo continuo que, en el caso de levaduras, se logra una mayor acumulación de lípidos cuando se trabaja a velocidades de crecimiento menores a la máxima. Los mismos autores justificaron este resultado basado en la demostración previa de que, para este tipo de microorganismos, la velocidad de acumulación de lípidos es siempre menor que la velocidad de crecimiento máxima.

Para lograr abaratar aún más la producción de la levadura seleccionada (S1/2R), se ensayó la posibilidad de utilizar vinaza de caña, subproducto de la misma empresa que produce el biodiésel en Uruguay, como base del medio de cultivo en sustitución a la base utilizada hasta el momento. De acuerdo a su composición química, la vinaza de caña podría utilizarse como fuente de varios nutrientes (N, S, P) para el crecimiento microbiano (Hoarau *et al.* 2018). Ya se han obtenido buenos resultados utilizando vinaza de caña como fuente de nitrógeno en la producción de biomasa fúngica (Nitayavardhana *et al.* 2013; Ahmed *et al.* 2018; Reis *et al.* 2019). Sin embargo, Reis *et al.* (2019) demostraron que el agregado de una fuente de carbono era necesario para el crecimiento de microorganismos heterótrofos como *Mucor circinelloides* en presencia de vinaza. Por ello, en este trabajo, se decidió ensayar el crecimiento y producción de lípidos de la levadura *R. graminis* S1/2R combinando vinaza de caña con glicerina cruda pretratada como fuente de carbono.

Dado que las vinazas pueden contener algunos compuestos, como por ejemplo el furfural o el ácido acético, en concentraciones que resulten inhibitorias para el crecimiento microbiano (Arora *et al.* 2016), se evaluó en primer lugar, el crecimiento

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

de la cepa S1/2R, en diferentes diluciones de vinaza de caña de azúcar, observándose una inhibición del crecimiento cuando la vinaza se usó sin diluir.

Son numerosos los casos en que la adición de extracto de levadura ha resultado fundamental para el crecimiento y producción de lípidos por parte de levaduras (Raimondi *et al.* 2014; Dobrowolski *et al.* 2016; Martinez-Silveira *et al.* 2019b). Por ello, se evaluó el efecto de dicho suplemento en la producción de biomasa y lípidos a partir de la cepa S1/2R. Los resultados mostraron que el porcentaje de acumulación de lípidos fue significativamente mayor en ausencia del suplemento. Esto resultó fundamental ya que demostró que no era necesario incorporar al medio de cultivo un componente caro como el extracto de levadura y que era factible utilizar solamente vinaza de caña y glicerina cruda tratada para obtener lípidos saponificables a partir de la cepa *R. graminis* S1/2R.

Con el cultivo en *batch* en fermentador, con el medio a base de subproductos (glicerina cruda y vinaza de caña de azúcar) y sin control de oxígeno disuelto, se logró un buen rendimiento de lípidos por gramo de glicerol consumido (0.16 g/g), el mejor de los obtenidos hasta el momento con esta cepa. Aunque el rendimiento teórico máximo de triacilglicéridos por gramo de glicerol consumido (en caso en el que todo el CH_3COSCoA producido se canaliza hacia la síntesis de lípidos) es de alrededor de 0.30 g/g, el rendimiento en la práctica nunca es superior a 0.22 g/g (Chatzifragkou *et al.* 2011). De todas maneras, los valores experimentales obtenidos en la mayoría de los casos son bastante más bajos, alrededor de 0.10 g/g (Papanikolaou & Aggelis 2011b) por lo cual 0.16 g/g puede considerarse un buen rendimiento. Cuando el cultivo se realizó en el medio mineral con extracto de levadura (Fig. III.3) se observó una mayor velocidad de consumo de glicerol que la obtenida en el medio a base de vinaza (Fig. III.7), debido seguramente a un efecto negativo de la vinaza sobre la velocidad de crecimiento de la levadura. Sin embargo, la cantidad de lípidos acumulada en la biomasa celular y el rendimiento fueron menores en el medio mineral. Estos resultados demuestran nuevamente, que una menor velocidad de crecimiento favorece la acumulación de lípidos por parte de la levadura S1/2R tal como lo demostraron Ratledge & Wynn (2002).

Capítulo III: Utilización de glicerina cruda para la producción de levaduras oleaginosas

Lo mismo sucedió cuando se cultivó la levadura en medio con vinaza y control de oxígeno disuelto (Figura III.9). La velocidad de crecimiento fue notoriamente mayor a la obtenida sin control de oxígeno, pero el rendimiento máximo y la concentración final de lípidos obtenidos fueron menores, confirmando el concepto anterior.

Los resultados obtenidos mediante las diferentes estrategias evaluadas, muestran que la acumulación de lípidos intracelulares es un proceso metabólico sensible, que varía con el sustrato utilizado, el organismo productor y con las condiciones de cultivo (Diwan *et al.* 2018).

En este caso, el mejor rendimiento se obtuvo cuando la levadura *R. graminis* S1/2R se cultivó en *batch* sin control del oxígeno disuelto en un medio compuesto exclusivamente por vinaza diluida al medio y glicerina cruda pretartada (50 g/L). El uso de la combinación de estos dos subproductos para producir SCO había sido reportado previamente por Faife *et al.* (2011) con una cepa de *Rhodotorula glutinis*, pero en ese caso solo se habían logrado 2.5 g/L de lípidos, un 20% (en peso seco) de acumulación, y una productividad volumétrica de 0.10 g/Lh. En nuestro caso, con la cepa S1/2R de *R. graminis* se alcanzó una concentración de lípidos de 8.0 g/L lo que significó casi el 47% (en peso seco) de acumulación, aunque la productividad obtenida fue menor a lo reportado por Faife *et al.* (2011).

Los resultados demostraron que la integración de estos dos subproductos en un medio de cultivo permitió la producción lípidos saponificables a partir de la cepa *R. graminis* S1/2R con buenos rendimientos. Dado que se trata de dos subproductos industriales de producción regular, hay disponibilidad de los mismos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos subproductos provienen de zonas muy distantes por lo cual se deberían tener en cuenta los costos de transportes en la ecuación global.

*Proceso de transesterificación directa
para obtención de biodiésel a partir de
levaduras oleaginosas*

Capítulo IV

IV.1. Introducción al capítulo

El biodiésel se produce típicamente por transesterificación de triglicéridos con alcoholes de cadena corta (por ejemplo, metanol) con un catalizador alcalino o ácido (McNutt & Yang 2017). Los lípidos intracelulares de levaduras son principalmente triacilglicéridos (Subramaniam *et al.* 2010), y se consideran buenos candidatos como materia prima renovable para la producción de biodiésel. Sin embargo, actualmente la producción de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas no es económicamente viable (Ratledge & Cohen 2008). La implementación de procesos de producción rentable de biodiésel a partir de estos aceites, podría reducir el costo global y hacer que los lípidos provenientes de las levaduras oleaginosas sean competitivos frente a las materias primas utilizadas actualmente (Probst *et al.* 2016). Por estas razones es que se ha explorado un proceso alternativo de transesterificación más simple, en donde esta ocurre en un solo paso, directamente sobre la biomasa, sin una extracción previa de lípidos. Este proceso se conoce como transesterificación directa (Harrington & D'Arcy-Evans 1985). La integración de extracción y transesterificación en un paso hace que el proceso tenga menos pérdidas (Lepage y Roy 1986). Además se evita el uso de solventes para la extracción de los triglicéridos, haciendo que el proceso sea más verde en comparación al convencional en dos pasos (Lewis *et al.* 2000; Griffiths *et al.* 2010). El proceso de transesterificación directa ha sido utilizado para obtener biodiésel a partir de diferentes especies de levaduras (*Rhodotorula toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis*) (Liu & Zhao 2007; Thliveros *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015).

En este capítulo se describe el desarrollo de un proceso de transesterificación directa para obtener biodiésel, a partir de la levadura oleaginosa *R. graminis* S1/S2 (Martinez-Silveira *et al.* 2019a). En primer lugar, se seleccionó el tipo de catalizador y luego se identificaron las condiciones óptimas para la transesterificación directa, utilizando la metodología de superficie de respuesta. Una vez obtenido el biodiésel por el método optimizado, se caracterizó de acuerdo a la Normas UNIT 1100:2014 y se evaluó este método en diez especies de levaduras diferentes.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo para la optimización:

Rhodotorula graminis S1/2R (Pereyra *et al.* 2014) fue la cepa utilizada para el optimizar del método de obtención de biodiésel por transesterificación directa. La biomasa de levadura utilizada en todo el estudio se obtuvo a través del cultivo en un medio con limitación de nitrógeno descrito por Thakur *et al.* (1989) para la acumulación de lípidos intracelulares (anexo 1.5). Se colocaron 50 mL de medio Thakur en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se inocularon con 5 mL de una suspensión (turbidez = McFarland 1) preparada en agua destilada estéril a partir de cultivos en PDA incubados a 28°C durante 48 horas. El pH se ajustó a 5 y el cultivo se incubó a 28°C con agitación a 150 rpm. Luego de 5 días de incubación, se determinó el peso seco. Para ello, 2 mL de cultivo se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 minutos y fue lavado con agua destilada. El *pellet* se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se transfirieron a una placa de Petri previamente pesada. Luego de dejar secar la biomasa en estufa a 70°C durante 24 h, se dejó enfriar en desecador, y se pesaron nuevamente. Esta determinación se hizo por duplicado. El resto del cultivo fue centrifugado (7000 rpm, 7 minutos) y el *pellet* fue lavado con agua destilada estéril.

IV.2.2. Análisis y cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos:

El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se realizó por cromatografía gaseosa con un detector de ionización de llama (GC-FID) utilizando un GC 7820A de Agilent Technologies, Inc. equipado con una columna DB-225 Agilent Technologies, Inc. (20 m, 0.100 mm ID, 0.10 µm). Las condiciones de operación fueron: gas carrier N₂, 0.2 mL/min, la temperatura del puerto de inyección y del detector fue de 250°C. Se aplicó el siguiente programa de temperatura para el horno: 40°C durante 0.5 min, aumento de 25°C / min a 195°C, aumento de 3°C/min a 205°C, aumento de 8°C/min a 230°C y mantenimiento a 230°C durante 10 min. Se utilizó nonadecanoato de metilo (patrón analítico Fluka Analytical Sigma-Aldrich 1891 de nonadecanoato de metilo 74208-1G) como estándar interno en una concentración de 1.5 mg/mL. La identificación de los FAME se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con los obtenidos con un estándar (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

Aldrich 1891), analizado en las mismas condiciones de GC. Los ésteres metílicos totales se calcularon como la suma de cada área de pico individual relacionada con el área del estándar interno.

IV.2.3. Proceso de transesterificación en dos pasos para lípidos de levaduras:

Los FAMES de los lípidos intracelulares acumulados por la levadura se obtuvieron mediante un proceso en dos pasos. Este implicó la extracción de los ácidos grasos de la fracción saponificable de los lípidos intracelulares seguida de una esterificación con metanol. Para la extracción de lípidos se centrifugó 40 mL cultivo, seguido por un lavado con agua destilada. Al *pellet* obtenido se agregó 5 mL de KOH 30 % (p/v) y 5 mL de etanol 95 % (v/v). La mezcla se incubó a 70°C durante una noche. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas hasta temperatura ambiente y la materia insaponificable se extrajo mediante 2 lavados con 10 mL de hexano. El pH de la fase acuosa fue ajustado a 1 mediante el agregado HCl, y se recuperó la fracción de ácidos grasos saponificables por medio de dos lavados con 10 mL de hexano. Los lípidos saponificables recuperados fueron pesados luego de la evaporación del solvente bajo presión reducida. Para obtener los ésteres metílicos, los lípidos saponificables se re-suspendieron en 1 mL de hexano. Se transfirió una alícuota correspondiente a 20 mg de ácidos grasos a un tubo de vidrio y se evaporó el solvente. Luego, se llevó a cabo la esterificación de los ácidos grasos resultantes con metanol según lo descrito por Burja *et al.* (2007). A 20 mg de la mezcla de ácidos grasos se les agregó 3 mL de una mezcla metanol:HCl:cloroformo (10:1:1) (v/v/v), y se calentaron durante 2 horas a 90°C. Posteriormente, se añadió 1 mL de agua destilada a la mezcla y los ésteres metílicos se extrajeron en tres ciclos utilizando 2 mL de una mezcla hexano: cloroformo (4:1) (v/v). El residuo de agua de la fase orgánica que contenía los ésteres metílicos se eliminó mediante la adición de 0.5 g de Na₂SO₄ anhidro. El análisis y la cuantificación de los FAMES obtenidos se realizó según lo descrito en el punto IV.2.2.

IV.2.4. Transesterificación directa de lípidos intracelulares a partir de la biomasa seca:

Se comparó la catálisis ácida (Liu & Zhao 2007) con la básica (Thliveros *et al.* 2014) para la obtención de FAMES mediante transesterificación de los lípidos intracelulares. La biomasa fue obtenida como se describe en el punto IV.2.1. En cada caso, se pesaron

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

55 mg de la biomasa seca y se dispersaron en una solución metanólica ácida ($[H_2SO_4] = 0.2 \text{ M}$) o básica ($[NaOH] = 5 \text{ g/L}$), manteniendo la relación biomasa: metanol (1:20) p/v. La mezcla se incubó a 70°C durante 20 horas para la transesterificación con catálisis ácida (Liu & Zhao 2007) y a 50°C durante 10 horas para básica (Thliveros *et al.* 2014). Los ésteres metílicos obtenidos se extrajeron de la mezcla utilizando hexano: cloroformo (4:1) v/v según Burja *et al.* (2007) y se analizaron, como se describe en IV.2.2. La cantidad de ésteres metílicos obtenidos en ambos casos se expresó en g/g de biomasa seca y se compararon con el rendimiento obtenido por el procedimiento de dos pasos, mediante un ANOVA de una vía, y a las medias se les realizó un test HSD (*Honestly-significant-difference*) usando el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2008). Diferencias con $P < 0.05$ fueron consideradas significativas.

IV.2.5. Optimización de la concentración de catalizador, relación metanol-biomasa, temperatura y tiempo de la transesterificación ácida directa sobre biomasa seca:

La optimización del proceso de transesterificación directa a partir de biomasa de levadura se llevó a cabo utilizando dos diseños factoriales completos consecutivos. El primer factorial involucró 4 factores (concentración de catalizador, relación metanol-biomasa, temperatura y tiempo). Cada factor se examinó en dos niveles (-1 para nivel bajo y +1 para nivel alto) y en el punto central (0). El número total de experimentos fue de 19 ($2^4 + 3$), ya que se realizaron tres repeticiones del punto central. Los niveles de factores estudiados se enumeran en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1: Niveles de los factores del diseño factorial.

Factor	Nivel		
	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Concentración de catalizador $[H_2SO_4]$ (M)	0.20	0.30	0.40
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	40	55	70
Tiempo (h)	5	12.5	20
Relación metanol-biomasa (v/p)	20	30	40

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Los factores involucrados en el segundo diseño factorial fueron la concentración de catalizador (H_2SO_4), la relación metanol-biomasa y el tiempo de reacción manteniendo la temperatura en 70°C . Los niveles de estos factores utilizados en el diseño se muestran en la Tabla IV.2. En este caso, se realizaron 11 ensayos ($2^3 + 3$), incluyendo tres repeticiones del punto central. La respuesta en ambos diseños factoriales, fue la cantidad de ésteres metílicos obtenidos en cada condición, los cuales se extrajeron y cuantificaron por GC como se describe V.2.2. El diseño experimental y el análisis estadístico se realizaron utilizando el software Design Expert 10.0 (Stat Ease Inc.). Los factores con valores de p inferiores a 0.05 se consideraron que tienen efecto significativo sobre el proceso de transesterificación. Para validar el modelo computacional, se realizó una reacción en las condiciones optimizadas.

Tabla IV.2: Niveles de los factores del diseño factorial.

Factor	Nivel		
	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Concentración de catalizador [H_2SO_4] (M)	0.40	0.50	0.60
Tiempo (h)	3	5	7
Relación metanol-biomasa (v/p)	40	50	60

IV.2.6. Optimización del tiempo de reacción del método optimizado:

Las reacciones de transesterificación directa sobre la biomasa seca de levadura se realizaron (por duplicado) utilizando H_2SO_4 0.4 M, una relación metanol-biomasa de 60 y calentando a 70°C durante 1, 2, 3, 5 o 7 horas. Los resultados obtenidos se compararon mediante ANOVA de una vía y las separaciones medias se realizaron mediante pruebas de HSD. Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0.05$. Los ésteres metílicos obtenidos utilizando el tiempo óptimo de reacción se compararon con el procedimiento de dos etapas.

IV.2.7. Determinación de los perfiles de metilésteres del biodiésel obtenido por transesterificación directa y por el proceso en dos pasos:

Para determinar el perfil de FAMES del biodiésel obtenido mediante el proceso de transesterificación directa optimizado para la cepa S1/2R, se calentó a 70°C durante 3 horas la biomasa previamente seca de la levadura, en presencia de metanol en una

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

relación metanol-biomasa de 60 usando H_2SO_4 como catalizador en una concentración de 0.4 M. La obtención del biodiésel mediante el proceso en dos pasos se realizó como fue descrito en el punto IV.2.2. El análisis de los perfiles de FAMES se realizaron por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) como fue descrito en el punto IV.2.2.

IV.2.8. Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos:

El perfil de FAMES obtenido en el punto IV.2.7 fue utilizado para estimar algunas propiedades importantes del biodiésel obtenido, requeridas por la norma UNIT 1100:2014. Estas son: viscosidad (ν), densidad (ρ), número de cetano (CN), índice de yodo (IV), factor de saturación de cadena larga (LCSF), punto de taponamiento de filtro en frío (CFPP), punto de enturbiamiento (CP) y la estabilidad oxidativa (OS). Se estimaron estas propiedades fisicoquímicas de acuerdo a Caldeira *et al.* (2017). como fue descrito en el punto II.2.10.6.

IV.2.9. Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por transesterificación directa:

La determinación de glicerol libre, mono-, di- y triglicéridos se realizó de acuerdo a lo establecido en la norma UNIT 1133:2007 en el Laboratorio de la Unidad de Cereales y Oleaginosos de ALUR, como fue descrito en el punto II.2.10.7.

IV.2.10. Evaluación del método optimizado en diferentes cepas de levaduras:

Se utilizaron cepas de levaduras del cepario del laboratorio con diferentes niveles de acumulación de lípidos intracelulares. Se seleccionaron 5 cepas oleaginosas con una acumulación mayor a 20%. Las mismas fueron: *Candida glabrata* 12D aislada en este trabajo, de la región Antártica (Martinez *et al.* 2016) *Rhodotorula toruloides* An3D, *Pseudozyma hubeiensis* Py1C, *Moesziomyces* sp Bn1D y *Anthracoystis* sp. Cg2g. También se seleccionaron 5 cepas no oleaginosas, 2 con porcentaje de acumulación entre 20-15% (*Starmerella sorbosivorans* Py3E y *Candida smithsoni* Cg2D) y 3 con un porcentaje de acumulación menor a 10% (*Starmerella sorbosivorans* Mg1D, *Candida smithsoni* An2E y *Hannaella* sp An2F). Las 10 cepas fueron cultivadas en condiciones de acumulación de lípidos anteriormente descritas para para *R. graminis* S1/S2

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

(IV.2.1), a 28°C salvo para la cepa *C. glabrosa* 12D en donde la temperatura de incubación fue 25°C. Luego de 5 días de incubación, los cultivos se centrifugaron y los *pellets* se lavaron con agua destilada y se secaron a 70°C durante 24 horas. Se pesaron 55 mg de la biomasa seca de cada cepa y se determinaron los FAMES directamente sobre la biomasa mediante el proceso de transesterificación en un paso optimizado y a partir de lípidos saponificables extraídos de la biomasa por el procedimiento en dos pasos descrito en el punto IV.2.3. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Los contenidos de FAMES en g/g de biomasa seca obtenidos en ambos casos se compararon mediante un ANOVA de una vía y la separación entre las medias se realizó mediante un test de HSD. Las diferencias a $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Cultivo de *R. graminis* S1/2R:

R. graminis S1/2R fue capaz de acumular lípidos intracelulares saponificables en las condiciones de cultivo utilizadas. Los ácidos grasos correspondientes a esos lípidos representaron 0.44 ± 0.01 g por g de biomasa seca, lo que corresponde a un 44% p/p de peso seco. El resto de los experimentos fueron realizados con la misma biomasa.

IV.3.2. Comparación del proceso en 2 pasos con la transesterificación directa con catálisis básica y ácida:

Los FAMES correspondientes a los ácidos grasos de los lípidos intracelulares saponificables obtenidos mediante el proceso de dos pasos fueron 0.40 ± 0.03 g de FAMES por g de biomasa seca. En el caso de transesterificación directa con catálisis básica y ácida, la cantidad de FAMES por g de biomasa de levadura seca fue de 0.0396 ± 0.0002 y 0.26 ± 0.01 , respectivamente (Figura IV.1). El valor de FAMES obtenidos por el método en dos pasos fue significativamente mayor que los obtenidos por la transesterificación directa, y la transesterificación directa con catálisis ácida tuvo un rendimiento significativamente mayor que con catálisis básica.

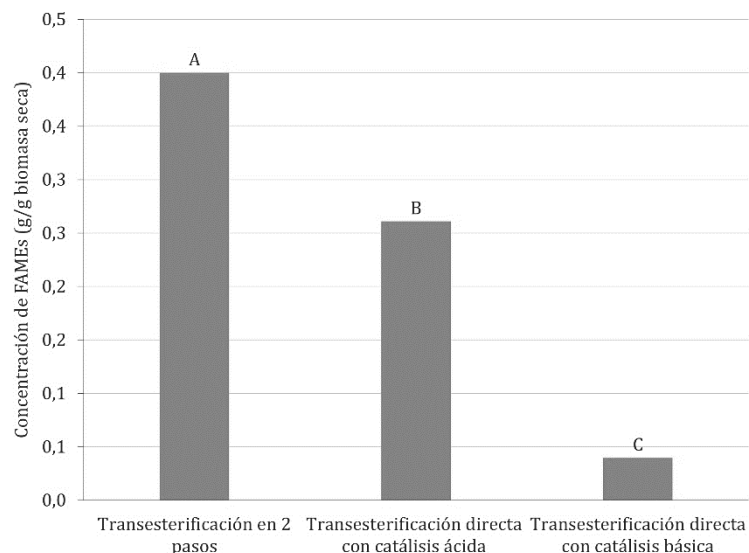


Figura IV.1: Rendimiento de FAMES por g de biomasa seca para un cultivo de la cepa S1/2R con las diferentes reacciones de transesterificación. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Tukey's HSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Tukey HSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

IV.3.3. Optimización de la transesterificación directa catalizada por ácido:

La tabla IV.3 muestra la cantidad de FAMES obtenidos en el diseño factorial 2⁴.

Tabla IV.3: Diseño matricial del diseño factorial y los valores de respuesta obtenidos de g de FAMES por g de biomasa seca

Corrida	Concentración de catalizador [H ₂ SO ₄] M (A)	Temperatura (°C) (B)	Tiempo (horas) (C)	Relación metanol-biomasa (v/p) (D)	FAMES (g/g biomasa seca)
1	0.4	70	5.0	40	0.51
2	0.2	40	5.0	40	0.35
3	0.2	70	20.0	20	0.24
4	0.4	40	20.0	40	0.26
5	0.2	70	5.0	20	0.30
6	0.2	40	20.0	40	0.25
7	0.2	70	5.0	40	0.37
8	0.3	55	12.5	30	0.25
9	0.3	55	12.5	30	0.28
10	0.2	40	20.0	20	0.18
11	0.2	40	5.0	20	0.14
12	0.4	40	5.0	40	0.15
13	0.4	70	20.0	20	0.58
14	0.4	40	5.0	20	0.16
15	0.3	55	12.5	30	0.23
16	0.4	40	20.0	20	0.16
17	0.4	70	5.0	20	0.34
18	0.2	70	20.0	40	0.28
19	0.4	70	20.0	40	0.57

Los resultados del primer diseño factorial (table IV.3) se evaluaron mediante un ANOVA y a partir de los factores significativos se generó un modelo. Estos resultados se muestran en la tabla IV.4.

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Tabla IV.4: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de FAMES en el diseño factorial

Fuente de variación	SC	gl	CM	F Valor	p-valor Prob> F	
Modelo	0.3	6	0.05	17.8	<0.0001	significativo
Concentración de catalizador (A)	0.02	1	0.02	9.0	0.01	
Temperatura (B)	0.1	1	0.1	55.4	<0.0001	
Tiempo (C)	0.0002	1	0.0002	0.9	0.4	
Relación metanol-biomasa (D)	0.03	1	0.03	10.2	0.008	
AB	0.06	1	0.06	22.6	0.0006	
AC	0.02	1	0.02	8.5	0.01	
Curvatura	0.0007	1	0.0007	2.5	0.1	
Residuo	0.03	11	0.3			
Falta de ajuste	0.03	9	0.0003	5.9	0.1	No significativo
Error	0.0001	2	0.00005			
Total	0.32	18				

Nota: .SM: suma de cuadrados; CM: Cuadrado medio; gl: grados de libertad.

El modelo propuesto resultó significativo ($F = 17.8$; $p < 0.0001$) con un R^2 de 0,888, lo que significa que este modelo puede explicar el 88,8% de la variabilidad en la respuesta. Se obtuvo un valor de R^2 ajustado de 0.831, que concuerda con el valor obtenido de R^2 predicho. Esto indica una buena relación entre los datos experimentales y los predichos por el modelo para la concentración de FAMES.

La curvatura y la falta de ajuste del modelo propuesto resultaron no significativas. Tres de los factores ensayados (temperatura, concentración de catalizador (H_2SO_4) y relación metanol-biomasa) tuvieron influencia significativa ($p > 0.05$) en la cantidad de FAMES obtenida. También resultaron significativas las interacciones entre la concentración del catalizador y la temperatura o el tiempo. Tanto la relación metanol-biomasa, la interacción entre la concentración del catalizador y la temperatura o el tiempo tuvieron un efecto positivo en la respuesta, mientras que la concentración del catalizador, la temperatura y el tiempo mostraron un efecto negativo. Sin embargo, este último factor no fue estadísticamente significativo, por lo cual se fijó en el valor mínimo del rango estudiado (5 horas) para la siguiente etapa de optimización (Tabla IV.2). La

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

figura IV.2 muestra el gráfico de Pareto que representa los factores y las interacciones involucrados en el proceso. En este gráfico puede observarse que los valores t correspondientes a la temperatura y la interacción entre la temperatura y la concentración del catalizador (H_2SO_4) exceden el límite de Bonferroni de 2.776 y, por lo tanto, tienen efecto significativo en la obtención de FAMES, y este efecto es positivo. Además, los efectos correspondientes a la concentración del catalizador, la relación metanol-biomasa y la interacción entre la concentración del catalizador y el tiempo probablemente sean significativos, ya que los valores t de sus efectos se encuentran entre el límite de Bonferroni y el valor de t (Anderson & Whitcomb 2016). Todos los factores mencionados anteriormente fueron incluidos en el modelo.

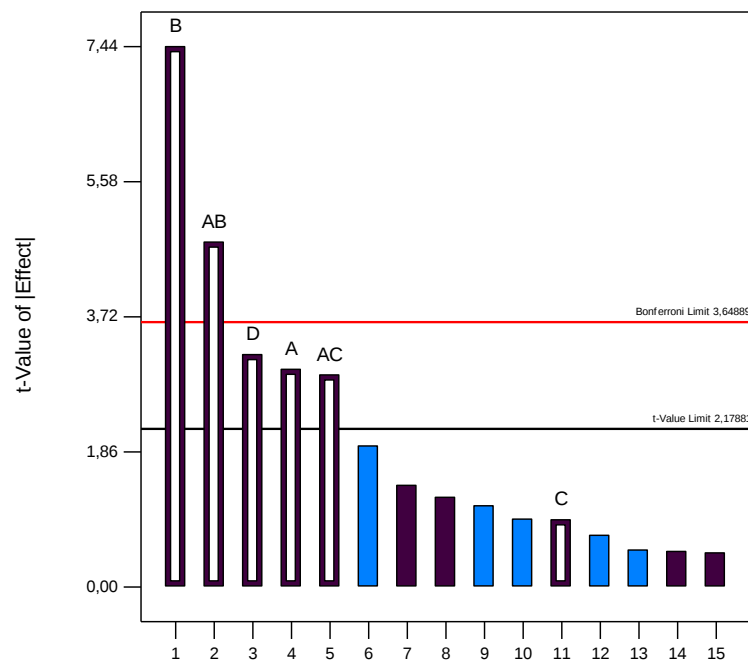


Figura IV.2: Gráfico de Pareto luego del diseño factorial, mostrando la contribución de los diferentes factores y su principal efecto en la concentración de FAMES. Las barras en color violeta tienen efecto positivo y las barras en color celeste tienen un efecto negativo. A: concentración del catalizador; B: temperatura; C: tiempo; D: relación metanol-biomasa; AB: interacción entre la concentración del catalizador y temperatura; AC: interacción entre la concentración del catalizador y tiempo.

En la figura IV.3 se muestra el gráfico de superficie de respuesta representando simultáneamente los efectos de dos variables (temperatura y concentración de catalizador) sobre la concentración de FAMES, dejando las otras variables fijas. Observando este gráfico se puede concluir que los valores más altos de FAMES se

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

logran cuando se utilizó la máxima concentración de catalizador y la temperatura más alta. Además, cuando se utilizó la mayor relación metanol-biomasa, se obtuvieron valores superiores de FAMES. Como el tiempo en el rango ensayado no tuvo un efecto significativo en la respuesta, se decidió minimizar el tiempo de reacción para tener un proceso más corto y menos costoso. Con este criterio, las condiciones optimizadas para maximizar la concentración de FAME fueron las siguientes: temperatura, 70°C; concentración de catalizador, 0.4 M; relación metanol-biomasa 40 y tiempo de reacción, 5 horas.

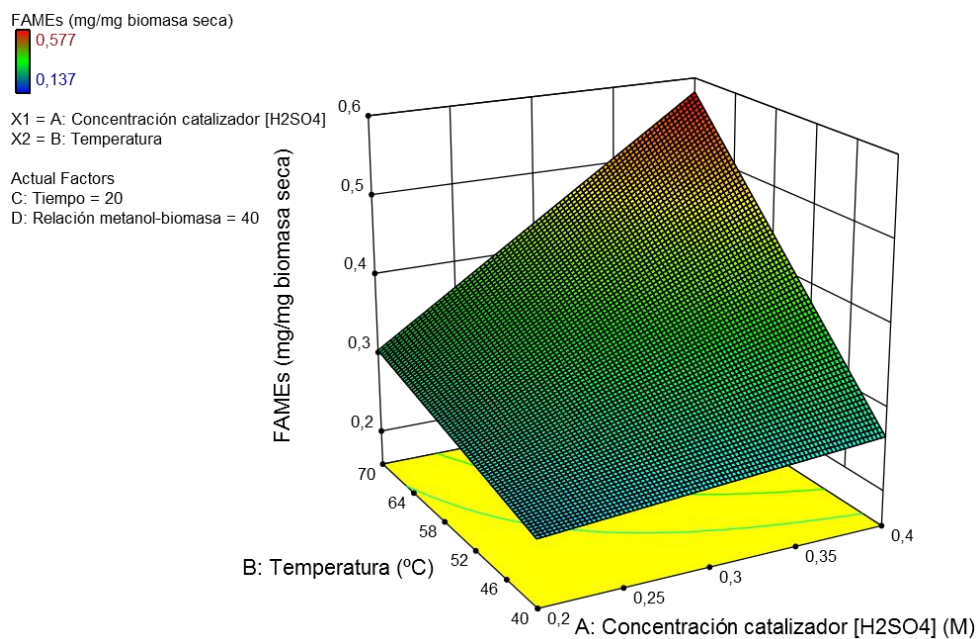


Figura IV.3: Superficie de respuesta, mostrando la relación entre concentración de FAMES, temperatura y concentración de catalizador en el rango del diseño factorial.

De acuerdo con el modelo propuesto, se lograría una concentración de FAMES teórica, para la condición optimizada, de 0.483 g/g de biomasa seca. El resultado de esta condición corresponde a una de las réplicas del factorial, por lo que podría ser comparado con el valor experimental obtenido (0.51 g de FAME por g de biomasa seca). Ese resultado valida el modelo, ya que se obtuvo una desviación de solo el 6% del valor teórico.

Para determinar el efecto de valores mayores en dos variables significativas (concentración de catalizador y relación metanol-biomasa) en la obtención de FAMES, se llevó a cabo otro diseño factorial completo de 2³. El tiempo de reacción se incluyó en

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

el modelo para determinar si tiempos menores tendrían efecto sobre la respuesta. La variable temperatura no se incluyó en el diseño para evitar problemas causados por la evaporación excesiva del metanol, dejando fijo este valor en 70°C. La Tabla V.5 se muestra la cantidad de FAMES obtenidos en los 11 experimentos del diseño factorial, los valores obtenidos estuvieron en el rango de 0.341 a 0.544 g de FAMES por g de biomasa seca.

Tabla IV.5: Diseño matricial del diseño factorial y los valores de respuesta obtenidos de g de FAMES por g de biomasa seca

Corrida	Tiempo (horas) (A)	Concentración de catalizador [H ₂ SO ₄] M (B)	Relación metanol-biomasa (v/p) (C)	FAMES (g/g biomasa seca)
1	5	0.5	50	0.45
2	7	0.4	60	0.52
3	3	0.6	40	0.34
4	7	0.4	40	0.54
5	5	0.5	50	0.44
6	5	0.5	50	0.43
7	7	0.6	60	0.45
8	3	0.4	40	0.38
9	3	0.6	60	0.42
10	7	0.6	40	0.47
11	3	0.4	60	0.54

El ANOVA que se muestra en la Tabla V.6 determinó la significancia del modelo ($F = 20.6$, $p = 0.0026$).

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Tabla IV.6: Resultado del ANOVA que muestra el efecto de los factores y sus interacciones en la concentración de FAMES en el diseño factorial

Fuente de variación	SC	gl	CM	F Valor	p-valor Prob> F	
Modelo	0.04	4	0.009	20.6	0.003	significativo
Tiempo (A)	0.01	1	0.01	23.1	0.005	
Concentración de catalizador (B)	0.01	1	0.01	25.5	0.004	
Relación metanol-biomasa (C)	0.0005	1	0.0005	10.4	0.02	
AC	0.01	1	0.01	23.2	0.005	
Curvatura	0.00007	1	0.00007	1.5	0.3	No significativo
Residuo	0.0002	5	0.00005			
Falta de ajuste	0.0002	3	0.00007	4.0	0.2	
Error	0.00003	2	0.00002			
Total	0.04	10				

Nota: SM: suma de cuadrados; CM: Cuadrado medio; gl: grados de libertad.

La falta de ajuste y la curvatura no fueron significativas con valores de p de 0.2 y 0.3, respectivamente. El R^2 obtenido de este análisis fue de 0.93, lo que indica que el modelo se ajusta bien a los valores experimentales es un buen predictor de los mismos. El grafico de Pareto obtenido en este caso se muestra en la figura IV.4. El valor t del efecto correspondiente a la relación metanol-biomasa, la concentración del catalizador, el tiempo y la interacción entre el tiempo y la relación metanol-biomasa estuvieron por encima de la línea límite del valor t, por lo que fueron considerados como factores que influyen significativamente en la concentración de FAMES. El tiempo de reacción y la relación metanol-biomasa tuvieron un efecto positivo en la respuesta, mientras que la concentración del catalizador y la interacción entre el tiempo y la relación metanol-biomasa mostraron un efecto negativo, que está indicado mediante un coeficiente positivo o negativo para cada factor en el siguiente modelo de primer orden que podría explicar la concentración de FAMES:

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Concentración de FAMES = $-0.03 + (0.1 * \text{Tiempo}) - (0.4 * \text{concentración de catalizador}) + (0.01 * \text{relación metanol-biomasa}) - (-1.8\text{E-}003 * \text{Tiempo} * \text{relación metanol-biomasa})$.

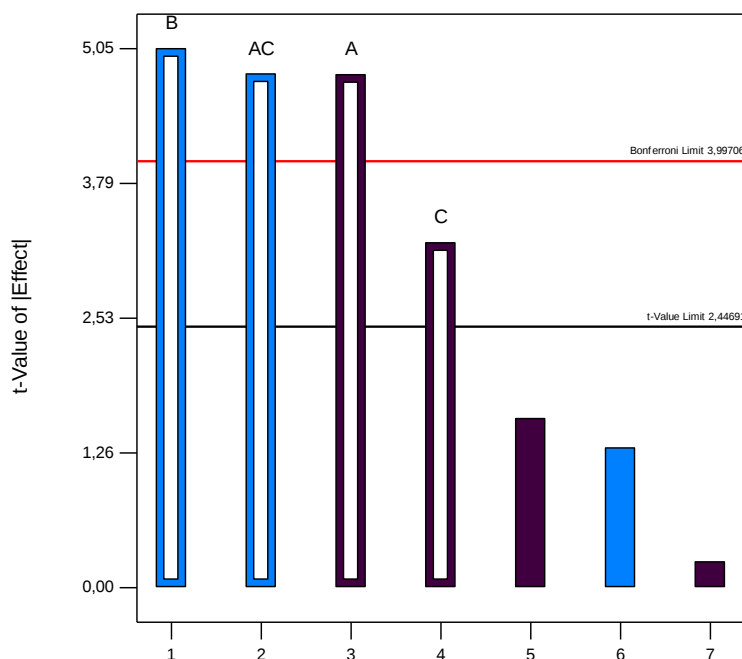


Figura IV.4: Gráfico de Pareto luego del diseño factorial, mostrando la contribución de los diferentes factores y su principal efecto en la concentración de FAMES. Las barras en color violeta tienen efecto positivo y las barras en color celeste tienen un efecto negativo. A: tiempo; B: concentración del catalizador; C: relación metanol-biomasa; AC: interacción entre el tiempo y la relación metanol-biomasa.

De acuerdo con el modelo propuesto para obtener una mayor cantidad de FAMES a partir de células de levadura seca se deduce que las condiciones del proceso son: calentamiento a 70 °C, concentración de catalizador más baja (0.4 M), la proporción más alta de metanol-biomasa (60) y el tiempo de reacción más largo (7 horas), dentro de los rangos utilizados para cada variable del diseño.

Cuando se analizó la interacción entre esos dos últimos factores (Fig. IV.5), se observó que el tiempo de reacción fue significativo solo cuando se utilizó una baja relación metanol-biomasa. En cambio, cuando se utilizó una relación de 60, el tiempo de reacción no fue significativo.

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

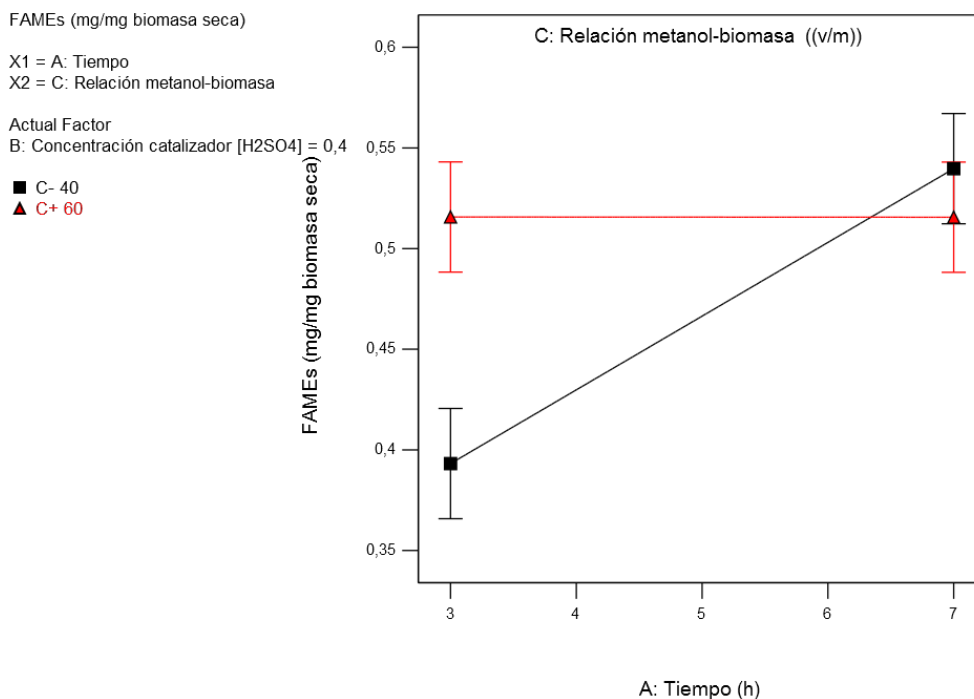


Figura IV.5: Interacción entre relación metanol biomasa con el tiempo. Concentración de catalizador 0.4M.

IV.3.4. Optimización del tiempo de reacción:

La figura IV.6 muestra los FAMES obtenidos cuando la transesterificación sobre la biomasa seca se realizó a 70°C, 0.4M de concentración de catalizador y una relación metanol-biomasa de 60 a diferentes tiempos de reacción (1, 2, 3, 5 and 7 horas). Los resultados se compararon mediante un ANOVA de una vía, y a la separación de las medias se les realizó un test de HSD. Las diferencias en $p < 0.05$ fueron consideradas significativas. Como se observa en la figura IV.6, los mayores rendimientos (0.53 ± 0.05 y 0.540 ± 0.006 g de FAMES por g de biomasa seca) fueron obtenidos con los tiempos de reacción de 3 y 5 horas respectivamente. Estos rendimientos no fueron significativamente diferentes entre sí, pero resultaron significativamente diferentes a los obtenidos con mayores y menores tiempos de reacción. Para minimizar costos y tiempo, se seleccionó el proceso de 3 horas de reacción. En las condiciones optimizadas, la cantidad de FAMES obtenido aumentó casi al doble con respecto a las condiciones iniciales. Además, se logró una importante reducción en el tiempo de reacción. Al ser comparado el rendimiento con el obtenido con el proceso de dos pasos, también se logró un aumento significativo (21%).

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

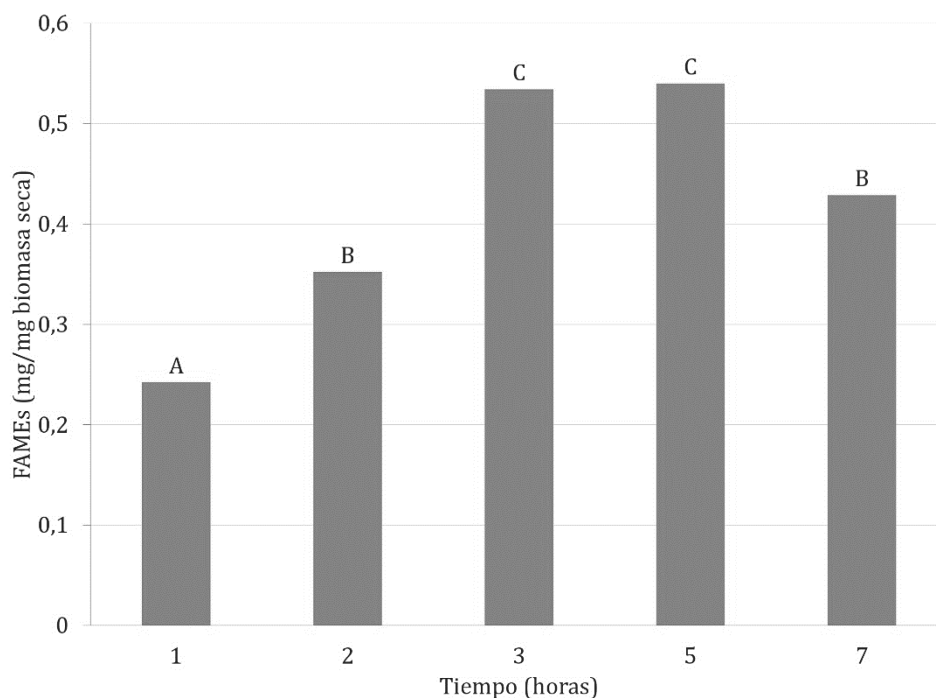


Figura IV.6: Resultados de FAMES obtenidos con una relación metanol - biomasa de 60, 0.4 M de catalizador a 70°C, con diferentes tiempos de reacción. Los datos experimentales fueron analizados por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Tukey's HSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Tukey's HSD están indicadas por diferentes letras encima de las barras.

IV.3.5. **Determinación de los perfiles de metilésteres (FAMES) del biodiésel obtenido por transesterificación directa y por el proceso en dos pasos:**

En la tabla IV.7 se presentan los perfiles de FAMES del proceso de transesterificación en dos pasos y del proceso transesterificación directa optimizado con catálisis ácida. Como se muestra en la tabla IV.7 existe diferencia significativa entre el biodiésel obtenido por el proceso en dos pasos y el proceso de transesterificación directa optimizado en el porcentaje de cada uno de los metilésteres, salvo para el metiléster correspondiente al ácido palmítico (C16:0).

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Tabla IV.7: Porcentaje e identificación de los ésteres metílicos del proceso de transesterificación en 2 pasos y el proceso de transesterificación directa optimizado.

	Transesterificación en 2 pasos	Transesterificación directa optimizada con catálisis ácida
% 14:0	(1.0 ± 0.3) ^A	(0.73 ± 0.06) ^B
% 16:0	(17 ± 3) ^A	(14.6 ± 0.4) ^A
% 16:1	(3 ± 1) ^A	(1.10 ± 0.03) ^B
% 18:0	(1.4 ± 0.1) ^B	(2.77 ± 0.06) ^A
% 18:1	(60 ± 2) ^B	(73.9 ± 0.5) ^A
% 18:2	(6.4 ± 0.3) ^A	(1.6 ± 0.3) ^B
% 18:3	(1.62 ± 0.08) ^A	(0.54 ± 0.04) ^B
% 20:0	(3 ± 1) ^A	(0.56 ± 0.02) ^B
% 24:0	(0.30 ± 0.06) ^B	(0.72 ± 0.07) ^A

Nota: Los datos experimentales de cada éster metílico identificado a los 2 procesos de transesterificación ensayados, fue analizado por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Tukey's HSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Tukey's HSD están indicadas por diferentes letras.

IV.3.6. Estimación de otras propiedades del biodiésel a partir de perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES):

En la tabla IV.8 se muestran los resultados de las propiedades fisicoquímicas del biodiésel obtenido en cada proceso. Estos valores se estimaron con fórmulas empíricas, utilizando la composición de FAMES. Al compararse estos resultados con los requisitos de la Norma UNIT 1100:2014, ambos productos cumplen con lo establecido salvo para la densidad a 20°C. La estabilidad oxidativa para el caso del biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación directa es mayor que para el proceso en dos pasos.

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

Tabla IV.8: Propiedades fisicoquímicas del biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación en dos pasos y el biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación directa optimizado

	Transesterificación en 2 pasos	Transesterificación directa con catálisis ácida optimizada	Norma UNIT 1100:2014
ν a 40°C (mm ² /s)	3.67	3.86	3.50 - 6.00
ρ a 20°C (kg/m ³)	827	844	850 - 900
IV	74	72	<120*
CN	58	58	> 45
% C18:3	1.62	0.54	< 12
LCSF (%)	5.54	4.85	
CFPP (°C)	0.93	-1.22	
CP (°C)	3.84	2.69	
OS (h)	17	57	> 8

Nota: Siendo ν : viscosidad; ρ : densidad; IV: índice de iodo; CN: número de cetano; LCSF: factor de saturación de cadena larga; CFPP: punto de taponamiento de filtro en frío; CP: punto de enturbiamiento y OS: estabilidad oxidativa. <120*: límite establecido EN 14214:2004.

IV.3.7. Determinación del contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por transesterificación directa:

El contenido de glicerol libre, mono-, di-, y triglicéridos en el biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación optimizado se muestran en la tabla IV.9 y cumple con lo establecido la Norma UNIT 1100:2014.

Tabla IV.9: Contenido de glicerol libre, glicerol total y mono-, di-, y triglicéridos del biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación directa optimizado.

	Contenido en % (m/m)	Norma UNIT 1100:2014
Contenido de glicerol libre	(0.010 ± 0.005)	<0.020 %
Contenido de glicerol total	(0.10 ± 0.02)	<0.25 %
Contenido de monoglicéridos	(0.4 ± 0.1)	<0.70 %
Contenido de diglicéridos	(0.1 ± 0.1)	<0.20 %
Contenido de triglicéridos	(0.06 ± 0.03)	<0.20 %

Capítulo IV: Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas

IV.3.8. Evaluación del método optimizado en diferentes cepas de levaduras:

Los rendimientos de FAMES obtenidos mediante el método optimizado fueron para todas las cepas, excepto para la An3D, iguales ($p \geq 0.05$) a los rendimientos obtenidos por el método en dos pasos. En el caso de la An3D se obtuvo un rendimiento de 0.22 g/g significativamente menor a 0.42 g/g obtenido por el método en dos pasos. Estos resultados se muestran en la tabla IV.10.

Tabla IV.10: g de FAMES/g de biomasa seca para las diferentes cepas obtenido mediante el proceso de transesterificación en 2 pasos y el proceso de transesterificación directa optimizado.

Cepa	g de FAMES/g biomasa seca	
	Transesterificación en 2 pasos	Transesterificación directa con catálisis ácida optimizada
12D	(0.56 ± 0.07) ^A	(0.610 ± 0.04) ^A
An3D	(0.42 ± 0.06) ^B	(0.22 ± 0.02) ^A
Py1C	(0.29 ± 0.01) ^A	(0.29 ± 0.04) ^A
Bn1D	(0.40 ± 0.02) ^A	(0.37 ± 0.02) ^A
Cg2g	(0.27 ± 0.02) ^A	(0.24 ± 0.04) ^A
Py3E	(0.148 ± 0.002) ^A	(0.13 ± 0.03) ^A
Cg2D	(0.15 ± 0.01) ^A	(0.141 ± 0.003) ^A
Mg1D	(0.10 ± 0.02) ^A	(0.090 ± 0.007) ^A
An2E	(0.11 ± 0.02) ^A	(0.11 ± 0.01) ^A
An2F	(0.061 ± 0.007) ^A	(0.05 ± 0.02) ^A

Nota: Los datos experimentales de cada porcentaje de acumulación para los 2 procesos de transesterificación ensayados, fue analizado por un ANOVA de una vía, con la comparación del test de Tukey's HSD. Las diferencias se consideraron significativas si el $p < 0.05$. Las diferencias reveladas por el test de Tukey's HSD están indicadas por diferentes letras.

IV.4. Discusión del capítulo

Se lograron establecer las condiciones óptimas para obtener biodiésel a partir de biomasa seca de la levadura oleaginosa *R. graminis* S1/2R mediante un proceso de transesterificación directa. Esta optimización fue publicada por nuestro grupo (Martinez-Silveira *et al.* 2019a). Al calentar biomasa seca de la levadura durante 3 horas a 70°C en presencia de metanol en una relación metanol-biomasa igual a 60, con H₂SO₄ como catalizador, en una concentración final de 0.4 M, se obtuvieron 0.534 g de FAMES por g de biomasa de levadura seca. Este rendimiento resultó significativamente mayor (123%) que el obtenido con el proceso en dos pasos (0.44 g/g) (extracción de lípidos seguido de transesterificación). La obtención de cantidades mayores de FAMES podría deberse a una disminución en las pérdidas por la manipulación y una mejor extracción de lípidos lograda en la optimización del proceso transesterificación directa. Estos resultados son similares a los reportados por Harrington & D'Arcy-Evans (1985) quienes obtuvieron mayores rendimientos en FAMES cuando utilizaron el proceso de transesterificación directa sobre semillas de girasol en comparación con los métodos convencionales que implican más pasos.

La obtención de biodiésel por transesterificación directa a partir de microorganismos, incluyendo algas, hongos y levaduras ha sido reportada por diferentes autores (Liu & Zhao 2007; Vicente *et al.* 2009; D'Oca *et al.* 2011; Cao *et al.* 2013; Chuck *et al.* 2014; Thliveros *et al.* 2014). La obtención de biodiésel a través de este proceso en un solo paso en microorganismos, se ha descrito tanto con catalizadores ácidos como básicos. En el caso de las levaduras, Liu & Zhao (2007) desarrollaron un proceso de transesterificación directa con catálisis ácida, utilizando la levadura *Lipomyces starkeyi*. El mismo implica el calentamiento de biomasa a 70°C durante 20 horas. En estas condiciones obtuvieron un rendimiento de FAMES del 96.8% con respecto a los lípidos saponificables en las células de la levadura. En este trabajo también se evaluó el proceso de transesterificación directa con catálisis básica y los rendimientos fueron inferiores al 20% para la misma levadura. Thliveros *et al.* (2014) reportó mayores rendimientos en FAMES (97.7%) a partir de la biomasa seca de la levadura *Rhodospiridium toruloides*, en un proceso con catálisis básica durante 10 horas a 50°C.

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

En nuestro caso, el proceso con catálisis ácida desarrollado por Liu & Zhao (2007) fue en el cual se obtuvieron rendimientos mayores en FAMES (60%). Mientras, mediante el proceso descrito por Thliveros *et al.* (2014), con catálisis básica, el rendimiento no superó el (9%) con respecto a los FAMES obtenidos a partir de los lípidos saponificables totales. Según lo reportado por Go *et al.* (2016) la eficiencia de un método con catálisis básica depende en gran medida del contenido de ácidos grasos libres (FFA) en la materia prima de partida. De hecho, normalmente no se recomienda un catalizador alcalino si la materia prima contiene más del 2% de FFA por lípidos totales debido a reacciones de saponificación que podrían interferir con el proceso de transesterificación (Lam *et al.* 2010). En la biomasa de levaduras suele encontrarse aproximadamente un 5% de ácidos grasos libres con respecto al contenido total de lípidos (Rattray *et al.* 1975). A su vez, es posible encontrar contenidos de ácidos grasos libres aún mayores si las levaduras se cosechan después de que la fuente de carbono en el medio de cultivo se ha agotado o si ha ocurrido hidrólisis de triglicéridos durante el almacenamiento de la biomasa húmeda (Go *et al.* 2016).

Seleccionado el catalizador, se realizaron dos diseños experimentales para comprender el impacto de las diferentes variables del proceso en la obtención de FAMES. Se estudiaron cuatro variables del proceso temperatura, relación metanol-biomasa, concentración de catalizador y tiempo de reacción.

De acuerdo con Chopra *et al.* (2016), un aumento en la temperatura de reacción reduce la viscosidad de los lípidos y mejora la velocidad de reacción, pero solo hasta un nivel crítico, más allá del cual se reduce el rendimiento en FAMES. En general, las reacciones de transesterificación directa con catálisis ácida se llevan a cabo a temperaturas relativamente altas, cerca o justo por encima del punto de ebullición del dador del grupo funcional alquilo (Go *et al.* 2016; Salam *et al.* 2016). En este caso está representado por metanol (el punto de ebullición es 64,7°C). Basado en el trabajo de Liu & Zhao (2007), se analizaron condiciones de temperaturas entre 40°C y 70°C. La temperatura seleccionada fue la máxima ensayada (70°C), que coincide con la temperatura utilizada por Liu & Zhao (2007).

La mejor relación de metanol-biomasa (v/p) se estableció en 60, lo que representa una relación molar de metanol-triglicéridos de 2467 calculada considerando un peso molar

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

promedio de 296 (peso molecular de oleato de metilo) para los triglicéridos en la biomasa. Esta proporción resultó más alta que la utilizada en trabajos previos con levaduras (Liu & Zhao 2007; Thliveros *et al.* 2014), pero más baja que las proporciones utilizadas en procesos de transesterificación directa con microalgas que alcanzan valores cercanos a 3400 (Salam *et al.* 2016). Este tipo de procesos normalmente requieren relaciones molares de metanol-triglicéridos de varios cientos o miles, debido a que el metanol cumple una doble función, actúa como solvente y como reactivo (donante de alquilo), a diferencia de lo que ocurre en la transesterificación convencional de aceite refinado donde generalmente con un exceso molar del doble de alcohol sobre el contenido total de ácidos grasos es suficiente (Haas & Wagner 2011; Skorupskaite *et al.* 2016). En ambos casos el metanol está en exceso, por lo cual una vez que se completa la reacción, el metanol residual deberá recuperarse para reutilizarse, ya que esto resulta esencial para minimizar los costos operativos (Wahlen *et al.* 2011).

El catalizador seleccionado para las reacciones de transesterificación directa fue el ácido sulfúrico en una concentración de 0.4 M. Este catalizador ya ha sido utilizado en procesos de transesterificación directa descritos anteriormente en concentraciones que variaron entre 2% y 4% (v/v) (Liu & Zhao 2007; Chopra *et al.* 2016). En nuestro caso, la concentración seleccionada equivale a 3.92%, lo que está de acuerdo con lo reportado por Chopra *et al.* (2016) quien obtuvo biodiésel a partir de la levadura *Pichia guilliermondii*.

En la optimización se logró una reducción significativa del tiempo de reacción de 6 y 2 horas con respecto a los procesos de transesterificación directa previamente desarrollados, por Liu & Zhao (2007) y por Chopra *et al.* (2016). A su vez, este proceso logró minimizar el tiempo de reacción con respecto a otros procesos de transesterificación directa con catálisis alcalina (Thliveros *et al.* 2014) y del método en dos pasos (Burja *et al.* 2007). El desarrollo de un proceso más corto con rendimientos similares o superiores en FAMES, es un logro importante, ya que seguramente esto tenga un efecto significativo en los costos generales de la producción de biodiésel a partir de biomasa de levadura.

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

El principal costo del proceso de transesterificación directa que se ha desarrollado aquí está asociado con el consumo energético del proceso de secado, previo a la transesterificación. Sin embargo, según Chopra *et al.* (2016), el consumo de energía asociado con el secado de biomasa sería menor que el requerido para la lisis celular si se usara la biomasa húmeda como materia prima.

El perfil de FAMES obtenido a partir de la levadura oleaginosa *R. graminis* S1/2R por el proceso de transesterificación directa y el de dos pasos fue similar, siendo los ésteres de los ácidos oleico (C 18:1) y palmítico (C 16:0) los componentes principales en ambos casos. El porcentaje de los ésteres correspondientes a los ácidos oleico (18:1), esteárico (C 18:0) y lignocérico (C 24:0) resultaron significativamente mayor en el proceso de transesterificación directa, con una concomitante reducción en la proporción de los otros ésteres.

La composición de FAMES determina en gran parte las propiedades fisicoquímicas del biodiésel por lo tanto viscosidad, estabilidad, número de cetano, índice de iodo resultaron similares entre los dos métodos y ambos cumplen con los requisitos establecidos por la norma UNIT 1100:2014. Pero el biodiésel obtenido por el método de transesterificación directa posee mejor *performance*, ya que por ejemplo la estabilidad oxidativa es 39 horas mayor que para el biodiésel obtenido por el método en dos pasos. También posee un CF y CFPP levemente menor, lo que mejoraría su desempeño a bajas temperaturas.

La composición de la mezcla de FAMES resultante cumple con la Norma UNIT 1100:2014 para biodiésel, que rige actualmente en Uruguay. Esta norma establece que el contenido de ésteres debe ser mayor a 96,5%, del éster de ácido linolénico menor a 12% y contenido de ésteres poli-insaturados (más de 4 dobles enlaces) debe ser menor a 1%.

Dentro de la Norma UNIT 1100:2014 también hay requisitos para el contenido de subproductos que pudieron quedar de la reacción de producción. Estos requisitos son: contenido de glicerol libre menos de 0.02%; contenido de monoglicéridos menor a 0.70%; contenido de diglicéridos menor a 0.20% y contenido de triglicéridos menor a 0.20%. El biodiésel obtenido por el proceso de transesterificación directa optimizado

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

a partir de la levadura *R. graminis* S1/2R también cumple con estos parámetros y por tanto, con los estándares uruguayos para biodiésel.

El método de transesterificación directa optimizado también resultó útil para obtener FAMES a partir de lípidos intracelulares de diferentes especies de levaduras tanto oleaginosas como no oleaginosas. El método definido en este trabajo podría utilizarse para el screening de diferentes microorganismos oleaginosos ya que muestra el potencial de la biomasa para convertirse en biodiésel (Thakur *et al.* 1989; Kimura *et al.* 2004; Sitepu *et al.* 2014). La mayoría de los métodos utilizados se basan en sondas para detectar y medir los lípidos intracelulares, pero la eficiencia de estos depende de que la sonda pueda atravesar la pared celular, lo que dificulta la extrapolación a diferentes especies (Pick & Rachutin-Zalogin 2012; Wong & Franz 2013; Saxena *et al.* 2014). A diferencia de estos métodos la transesterificación directa no depende de una sonda y permite cuantificar directamente el biodiésel obtenido. Dong *et al.* (2015) evaluó un método de transesterificación directa sobre 4 especies diferentes de levaduras, pero estas especies son todas oleaginosas mientras el método optimizado en este trabajo se ha probado también en levaduras no oleaginosas permitiendo discriminar unas de otras. Sin embargo, este método, como todos los demás, está sujeto a variaciones en su ejecución, por lo que solo es realmente comparable si el método está estandarizado (Hounslow *et al.* 2017).

Los procesos de transesterificación directa, también se están estudiando para obtener biodiésel a partir de semillas oleaginosas, ya que implican menos pasos que el proceso convencional. Con este tipo de procesos en un solo paso, se evitaría el costoso paso de la extracción con solventes del aceite (Kasim *et al.* 2010). De esa manera, los procesos de transesterificación directa resultan más simples y menos laboriosos. El principal inconveniente de los procesos de transesterificación directa es el uso de mayores volúmenes de metanol en comparación con los procesos convencionales. Aunque, después de la reacción, el exceso de metanol se recupera para ser reutilizado en una próxima reacción, el costo involucrado en dicho paso podría ser un obstáculo para obtener un método rentable. Por lo tanto, los costos y el consumo de energía de ambos procesos (directo y convencional) deben analizarse y compararse para determinar cuál es el más adecuado para obtener biodiésel a partir de diferentes materias primas. La

Capítulo IV: *Proceso de transesterificación directa para obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas*

reducción del consumo de energía en todo el proceso, como la reducción del tiempo de reacción, podría contribuir a lograr un equilibrio económico. Se están estudiando alternativas para reducir la cantidad de metanol en los procesos transesterificación directa, como el uso de co-solventes, con semillas oleaginosas (Zeng *et al* 2008), esto podría estudiarse para obtener biodiésel a partir de levaduras.

Conclusiones y perspectivas

Este trabajo muestra que es posible obtener biodiésel en conformidad con los criterios definidos en la Norma UNIT 1100:2014 en un solo paso a partir de biomasa seca de levaduras oleaginosas cultivadas utilizando subproductos industriales como medio de cultivo.

A su vez mediante la selección de las cepas y de las condiciones de cultivo, en especial de la temperatura, es posible modular la composición de los FAMES en el biodiésel resultante.

La selección de levaduras oleaginosas capaces de crecer en presencia de distintos subproductos industriales permite contar con distintas combinaciones de levadura/sustrato para utilizar de acuerdo a la disponibilidad de los mismos. Por ejemplo, la 12D en melaza-vinaza y la S1/S2 en glicerol o S1/S2 en glicerol-vinaza.

El método optimizado de transesterificación directa con catálisis ácida permite identificar levaduras oleaginosas y predecir las características del biodiésel a partir del análisis de su composición.

Como perspectivas de este trabajo, se plantea por un lado avanzar en el estudio de la rentabilidad y sustentabilidad del proceso de obtención de biodiésel a partir de levaduras oleaginosas y por otro estudiar la variabilidad de la composición de los subproductos utilizados en los medios de cultivo y determinar el efecto de ésta sobre el rendimiento y la calidad del producto final.



Bibliografía

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1219–1227
- Aghbashlo M, Tabatabaei M, Hosseinpour S (2018) On the exergoeconomic and exergoenvironmental evaluation and optimization of biodiésel synthesis from waste cooking oil (WCO) using a low power, high frequency ultrasonic reactor. *Energy Convers Manag* 164:385–398
- Ahmed PM, Pajot HF, de Figueroa LIC, Gusils CH (2018) Sustainable bioremediation of sugarcane vinasse using autochthonous macrofungi. *J Environ Chem Eng* 6:5177–5185
- Alvarez H, Steinbüchel A (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:367–376
- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Leonardi A, Rossi M (2010a) Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb Cell Fact* 9:73
- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Leonardi A, Rossi M (2010b) Production of Single Cell Oils by the Cold-Adapted Oleaginous Yeast *Rhodotorula glacialis* AS 4.7: Effects of the Growth Temperature and the C: N Ratio. In: *Ibic2010: 2nd International Conference on Industrial Biotechnology*. pp 109–114
- Ambat I, Srivastava V, Sillanpää M (2018) Recent advancement in biodiésel production methodologies using various feedstock: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 90:356–369
- Amorim HV de, Basso LC, Lopes ML (2009) Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. *alcohol Textb a Ref beverage, fuel Ind alcohol Ind*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Sugar-cane-juice-and-molasses%2C-beet-molasses-and-Amorim-Basso/883fbe5178d81acf7333a472fd3446ed8e702d4f>. Accessed 17 Feb 2020
- Andersen RL, Jensen KM, Mikkelsen MJ (2015) Continuous ethanol fermentation of pretreated lignocellulosic biomasses, waste biomasses, molasses and syrup using the anaerobic, thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter italicus* Pentocrobe 411. *PLoS One* 10:e0136060

- Anderson MJ, Whitcomb PJ (2016) DOE simplified: practical tools for effective experimentation. Productivity press
- Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, Guebitz GM (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiésel production. *Bioresour Technol* 99:3051–3056
- Anuar MR, Abdullah AZ (2016) Challenges in biodiésel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 58:208–223
- Arora N, Patel A, Pruthi PA, Pruthi V (2016) Boosting TAG accumulation with improved biodiésel production from novel oleaginous microalgae *Scenedesmus* sp. IITRIND2 utilizing waste sugarcane bagasse aqueous extract (SBAE). *Appl Biochem Biotechnol* 180:109–121
- Arous F, Atitallah I Ben, Nasri M, Mechichi T (2017) A sustainable use of low-cost raw substrates for biodiésel production by the oleaginous yeast *Wickerhamomyces anomalus*. *3 Biotech* 7:268
- Arous F, Frikha F, Triantaphyllidou I-E, Aggelis G, Nasri M, Mechichi T (2016) Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *J Clean Prod* 133:899–909
- Arrarte E, Garmendia G, Rossini C, Wisniewski M, Vero S (2017) Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol Control* 109:14–20
- Arshad M, Ahmed S, Zia MA, Rajoka MI (2014) Kinetics and thermodynamics of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* MLD10 using molasses. *Appl Biochem Biotechnol* 172:2455–2464
- Azam MM, Waris A, Nahar NM (2005) Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiésel in India. *Biomass and Bioenergy* 29:293–302
- Baeza M, Flores O, Alcaíno J, Cifuentes V (2019) Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats: Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. In: *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*.

- Springer, pp 253–268
- Bart JCJ, Palmeri N, Cavallaro S (2010) Biodiésel science and technology: from soil to oil. Elsevier
- Basanta R, Delgado MAG, Martínez JEC, Vázquez HM, Vázquez GB (2007) Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: Una revisión sustainable recycling of waste from sugarcane agroindustry: A review. CYTA-Journal Food 5:293–305
- Bellou S, Makri A, Sarris D, Michos K, Rentoumi P, Celik A, Papanikolaou S, Aggelis G (2014) The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by *Zygomycetes*. J Biotechnol 170:50–59
- Bento HBS, Carvalho AKF, Reis CER, De Castro HF (2020) Single cell oil production and modification for fuel and food applications: Assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. Ind Crops Prod 145:112141
- Bertoni R, Echinope V, Gaudioso R, Laureiro R, Loustaunau M, Taks J (2010) La matriz energética: una construcción social. Udelar, CSIC. ISBN/ISSN/DL 978-9974-0-0713-0
- Bhatia SK, Bhatia RK, Yang Y-H (2017) An overview of microdiesel—a sustainable future source of renewable energy. Renew Sustain Energy Rev 79:1078–1090
- Burja AM, Armenta RE, Radianingtyas H, Barrow CJ (2007) Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium sp.* ONC-T18. J Agric Food Chem 55:4795–4801
- Caldeira C, Freire F, Olivetti EA, Kirchain R (2017) Fatty acid based prediction models for biodiésel properties incorporating compositional uncertainty. Fuel 196:13–20
- Calvey CH, Su Y-K, Willis LB, McGee M, Jeffries TW (2016) Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. Bioresour Technol 200:780–788
- Cao H, Zhang Z, Wu X, Miao X (2013) Direct biodiésel production from wet microalgae

- biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through in situ transesterification. Biomed Res Int 2013: 2314-6133
- Castanha RF, Mariano AP, Morais LAS de, Scramin S, Monteiro RTR (2014) Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. Brazilian J Microbiol 45:379–387
- Cavello IA, Bezus B, Martinez A, Garmendia G, Vero S, Cavalitto S (2019) Yeasts from Tierra Del Fuego Province (Argentina): Biodiversity, Characterization and Bioprospection of Hydrolytic Enzymes. Geomicrobiol J 36: (9), 847-857
- Cazetta ML, Celligoi MAPC (2006) Study of molasses/vinasse waste ratio for single cell protein and total lipids production by. Semin Exact Technol Sci 27:3–10
- Chatzifragkou A, Makri A, Belka A, Bellou S, Mavrou M, Mastoridou M, Mystrioti P, Onjaro G, Aggelis G, Papanikolaou S (2011) Biotechnological conversions of biodiésel derived waste glycerol by yeast and fungal species. Energy 36(2), pages 1097-1108.
- Chebbi H, Leiva-Candia D, Carmona-Cabello M, Jaouani A, Dorado MP (2019) Biodiésel production from microbial oil provided by oleaginous yeasts from olive oil mill wastewater growing on industrial glycerol. Ind Crops Prod 139:111535
- Chen J, Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Drogui P (2017) Lipid production from fed-batch fermentation of crude glycerol directed by the kinetic study of batch fermentations. Fuel 209:1–9
- Chen X, Huang C, Xiong L, Chen Y, Ma L (2012) Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. Bioresour Technol 118:594–597
- Cho HU, Park JM (2018) Biodiésel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. Bioresour Technol 256:502–508
- Choi WJ (2008) Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. Recent Pat Biotechnol 2:173–180
- Chopra J, Dineshkumar R, Bhaumik M, Dhanarajan G, Kumar R, Sen R (2016) Integrated in situ transesterification for improved biodiésel production from

- oleaginous yeast: a value proposition for possible industrial implication. RSC Adv 6:70364–70373
- Chopra J, Sen R (2018) Process optimization involving critical evaluation of oxygen transfer, oxygen uptake and nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production by oleaginous yeast for biofuel application. Bioprocess Biosyst Eng 41:1103–1113
- Christofoletti CA, Escher JP, Correia JE, Marinho JFU, Fontanetti CS (2013) Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. Waste Manag 33:2752–2761
- Chuck CJ, Lou-Hing D, Dean R, Sargeant LA, Scott RJ, Jenkins RW (2014) Simultaneous microwave extraction and synthesis of fatty acid methyl ester from the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. Energy 69:446–454
- Cipolatti EP, Remedi RD, dos Santos Sá C, Rodrigues AB, Ramos JMG, Burkert CAV, Furlong EB, de Medeiros Burkert JF (2019) Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. Biocatal Agric Biotechnol 20:101208
- Coradetti ST, Pinel D, Geiselman GM, Ito M, Mondo SJ, Reilly MC, Cheng Y-F, Bauer S, Grigoriev I V, Gladden JM (2018) Functional genomics of lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Elife 7:e32110
- Cortez L, Magalhaes P, Happi J (1992) Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. Rev Bras Energ 2:111
- D'Oca MGM, Viêgas C V, Lemoes JS, Miyasaki EK, Morón-Villarreyes JA, Primel EG, Abreu PC (2011) Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. Biomass and bioenergy 35:1533–1538
- Daum G, Wagner A, Czabany T, Athenstaedt K (2007) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. Biochimie 89:243–248
- De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P, Van Broock M (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. FEMS Microbiol Ecol 59:331–341

- de la Rúa C, Caldés N, Lechón Y, Herrera I (2017) ANÁLISIS DE LOS IMPACTOS SOCIO-ECONÓMICOS DE LA PRODUCCION DE BIODIÉSEL EN URUGUAY.
https://www.miem.gub.uy/sites/default/files/05_-_aio_biodiesel_alur_version_final.pdf. Accessed 17 Feb 2020
- de Oliveira Lino FS, Basso TO, Sommer MOA (2018) A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. *Biotechnol Biofuels* 11:221
- Demirbas A (2009) Progress and recent trends in biodiésel fuels. *Energy Convers Manag* 50:14–34
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2008) InfoStat, versión 2008. Grup infostat, fca, Univ Nac córdoba, argentina 268
- Diwan B, Parkhey P, Gupta P (2018) From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. *Folia Microbiol (Praha)* 63:547–568
- Dobrowolski A, Mituła P, Rymowicz W, Mirończuk AM (2016) Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol* 207:237–243
- Dong T, Yu L, Gao D, Yu X, Miao C, Zheng Y, Lian J, Li T, Chen S (2015) Direct quantification of fatty acids in wet microalgal and yeast biomass via a rapid in situ fatty acid methyl ester derivatization approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:10237–10247
- Duarte AWF, Dayo-Owoyemi I, Nobre FS, Pagnocca FC, Chaud LCS, Pessoa A, Felipe MGA, Sette LD (2013) Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles* 17:1023–1035
- Economou CN, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas D V (2011) Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresour Technol* 102:9737–9742
- Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I, Madani M (2013) Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *J cell Mol Res* 4:68–75
- Fadel M, Zohri A-NA, Makawy M, Hsona MS, Abdel-Aziz AM (2014) Recycling of

- vinasse in ethanol fermentation and application in Egyptian distillery factories. African J Biotechnol 13:
- Faife E, Otero MA, Alvarez A, Peña MA, Melfi M, Matos ML, Kozłowski AM (2011) Microbial oil production by oleaginous yeasts on wastewaters-based medium. Int Sugar J 113:786–791
- Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Aggelis G (2008) Biochemistry and biotechnology of single cell oil. Univ Patras 38–60
- Fernández PM, Martorell MM, Blaser MG, Ruberto LAM, de Figueroa LIC, Mac Cormack WP (2017) Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. Extremophiles 21:445–457
- Filoso S, do Carmo JB, Mardegan SF, Lins SRM, Gomes TF, Martinelli LA (2015) Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. Renew Sustain Energy Rev 52:1847–1856
- Fortman JL, Chhabra S, Mukhopadhyay A, Chou H, Lee TS, Steen E, Keasling JD (2008) Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. Trends Biotechnol 26:375–381
- Gajdoš P, Nicaud J-M, Rossignol T, Čertík M (2015) Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. Appl Microbiol Biotechnol 99:8065–8074
- Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C (2012) Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. Bioresour Technol.
- Ganatsios V, Koutinas AA, Bekatorou A, Panagopoulos V, Banat IM, Terpou A, Kopsahelis N (2017) Porous cellulose as promoter of oil production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using mixed agroindustrial wastes. Bioresour Technol 244:629–634
- Garay LA, Sitepu IR, Cajka T, Chandra I, Shi S, Lin T, German JB, Fiehn O, Boundy-Mills KL (2016) Eighteen new oleaginous yeast species. J Ind Microbiol Biotechnol 43:887–900

- Gebremariam SN, Marchetti JM (2018) Economics of biodiésel production. *Energy Convers Manag* 168:74–84
- Ghanavati H, Nahvi I, Karimi K (2015) Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. *Waste Manag* 38:141–148
- Go AW, Sutanto S, Ong LK, Tran-Nguyen PL, Ismadji S, Ju Y-H (2016) Developments in in-situ (trans) esterification for biodiésel production: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 60:284–305
- Godinho VM, Gonçalves VN, Santiago IF, Figueredo HM, Vitoreli GA, Schaefer CEGR, Barbosa EC, Oliveira JG, Alves TMA, Zani CL (2015) Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles* 19:585–596
- Gomes ECQ, Godinho VM, Silva DAS, de Paula MTR, Vitoreli GA, Zani CL, Alves TMA, Junior PAS, Murta SMF, Barbosa EC (2018) Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles* 22:381–393
- González SS, Barrio E, Querol A (2007) Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J Appl Microbiol* 102:1018–1025
- Griffiths MJ, Van Hille RP, Harrison STL (2010) Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids* 45:1053–1060
- Guerreiro F, Constantino A, Lima-Costa E, Raposo S (2019) A new combined approach to improved lipid production using a strictly aerobic and oleaginous yeast. *Eng Life Sci* 19:47–56
- Haas MJ, Mcaloon AJ, Yee WC, Foglia TA (2006) A process model to estimate biodiésel production costs. *Bioresour Technol* 97:671–678
- Haas MJ, Wagner K (2011) Simplifying biodiésel production: the direct or in situ transesterification of algal biomass. *Eur J lipid Sci Technol* 113:1219–1229

- Hájek M, Skopal F (2010) Treatment of glycerol phase formed by biodiésel production. *Bioresour Technol* 101:3242–3245
- Hajjari M, Tabatabaei M, Aghbashlo M, Ghanavati H (2017) A review on the prospects of sustainable biodiésel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiésel utilization. *Renew Sustain Energy Rev* 72:445–464
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontol electron* 4:1–9
- Harrington KJ, D’Arcy-Evans C (1985) A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *J Am Oil Chem Soc* 62:1009–1013
- Hasan MM, Rahman MM (2017) Performance and emission characteristics of biodiésel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiésel production: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 74:938–948
- He J, Wu A, Chen D, Yu B, Mao X, Zheng P, Yu J, Tian G (2014) Cost-effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. *Biotechnol Biofuels* 7:43
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiésel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci* 103:11206–11210
- Hoarau J, Grondin I, Caro Y, Petit T (2018) Sugarcane distillery spent wash, a new resource for third-generation biodiésel production. *Water* 10:1623
- Hosseinzadeh-Bandbafha H, Tabatabaei M, Aghbashlo M, Khanali M, Demirbas A (2018) A comprehensive review on the environmental impacts of diesel/biodiésel additives. *Energy Convers Manag* 174:579–614
- Hounslow E, Noirel J, Gilmour DJ, Wright PC (2017) Lipid quantification techniques for screening oleaginous species of microalgae for biofuel production. *Eur J lipid Sci Technol* 119:1500469
- Huang C, Chen X, Xiong L, Yang X, Ma L, Chen Y (2013) Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*.

- Biomass and bioenergy 49:273–278
- International Agency Renewable Energy (2019) ADVANCED BIOFUELS What holds them back ? Abu Dhabi. https://www.irena.org/-/media/Files/IRENA/Agency/Publication/2019/Nov/IRENA_Advanced-biofuels_2019.pdf. Accessed 17 Feb 2020
- Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH (2001) Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36:1283–1287
- Iyer R (2013) Comments on a Method for Estimating Cloud Point and Cold Filter Plugging Point of Microalgal Oil Fatty Acid Methyl Esters. *J Am Oil Chem Soc* 90:1569–1576
- Jiménez AM, Borja R, Martín A (2004) A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. *Biochem Eng J* 18:121–132
- Juanssilfero AB, Kahar P, Amza RL, Miyamoto N, Otsuka H, Matsumoto H, Kihira C, Thontowi A, Ogino C, Prasetya B (2018) Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *J Biosci Bioeng* 125:695–702
- Kanti A, Sukara E, Latifah K, Sukarno N, Boundy-Mills K (2013) Indonesian oleaginous yeasts isolated from Piper betle and P. nigrum. *Res Artic* 4:1015
- Karamerou EE, Theodoropoulos C, Webb C (2016) A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy* 89:113–122
- Kasim FH, Harvey AP, Zakaria R (2010) Biodiésel production by in situ transesterification. *Biofuels* 1:355–365
- Kavšček M, Bhutada G, Madl T, Natter K (2015) Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Syst Biol* 9:72
- Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y (2004) Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *J Microbiol Methods* 56:331–338

- Kitcha S, Cheirsilp B (2013) Enhancing lipid production from crude glycerol by newly isolated oleaginous yeasts: strain selection, process optimization, and fed-batch strategy. *Bioenergy Res* 6:300–310
- Kıvanç M, Yapıcı E (2015) Kefir as a probiotic dairy beverage: determination lactic acid bacteria and yeast. *Int J Food Eng* 1:55–60
- Knothe G (2008) “Designer” biodiésel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy & Fuels* 22:1358–1364
- Knothe G (2005) Dependence of biodiésel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol* 86:1059–1070
- Knothe G, Razon L (2017) Biodiésel fuels. *Prog Energy Combust Sci* 58:36–59
- Komagata K, Nakase T (1965) New species of the genus *Candida* isolated from frozen foods. *J Gen Appl Microbiol* 11:255–267
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874
- Kumar SV, Kumutha K, Krishnan PS, Gopal H (2010) Influence of nitrogen on lipid and biomass production by oleaginous yeast cultures. *Asian J Bio Sci* 5:87–91
- Kumar Tiwari A, Kumar A, Raheman H (2007) Biodiésel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331–371
- Lado MI (2017) *La incorporación de biodiésel a la matriz energética uruguaya : una mirada desde la sustentabilidad*. Universidad de la Republica
- Lakowicz JR (2013) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media
- Lam MK, Lee KT, Mohamed AR (2010) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to

- biodiésel: a review. *Biotechnol Adv* 28:500–518
- Lazar Z, Liu N, Stephanopoulos G (2018) Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol* 36:1157–1170
- Lewis T, Nichols PD, McMeekin TA (2000) Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J Microbiol Methods* 43:107–116
- Li SL, Lin Q, Li XR, Xu H, Yang YX, Qiao DR, Cao Y (2012) Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. *Brazilian J Microbiol* 43:627–634
- Li YH, Liu B, Zhao ZB, Bai FW (2006) Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin J Biotechnol* 22:650–656
- Liang Y, Cui Y, Trushenski J, Blackburn JW (2010) Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresour Technol* 101:7581–7586
- Liu B, Zhao Z (2007) Biodiésel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol Int Res Process Environ Clean Technol* 82:775–780
- Ma F, Hanna MA (1999) Biodiésel production: A review. *Bioresour. Technol.*
- Madani M, Enshaeieh M, Abdoli A (2017) Single cell oil and its application for biodiésel production. *Process Saf Environ Prot* 111:747–756
- Mahmudul HM, Hagos FY, Mamat R, Adam AA, Ishak WFW, Alenezi R (2017) Production, characterization and performance of biodiésel as an alternative fuel in diesel engines–A review. *Renew Sustain Energy Rev* 72:497–509
- Makkar R, Cameotra S (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:428–434
- Martinez-Silveira A, Villarreal R, Garmendia G, Rufo C, Vero S (2019a) Process conditions for a rapid in situ transesterification for biodiésel production from oleaginous yeasts. *Electron J Biotechnol* 38:1–9
- Martinez-Silveira A, Pereyra V, Garmendia G, Rufo C, Vero S (2019b) Optimization of

- culture conditions of *Rhodotorula graminis* S1/2R to obtain saponifiable lipids for the production of second-generation biodiésel. *Environ Sustain* 1–10
- Martinez A, Cavello I, Garmendia G, Rufo C, Cavalitto S, Vero S (2016) Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20:759–769
- McNichol J, MacDougall KM, Melanson JE, McGinn PJ (2012) Suitability of soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. *Lipids* 47:195–207
- McNutt J, Yang J (2017) Utilization of the residual glycerol from biodiésel production for renewable energy generation. *Renew Sustain Energy Rev* 71:63–76
- Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G (1996) High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:575–579
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiésel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energy* 34:1–5
- Milano J, Ong HC, Masjuki HH, Chong WT, Lam MK, Loh PK, Vellayan V (2016) Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew Sustain Energy Rev* 58:180–197
- Ministerio de Industria Energía y Minería (MIEM) Balance Energético Nacional. <https://ben.miem.gub.uy/>. Accessed 17 Feb 2020
- Montalbo-Lomboy M, Kantekin MN, Wang T (2014) Lipid Estimation of Surfactant-Extracted Microalgae Oil Using Nile Red. *J Am Oil Chem Soc* 91:665–680
- Monteiro MR, Kugelmeier CL, Pinheiro RS, Batalha MO, da Silva César A (2018) Glycerol from biodiésel production: Technological paths for sustainability. *Renew Sustain Energy Rev* 88:109–122
- Moustogianni A, Bellou S, Triantaphyllidou I, Aggelis G (2015) Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. *Biotechnol Bioeng* 112:827–831
- Müllner H, Daum G (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim*

Pol 51:323–347

- Murdock HE, Gibb D, André T, Appavou F, Brown A, Epp B, Kondev B, McCrone A, Musolino E, Ranalder L (2019) Renewables 2019 Global Status Report
- Nair RB, Taherzadeh MJ (2016) Valorization of sugar-to-ethanol process waste vinasse: a novel biorefinery approach using edible ascomycetes filamentous fungi. *Bioresour Technol* 221:469–476
- Navarro AR, Sepúlveda M del C, Rubio MC (2000) Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Manag* 20:581–585
- Nitayavardhana S, Issarapayup K, Pavasant P, Khanal SK (2013) Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. *Bioresour Technol* 133:301–306
- Oliva-Neto P de, Dorta C, Carvalho AFA, Lima VMG de, Silva DF da (2013) The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation—yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. *Mater Process Energy Commun Curr Res Technol Dev* 1:371–379
- Ortiz ME, Fornaguera MJ, Raya RR, Mozzi F (2012) *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:991–999
- Otero-Rambla MA, García R, Pérez MC, Martínez JA, Vasallo MC, Saura G, Bello D (2009) Producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos-melazas de caña de azúcar. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar* 43:17–22
- Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ (2009) Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technol Biotechnol* 47:215–220
- Papanikolaou S, Aggelis G (2011a) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1031–1051
- Papanikolaou S, Aggelis G (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresour Technol* 82:43–49

- Papanikolaou S, Aggelis G (2011b) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur.J. Lipid. Sci. Tech.*, 113(8), 1052-1073
- Papanikolaou S, Diamantopoulou P, Chatzifragkou A, Philippoussis A, Aggelis G (2010) Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy & Fuels* 24:4078–4086
- Patel A, Arora N, Mehtani J, Pruthi V, Pruthi PA (2017) Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 77:604–616
- Patel A, Matsakas L (2019) A comparative study on de novo and ex novo lipid fermentation by oleaginous yeast using glucose and sonicated waste cooking oil. *Ultrason Sonochem* 52:364–374
- Pereyra V, Martinez A, Rufo C, Vero S (2014) Oleaginous Yeasts from Uruguay and Antarctica as Renewable Raw Material for Biodiesel Production. *Am J Biosci* 2:251
- Perugorri M (2011) Estado del arte y novedades de la bioenergía en el Uruguay. e-libro, Corp. <http://www.fao.org/3/a-as413s.pdf>. Accessed 17 Feb 2020
- Peterson SW, Pérez J, Vega FE, Infante F (2003) *Penicillium brocae*, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. *Mycologia* 95:141–147
- Pick U, Rachutin-Zalogin T (2012) Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *J Microbiol Methods* 88:189–196
- Probst K V., Schulte LR, Durrett TP, Rezac ME, Vadlani P V. (2016) Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils
- Pyle DJ, Garcia RA, Wen Z (2008) Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)-Rich Algae from Biodiesel-Derived Crude Glycerol: Effects of Impurities on DHA Production and Algal Biomass Composition. *J Agric Food Chem* 56:3933–3939
- Qi B, Luo J, Wan Y (2018) Chemical Conversion of Molasses for Production of Levulinic Acid and Hydroxymethylfurfural. *Res Adv Env Sci* 1:22–26
- Qin L, Liu L, Zeng A-P, Wei D (2017) From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour Technol* 245:1507–1519

- Rahim A, Hafiz M, Hasan H, Lim EJ, Samrani PK, Abbas A (2019) Pretreatment Strategies to Improve Crude Glycerol Utilisation and Metabolite Production by *Aspergillus terreus*. *Int J Chem Eng* 2019:
- Raimondi S, Rossi M, Leonardi A, Bianchi MM, Rinaldi T, Amaretti A (2014) Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. *Microb Cell Fact* 13:83
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiésel properties. *Bioresour Technol* 100:261–268
- Raschke D, Knorr D (2009) Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. *J Microbiol Methods* 79:178–183
- Ratledge C, Cohen Z (2008) Microbial and algal oils: do they have a future for biodiésel or as commodity oils? *Lipid Technol* 20:155–160
- Ratledge C, Cohen Z (2005) Single cell oils. AOCS Press Champaign, Illinois
- Ratledge C, Wynn JP (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 51:1–52
- Rattray JB, Schibeci A, Kidby DK (1975) Lipids of yeasts. *Bacteriol Rev* 39:197
- Reis CER, Carvalho AKF, Bento HBS, de Castro HF (2019) Integration of microbial biodiésel and bioethanol industries through utilization of vinasse as substrate for oleaginous fungi. *Bioresour Technol Reports* 6:46–53
- Robertiello A, Angelini L, D’Addario E (1982) Upgrading of agricultural and agro-industrial wastes: the desalification of concentrated beet vinasses. *Agric Wastes* 4:397–405
- Rocha MH, Lora EES, Venturini OJ (2007) Life cycle analysis of different alternatives for the treatment and disposal of ethanol vinasse. In: *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* pp 108–114
- Rodrigues Reis CE, Hu B (2017) Vinasse from sugarcane ethanol production: better treatment or better utilization? *Front Energy Res* 5:7

- Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM, Matteuzzi D (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 69:363–372
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T (2011) Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiésel production. *Biotechnol Bioprocess Eng* 16:23–33
- Sakthivel R, Ramesh K, Purnachandran R, Shameer PM (2018) A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiésels. *Renew Sustain Energy Rev* 82:2970–2992
- Salam KA, Velasquez-Orta SB, Harvey AP (2016) Kinetics of fast alkali reactive extraction/in situ transesterification of *Chlorella vulgaris* that identifies process conditions for a significant enhanced rate and water tolerance. *Fuel Process Technol* 144:212–219
- Sanford SD, White JM, Shah PS, Wee C, Valverde MA, Meier GR (2009) Feedstock and biodiésel characteristics report. *Renew Energy Gr* 416:1–136
- Saxena R, Shrivastava S, Haldar S, Klymchenko AS, Chattopadhyay A (2014) Location, dynamics and solvent relaxation of a Nile red-based phase-sensitive fluorescent membrane probe. *Chem Phys Lipids* 183:1–8
- Schena L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen L, Nigro F, Droby S (1999) Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol Technol* 17:189–199
- Schulze I, Hansen S, Großhans S, Rudszuck T, Ochsenreither K, Syldatk C, Neumann A (2014) Characterization of newly isolated oleaginous yeasts-*Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express* 4:24
- Scoma A, Coma M, Kerckhof F-M, Boon N, Rabaey K (2017) Efficient molasses fermentation under high salinity by inocula of marine and terrestrial origin. *Biotechnol Biofuels* 10:23
- Sha Q (2013) A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid

accumulating capacity

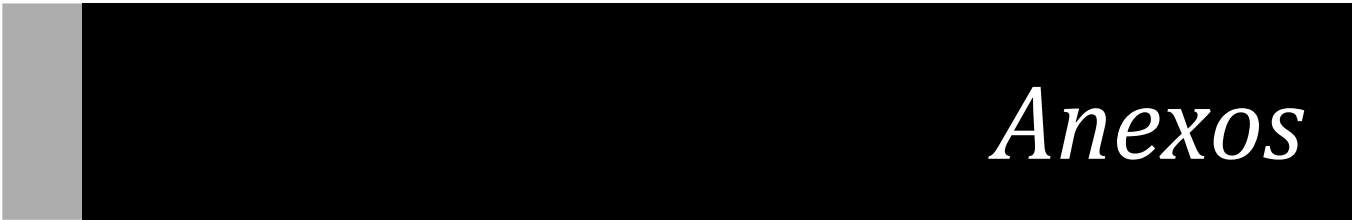
- Shapaval V, Brandenburg J, Blomqvist J, Tafintseva V, Passoth V, Sandgren M, Kohler A (2019) Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy. *Biotechnol Biofuels* 12:140
- Sharma M, Patel SN, Lata K, Singh U, Krishania M, Sangwan RS, Singh SP (2016) A novel approach of integrated bioprocessing of cane molasses for production of prebiotic and functional bioproducts. *Bioresour Technol* 219:311–318
- Shen Q, Lin H, Wang Q, Fan X, Yang Y, Zhao Y (2015) Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of *Trichosporon fermentans* in high-density molasses fermentation. *Bioresour Technol* 176:249–256
- Shields-Menard SA, Amirsadeghi M, French WT, Boopathy R (2018) A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresour Technol* 259:451–460
- Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB, Boundy-Mills KL (2014) Oleaginous yeasts for biodiésel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnol. Adv.* 32:1336–1360
- Sitepu IR, Ignatia L, Franz AK, Wong DM, Faulina SA, Tsui M, Kanti A, Boundy-Mills K (2012) An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J Microbiol Methods* 91:321–328
- Skorupskaite V, Makareviciene V, Gumbyte M (2016) Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiésel fuel production from microalgae: a review. *Fuel Process Technol* 150:78–87
- Souza KST, Ramos CL, Schwan RF, Dias DR (2017) Lipid production by yeasts grown on crude glycerol from biodiésel industry. *Prep Biochem Biotechnol* 47:357–363
- Spedding G, Harrison NR, Ganske F, Dell EJ (2012) A new way to test the free amino nitrogen content in alcoholic beverages with the SPECTROstar Nano. *BMG Labtech* 5:1–2
- Standard E (2004) European Standard EN 14214 (2004) Automotive fuels—fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines—requirements and test methods
- Strati IF, Oreopoulou V (2014) Recovery of carotenoids from tomato processing by-

- products—a review. *Food Res Int* 65:311–321
- Subramaniam R, Dufreche S, Zappi M, Bajpai R (2010) Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:1271–1287
- Suutari M, Priha P, Laakso S (1993) Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by *Lipomyces starkeyi*. *J Am Oil Chem Soc* 70:891–894
- Tao L, Aden A (2009) The economics of current and future biofuels. *Vitr Cell Dev Biol* 45:199–217
- Thakur MS, Prapulla SG, Karanth NG (1989) Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B. *Enzyme Microb Technol* 11:252–254
- Thliveros P, Kiran EU, Webb C (2014) Microbial biodiésel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresour Technol* 157:181–187
- Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B, Watson K (2010) Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles* 14:47–59
- Uçkun Kiran E, Trzcinski A, Webb C (2013) Microbial oil produced from biodiésel by-products could enhance overall production. *Bioresour Technol*.
- UNIT 1100:2014 (2014) UNIT 1100:2014: Biodiésel (b100). Combustible para uso puro o en mezcla con destilados medios de petróleo - requisitos. Montevideo
- UNIT 1133:2009 (2009) Biodiésel b (100). Determinación de los contenidos de glicerol libre, mono-, di-, y trigliceridos y cálculo de glicerol total.
- Uprety BK, Dalli SS, Rakshit SK (2017) Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Convers Manag* 135:117–128
- Valeiro A, Portocarrero R, Ullivarri E, Vallejo J, Famaillá I-E (2017) Los residuos de la Industria Sucro-alcoholera Argentina. *EEA INTA* 3–9

- Van Gerpen J (2005) Biodiésel processing and production. *Fuel Process Technol.*
- Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA (2019) Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiésel to surf boards, a wide range of “green” applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:3651–3667
- Vicente G, Bautista LF, Rodríguez R, Gutiérrez FJ, Sádaba I, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S, Garre V (2009) Biodiésel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J* 48:22–27
- Vieira JPF, Ienczak JL, Costa PS, Rossell CE V, Franco TT, Pradella JGC (2016) Single cell oil production integrated to a sugarcane-mill: conceptual design, process specifications and economic analysis using molasses as raw material. *Ind Crops Prod* 89:478–485
- Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M (2018) Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC Microbiol* 18:66
- Vivek N, Sindhu R, Madhavan A, Anju AJ, Castro E, Faraco V, Pandey A, Binod P (2017) Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiésel industry generated crude glycerol as a substrate—metabolic aspects, challenges and possibilities: an overview. *Bioresour Technol* 239:507–517
- Vorapreeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K (2012) Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology* 158:217–228
- Wahlen BD, Willis RM, Seefeldt LC (2011) Biodiésel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresour Technol* 102:2724–2730
- Walter A, Dolzan P, Quilodrán O, de Oliveira JG, Da Silva C, Piacente F, Segerstedt A (2011) Sustainability assessment of bio-ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. *Energy Policy* 39:5703–5716
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of

- fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc a Guid to methods Appl* 18:315–322
- Wild R, Patil S, Popović M, Zappi M, Dufreche S, Bajpai R (2010) Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technol Biotechnol* 48:329–335
- Wong DM, Franz AK (2013) A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. *J Microbiol Methods* 95:122–128
- Wu H, Miao X (2014) Biodiésel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresour Technol* 170:421–427
- Wynn JP, Ratledge C (2005) Oils from microorganisms. *Bailey's Ind Oil Fat Prod*
- Xia J, Xu Z, Xu H, Liang J, Li S, Feng X (2014) Economical production of poly (ϵ -l-lysine) and poly (l-diaminopropionic acid) using cane molasses and hydrolysate of streptomyces cells by *Streptomyces albulus* PD-1. *Bioresour Technol* 164:241–247
- Yang F, Hanna MA, Sun R (2012) Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiésel production. *Biotechnol Biofuels* 5:13
- Yang X, Wang K, Wang H, Zhang J, Mao Z (2016) Ethanol fermentation characteristics of recycled water by *Saccharomyces cerevisiae* in an integrated ethanol-methane fermentation process. *Bioresour Technol* 220:609–614
- Yarzabal LA (2016) Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. In: *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*. Springer, pp 83–118
- Yousuf A, Sannino F, Addorisio V, Pirozzi D (2010) Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiésel production. *J Agric Food Chem* 58:8630–8635
- Zhao X, Kong X, Hua Y, Feng B, Zhao Z (Kent) (2008) Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur J Lipid Sci Technol* 110:405–412

Zlatanov M, Pavlova K, Grigorova D (2001) Lipid composition of some yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiol (Praha)* 46:402–406



Anexos

1. Composición de medios de cultivo:

1.1. Dicloran Rosa Bengala Agar (DCRBA) (Difco™)

Fórmula por litro

Proteosa Peptona No. 3.....	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Fosfato monopotásico.....	1.0 g
Sulfato de magnesio.....	0.5 g
Dicloran.....	2.0 mg
Rosa Bengala.....	25.0 mg
Agar.....	15.0 g
pH = 7.0 ± 0.2	

1.2. Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco™)

Fórmula por litro

Fuente de nitrógeno

Sulfato de amonio.....	5.0 g
------------------------	-------

Aminoácidos

Monohidrocloreto de L-Histidina.....	10.0 mg
LD-Metionina.....	20.0 mg
LD-Triptofano.....	20.0 mg

Vitaminas

Biotina.....	2.0 µg
Pantotenato de calcio.....	400.0 µg
Ácido Fólico.....	2.0 µg
Inositol.....	2.0 mg
Niacina	400.0 µg
Ácido p-Aminobenzoico.....	200.0 µg
Hidrocloreto de piridoxina.....	400.0 µg
Riboflavina.....	200.0 µg
Hidrocloreto de Tiamina	400.0 µg

Compuestos suplantando elementos traza

Acido bórico	500.0 µg
--------------------	----------

Sulfato de cobre.....	40.0 µg
Yoduro de Potasio.....	100.0 µg
Cloruro Férrico.....	200.0 µg
Sulfato de manganeso	400.0 µg
Molibdato de sodio.....	200.0 µg
Sulfato de Zinc.....	400.0 µg

Sales

Fosfato monopotásico.....	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de Sodio.....	0.1 g
Cloruro de Calcio	0.1 g
pH = 7.0 ± 0.2	

1.3. Potato Dextrosa Agar (PDA) (Difco™)

Fórmula por litro

Almidón de papa (de infusión)	4.0 g
Glucosa	20.0 g
Agar.....	15.0 g
pH = 7.0 ± 0.2	

1.4. Brain Heart (BHI)

Fórmula por litro

Infusión de cerebro y corazón de (sólidos).....	8.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Digerido pancreático de caseína.....	16.0 g
Cloruro de Sodio.....	5.0 g
Glucosa	2.0g
Fosfato disódico	2.5 g
Agar	13.5 g
pH = 7.4 ± 0.2	

1.5. Medio Thakur

Fórmula por litro

Glucosa40.0 g

Fosfato monopotásico..... 0.75 g

Extracto de levadura.....1.5 g

Nitrato de amonio.....0.285 g

Cloruro de calcio.....0.4 g

Sulfato de magnesio..... 0.4 g

pH = 5.0 ± 0.2

1.6. Medio Tko (optimizado por Msc. Pereyra)

Fórmula por litro

Glicerol 40.0 g

Fosfato monopotásico..... 0.75 g

Extracto de levadura.....1.12 g

Nitrato de amonio.....0.774 g

Sulfato de magnesio...0.11 g

pH = 6.0 ± 0.2

2. Buffers y reactivos:**2.1. Buffer de lisis – Extracción de ADN**

Fórmula por litro

Triton X-10018.7 mL

SDS.....9.9 mL

NaCl5.84 g

Tris pH 81.21g

EDTA.....0.29 g

2.2. Reactivo coloreado de ninhidrina

Fórmula por litro

Na₂HPO₄·2H₂O.....50.0 gKH₂PO₄.....60.0 g

Ninhydrina.....5.0 g

Fructosa.....3.0 g

Conservar a 4°C, máximo 2 semanas.

2.3. Solución diluyente (FAN)

KIO₃.....2.0 g
 Etanol 96%.....400 mL
 Agua.....600 mL
 Conservar a temperatura ambiente.

2.4. Solución stock de estándar de glicina

Glicina.....107.2mg
 Disolver en 100 mL de agua destilada en matraz aforado.
 Conservar a 4°C.

3. Caracterización de subproductos:

3.1. Determinación de la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en la melaza y vinaza de caña de azúcar utilizada:

Para la determinación de los diferentes azúcares en la melaza y en la muestra de vinaza se realizaron curvas de calibración para sacarosa, fructosa y glucosa con diferentes concentraciones (0.125; 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 g/L). Estas curvas se realizaron por duplicado. Se obtuvieron las curvas de calibración de sacarosa ($y = 266242x + 28607$ con un $R^2 = 0.9996$) (figura 3.1.1), glucosa ($y = 322989x + 15095$ con un $R^2 = 0.9998$) (figura 3.1.2), y fructosa ($y = 325514x + 9703$ con un $R^2 = 0.9999$) (figura 3.1.3). Donde “y” es el área obtenida en el cromatograma y “x” es la concentración del azúcar en g/L.

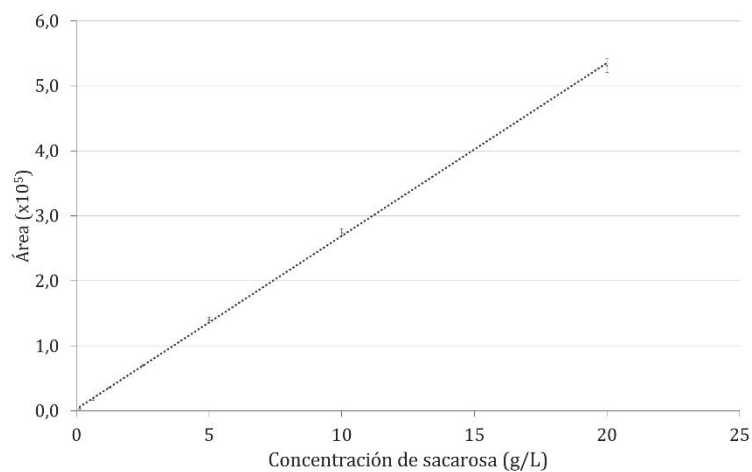


Figura 3.1.1: Curva de calibración de sacarosa obtenida por HPLC. Las condiciones operativas utilizadas fueron: fase móvil 0.1% H_3PO_4 en agua miliq con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 30°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).

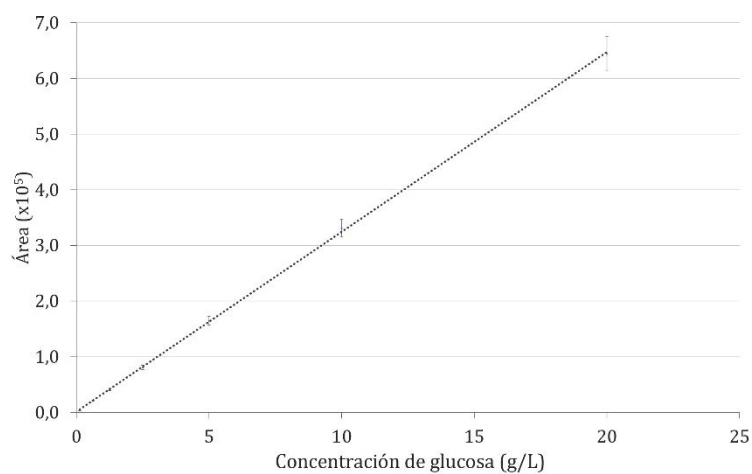


Figura 3.1.2: Curva de calibración de glucosa obtenida por HPLC. Las condiciones operativas utilizadas fueron: fase móvil 0.1% H_3PO_4 en agua miliq con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 30°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).

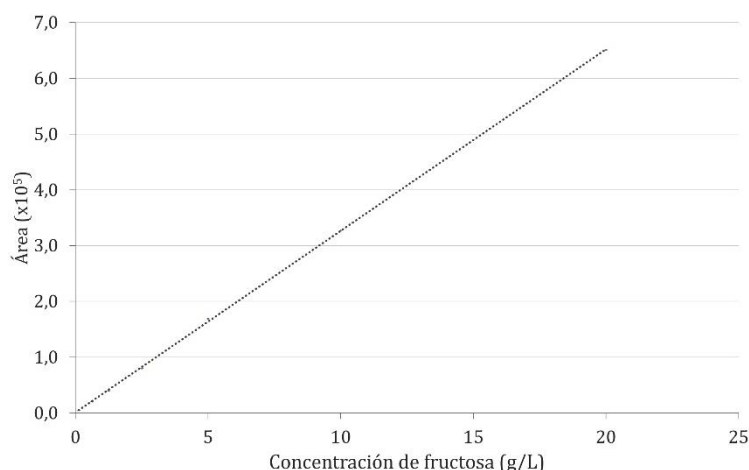


Figura 3.1.3: Curva de calibración de fructosa obtenida por HPLC. Las condiciones operativas utilizadas fueron: fase móvil 0.1% H_3PO_4 en agua miliq con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 30°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).

En la figura 3.1.4 se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra de melaza 1%.

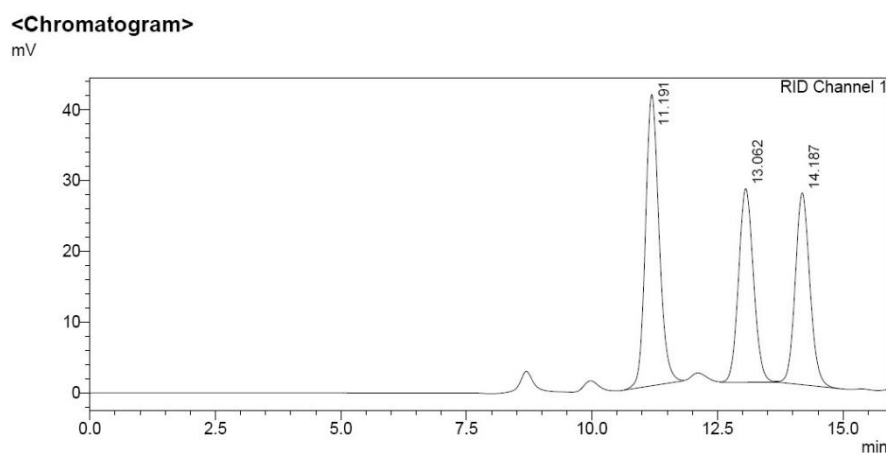


Figura 3.1.4: Cromatograma obtenido por HPLC de una muestra de melaza al 1%. Las condiciones operativas utilizadas fueron: fase móvil 0.1% H_3PO_4 en agua miliq con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura de la columna fue de 30°C.

En la figura II.2 se observa los picos correspondientes a la sacarosa (tiempo de retención 11.191); glucosa (tiempo de retención 13.062) y fructosa (tiempo de retención 14.187) de la muestra de melaza. En las condiciones utilizadas se logró una buena separación de los picos correspondientes a los tres azúcares. En el caso de la melaza las concentraciones obtenidas fueron: sacarosa (286 ± 10) g/L, glucosa (164 ± 13) g/L y fructosa (166 ± 14) g/L. Para el caso de la vinaza, no se

detectaron picos en los tiempos de retención esperados, por lo tanto, la concentración de estos azúcares en este subproducto fue menor al límite de cuantificación del método (0.125 g/L).

3.2. Determinación de la concentración de nitrógeno como amino libre en la melaza y vinaza de caña de azúcar utilizada:

La determinación del contenido de nitrógeno de los subproductos se determinó midiendo el contenido de amino libre por un método colorimétrico. Para poder realizar esta determinación se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de nitrógeno (0, 1, 2 y 4 mgN/L), la misma se realizó por triplicado (figura 3.2.1). La curva obtenida fue: $y = 0.197x - 0.0133$ con un $R^2 = 0.9987$ donde “y” es la absorbancia neta y “x” es la concentración de nitrógeno en mg de nitrógeno/L. La concentración de nitrógeno en la muestra de melaza fue: (223.7 ± 0.3) mgN/L y para el caso de la vinaza fue: (140.8 ± 0.1) mgN/L.

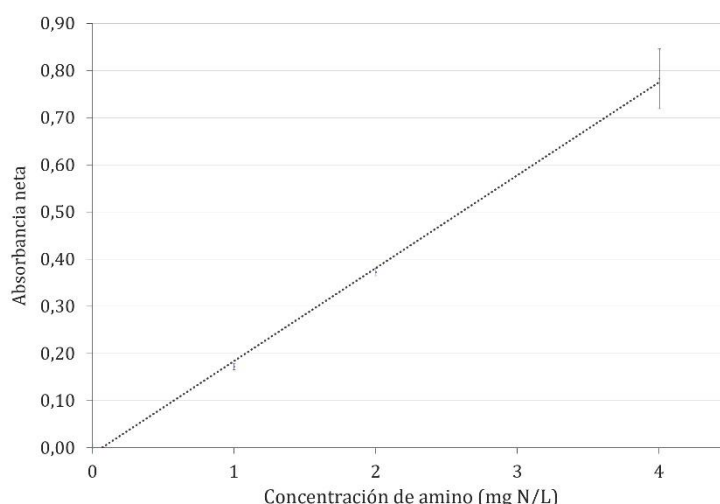


Figura 3.2.1: Curva de calibración de nitrógeno en forma de amino libre obtenida por el método colorimétrico. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).

3.3. Determinación de la concentración de glicerol en la glicerina cruda tratada:

Una vez obtenida la glicerina cruda tratada se determinó la concentración de glicerol en la misma por HPLC. Para poder realizar esta determinación se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glicerol (0.018, 0.0092, 0.0046 y 0.0023 g/mL), la misma se realizó por quintuplicado (figura 3.3.1). Con la

curva de calibración se obtuvo la siguiente ecuación $y = 166415463.13x - 22861.66$ con un $R^2 = 1.00$. Donde “y” es el área obtenida en el cromatograma y “x” es la concentración de glicerol en g/mL. La concentración del glicerol en la glicerina cruda fue: (0.8201 ± 0.036) g/mL.

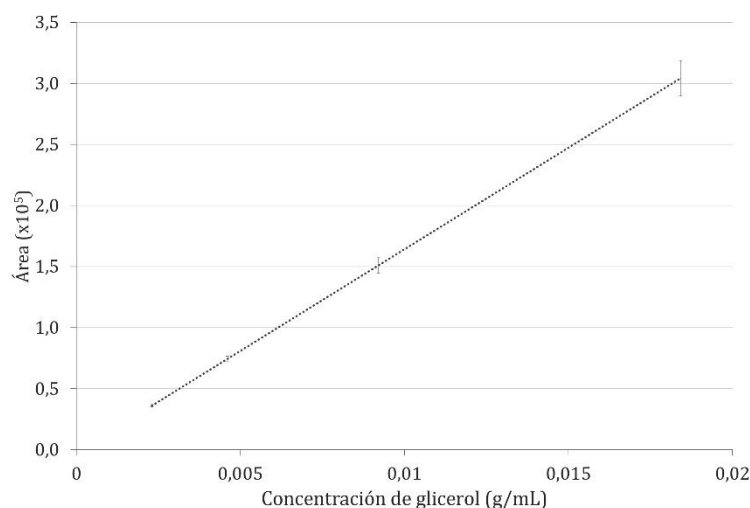


Figura 3.3.1: Curva de calibración de glicerol obtenida por HPLC. Las condiciones operativas utilizadas fueron, fase móvil acetonitrilo:H₂O 75:25 con un flujo de 0.8 mL/min y la temperatura de la columna fue de 35°C. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del promedio calculado ($\alpha=0.05$).



Figura 3.3.2: Fotografías de la glicerina cruda tratada después de la centrifugación. Se observan los ácidos grasos precipitados luego de la acidificación.