



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN COMPARATIVA EN LA BIODEGRADACIÓN DE
ACEITES VEGETALES GENERADOS EN EL PROCESO DE
FRITURAS MEDIANTE EL HONGO *Aspergillus niger* Y LA
LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

TIPO DE TRABAJO DE TITULACIÓN: TRABAJOS EXPERIMENTALES

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: KARINA XIMENA LÓPEZ VARGAS

TUTOR: Dr. EDGAR IVÁN RAMOS SEVILLA

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, Karina Ximena López Vargas Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental : “**EVALUACIÓN COMPARATIVA EN LA BIODEGRADACIÓN DE ACEITES VEGETALES GENERADOS EN EL PROCESO DE FRITURAS MEDIANTE EL HONGO *Aspergillus niger* Y LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***”, de responsabilidad de la señorita egresada Karina Ximena López Vargas, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Iván Ramos

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Ing. Juan González

MIEMBRO DE TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Karina Ximena López Vargas, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 12 de Julio del 2017

Karina Ximena López Vargas

150070178-2

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme culminar esta jornada

Mi sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a la Facultad de Ciencias por darme las oportunidades que recibí, al Doctor Iván Ramos, por su invaluable colaboración y asesoramiento en la dirección del presente trabajo

Al Ing. Juan González colaborador implacable del Trabajo de Titulación por el gran aporte brindado en su elaboración, Al laboratorio de Microbiología y Biotecnología, al Ingeniero Rene Carvajal por su buen concejo y apreciable contribución.

A los miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación por su aceptación

DEDICATORIA

Dedico este Trabajo de Titulación a mis padres Vicente y Carmen, por ser el eje fundamental en mi vida, por sus sabios y acertados consejos, por su ejemplo de superación.

A mi Esposo Edinson por estar conmigo en las buenas y en las malas y apoyarme de forma incondicional, a mis hermanas Johanna y Karen por todo el amor, palabras de aliento y fortaleza cuando más lo necesitaba.

A mi familia y amigos porque creyeron en mí y hoy puedo ver culminada mi meta. A ustedes gracias totales.

Karina

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
M1	Muestra 1
M2	Muestra 2
M3	Muestra 3
16-1305 ACFR	Muestra de aceite de fritura residual
16-1306 EM	Muestra de aceite de fritura residual en emulsión
16-1307 ASP	Muestra de aceite de fritura tratado con <i>Aspergillus niger</i>
16-1308 SC	Muestra de aceite de fritura tratado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NaNO₃	Nitrato sódico
K₂HPO₄	Fosfato di potásico
MgSO₄	Sulfato magnésico
KCl	Cloruro potásico
FeSO₄	Sulfato ferroso
C₃H₇O₂PO₄Mg	Glicerofosfato de magnesio
KSO₄	Sulfato de potasio
°C	Grados Centígrados
UV	Radiación Ultravioleta
pH	Potencial de Hidrógeno
h	Horas
min	Minutos
g	Gramos
kg	Kilogramos
cm	Centímetro
%	Porcentaje
mL	Mililitros
L	Litro
Abs	Absorbancia
T	Transmitancia
DO	Densidad óptica
C	Concentración
K	Coficiente de extensión molar
%T	Porcentaje de transmitancia
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetros

Sci	biomasa inicial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Scf	biomasa final <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Asp i	biomasa inicial <i>Aspergillus niger</i>
Asp f	biomasa final <i>Aspergillus niger</i>

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
PORTADA	
COMPARTIMIENTO EL DERECHO DE AUTOR	ii
CERTIFICACION	iii
DECLARACION DE AUTENTICIDAD	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
TABLAD DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ECUACIONES	xv
INDICE DE ANEXOS	xvi
ÍNTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	4
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 Lípidos	6
1.2 Aceites Vegetales	6
<i>1.2.1 Características</i>	7
<i>1.2.2 Propiedades físico químicas de los aceites</i>	8
<i>1.2.2.1 Solubilidad</i>	8
<i>1.2.2.2 Tensión superficial e interfacial</i>	8
<i>1.2.2.3 Densidad</i>	8
<i>1.2.2.4 Viscosidad</i>	9
<i>1.2.2.5 Porcentaje de ácidos grasos libres (AGL)</i>	9
<i>1.2.2.6 Índice de refracción</i>	10

1.2.2.7	<i>Índice de peróxido</i>	10
1.3	Aceites residuales del proceso de fritura (ARPF)	11
1.3.1	<i>Aspectos generales</i>	11
1.4	Degradación de los aceites vegetales	11
1.4.1	<i>Volátiles</i>	11
1.4.2	<i>Compuestos polares no poliméricos de volatilidad moderada</i>	12
1.4.3	<i>Dímeros y polímeros de ácidos y glicéridos</i>	12
1.4.4	<i>Ácidos grasos libres</i>	12
1.4.5	<i>Principales reacciones de degradación</i>	13
1.4.5.1	<i>Hidrólisis</i>	13
1.4.5.2	<i>Oxidación térmica o Autoxidación</i>	13
1.4.5.3	<i>Polimerización</i>	13
1.5	Crecimiento de microorganismos degradadores	14
1.5.1	<i>Factores que influyen sobre el crecimiento</i>	14
1.5.1.1	<i>Nutrientes</i>	15
1.5.1.2	<i>Temperatura</i>	15
1.5.1.3	<i>Acidez y alcalinidad (pH)</i>	15
1.5.1.4	<i>Tampones</i>	15
1.5.1.5	<i>Disponibilidad de agua</i>	16
1.5.1.6	<i>Requerimientos de oxígeno</i>	16
1.6	Hongo <i>Aspergillus niger</i>	17
1.6.1	<i>Características microscópicas</i>	17
1.6.2	<i>Características macroscópicas</i>	18
1.6.3	<i>Requerimientos para el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i></i>	19
1.7	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.7.1	<i>Características macroscópicas</i>	20
1.7.2	<i>Características microscópicas</i>	21
1.7.3	<i>Requerimientos para el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	22
1.8	Medio de cultivo Czapek	22
1.9	Medio de cultivo czapek dox modificado	23
1.10	Degradación de aceites a través de microorganismos	24

CAPITULO II

2.	METODOLOGÍA		
2.1	Hipótesis y especificación de variables	27
2.1.1	<i>Hipótesis general</i>	27
2.1.2	<i>Hipótesis específicas</i>	27
2.2	Tipo y diseño de investigación	28
2.3	Unidad de análisis	28
2.4	Población de estudio	28
2.5	Tamaño de la muestra	29
2.6	Selección de la muestra	29
2.7	Esquema del Proceso	30
2.7.1	<i>Fase del muestreo de aceites vegetales procedentes de frituras</i>	30
2.7.1.1	<i>Método</i>	30
2.7.2	<i>Caracterización físico química del aceite vegetal procedente de frituras antes y después del tratamiento</i>	32
2.7.2.1	<i>Método</i>	32
2.7.3	<i>Adaptación del Hongo <i>Aspergillus niger</i> en medio czapek solido con aceite vegetal procedente de frituras</i>	33
2.7.3.1	<i>Método</i>	33
2.7.4	<i>Adaptación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio czapek solido con aceite vegetal procedente de frituras</i>	34
2.7.4.1	<i>Método</i>	34
2.7.5	<i>Crecimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i> en medio liquido con aceite vegetal procedente de frituras</i>	34
2.7.5.1	<i>Método</i>	34
2.7.6	<i>Crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio liquido con aceite vegetal procedente de frituras</i>	37
2.7.6.1	<i>Método</i>	37

CAPITULO III

3.	Resultados y discusión		
3.1	Análisis de resultados	39
3.1.1	<i>Fase de muestreo de aceites vegetales procedentes de fritura</i>	39
3.1.2	<i>Caracterización físico del aceite vegetal procedente de frituras antes y después de la biodegradación</i>	39
3.1.3	<i>Caracterización química del aceite vegetal procedente de frituras antes y después de la biodegradación</i>	40
3.1.4	<i>Adaptación del hongo <i>Aspergillus niger</i> y la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio solido con aceite vegetal procedente de fritura</i>	43
3.1.5	<i>Crecimiento del Hongo <i>Aspergillus niger</i> en medio liquido con aceite vegetal procedente de frituras</i>	44
3.1.6	<i>Crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio liquido con aceite vegetal procedente de frituras.</i>	45
3.1.7	<i>Medición espectrofotométrica del caldo microbiano utilizado para la biodegradación con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	46
3.2	Comprobación de hipótesis.	48
3.3	Discusión de resultados	59
	CONCLUSIONES	61
	RECOMENDACIONES	62
	BIBLIOGRAFÍA.		
	ANEXOS		

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Densidad y viscosidad de algunos aceites vegetales.....	9
Tabla 2-1:	Índice de refracción de algunos aceites.....	10
Tabla 3-1:	Taxonomía de <i>Aspergillus niger</i>	17
Tabla 4-1:	Taxonomía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Tabla 5-1:	Composición medio de cultivo Czapek.....	23
Tabla 6-1:	Composición czapek dox modificado.....	23
Tabla 1-2:	Tabla de materiales y reactivos utilizados.....	31
Tabla 1-3:	Tabla de coeficiente de incremento de Biomasa.....	48
Tabla 2-3:	Tabla del índice de Degradación (I.D).....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	<i>Aspergillus niger</i>	17
Figura 2-1:	Morfología del género <i>Aspergillus</i>	18
Figura 3-1:	<i>Aspergillus niger</i> en medio sólido.....	19
Figura 4-1:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figura 5-1:	Colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 6-1:	Microscopía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 1-2:	Esquema general del proceso.....	30
Figura 1-3	Adaptación del hongo <i>Aspergillus niger</i> en medio sólido con aceite vegetal procedente de frituras	43
Figura 2-3	Adaptación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio sólido con aceite de fritura	44
Figura 3-3:	Crecimiento el Hongo <i>Aspergillus niger</i> en caldo czapek dox modificado con aceite vegetal procedente de frituras en 9ml de muestra.	45
Figura 4-3	Crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo czapek-dox modificado con aceite vegetal procedente de frituras en 9ml de muestra.	46
Figura 5-3	Crecimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	47
Figura 6-3	Crecimiento de la Levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	47
Figura 7-3	Análisis del ácido Mirístico.....	49
Figura 8-3	Análisis del ácido Palmítico.....	50
Figura 9-3:	Análisis del ácido palmitoléico.....	51
Figura 10-3:	Análisis del ácido Heptadecanoico.....	52
Figura 11-3:	Análisis del ácido Esteárico.....	53
Figura 12-3:	Análisis de ácido Oléico.....	54
Figura 13-3:	Análisis de Linoléico.....	55
Figura 14-3:	Análisis del ácido araquídico.....	56
Figura 15-3:	Análisis del ácido cis-11 Eicosanoico.....	57
Figura 16-3:	Análisis del ácido linolénico.....	58

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1-2:	Incremento de la biomasa.....	36
Ecuación 2-2:	Índice de degradación.....	36
Ecuación 3-2:	Coefficiente de absorptividad molar.....	36

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Resultados de análisis de ácidos grasos
- Anexo B:** Fotografías del proceso de biodegradación de aceite procedente de frituras
- Anexo C:** Ficha de datos de seguridad agar czapk dox (modificado)
- Anexo D:** Composición del medio czapek para biodegradación de aceites procedentes de fritura para *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en medio sólido
- Anexo E:** Composición del medio czapek dox modificado para biodegradación de aceites procedentes de fritura para *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido (234 ml)
- Anexo F:** Composición del medio czapek dox modificado para biodegradación de aceites procedentes de fritura para *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido (234 ml)
- Anexo G:** Composición del medio czapek dox modificado para biodegradación de aceites procedentes de fritura para *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido (250 ml)
- Anexo H:** Tabla de Registro de los muestreos
- Anexo I:** Resultados de medición espectrofotométrica del caldo microbiano utilizado para la biodegradación con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Anexo J:** Tabla de resultados de los parámetros físicos del aceite antes y después del tratamiento
- Anexo K:** Calculo de Incremento de la Biomasa
- Anexo L:** Cálculo del Índice de Degradación

RESUMEN

Se realizó la investigación en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, la finalidad de este estudio fue evaluar comparativamente la biodegradación de aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se produjo realizando el acondicionamiento y crecimiento de los dos microorganismos utilizando el agar czapek y el medio líquido czapek dox modificado que utilizaron como única fuente de carbono el aceite usado, la incubación se la realizó a 32°C, el medio líquido se mantuvo en constante agitación, en agar las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* se presentan de color blanco brillante existió el crecimiento de las colonias, con *Aspergillus niger* en el agar se observó partes blancas en las colonias esto corresponde a las cabezas de las conidias, el índice de degradación de *Aspergillus niger* fue de 5.37% frente al índice de degradación de *Saccharomyces cerevisiae* que es 1.2% el incremento de biomasa para el tratamiento con *Aspergillus niger* fue de 2.34% el incremento de biomasa para el tratamiento aplicado con *Saccharomyces cerevisiae* que es 42.85%. Se concluyó que *Aspergillus niger* es más efectivo en la degradación debido al índice de degradación que presentó en un 5.37% en el tratamiento realizado con *Aspergillus niger* frente al índice de degradación de *Saccharomyces cerevisiae* es 1.2%. Posiblemente por la acción del gel emulsificante. 10 ácidos grasos presentes en las muestras y con los resultados fueron que de los 10 ácidos grasos no existe nivel significancia el p-valor de todos resulta mayor a 0.05 por lo que no se rechaza la hipótesis nula. Realizar pruebas con consorcios microbianos para desarrollar una mayor eficiencia el tratamiento realizarlo durante un mayor tiempo estimado de tres meses para determinar si existe una mayor degradación del aceite.

Palabras Claves: < HONGO [ASPERGILLUS NIGER] > <INDICE DE DEGRADACIÓN>
<BIOMASA> <ACEITE DE FRITURAS> <LEVADURA [SACCHAROMYCES
CEREVISIAE]> <ACIDOS GRASOS> <AGAR CZAPEK> <BIOTECNOLOGIA
AMBIENTAL> <RIOBAMBA [CANTON] >

ABSTRACT

The research was carried out in the laboratory of Animal Biotechnology of the Faculty of Animal Sciences of ESPOCH. The purpose of this study was to evaluate comparatively the biodegradation of vegetable oils generated in the frying process using the fungus *Aspergillus niger* and the *Saccharomyces cerevisiae* yeast produced by conditioning and growing the two microorganisms. The agar czapek and the czapek dox liquid médium modified was used, the used oil was as the only carbon source. The incubation was performed at 32 ° C. The liquid medium was kept in constant agitation. The *Saccharomyces cerevisiae* colonies in agar are presented in bright white color. It existed the growth of the colonies whith *Aspergillus niger*, in the agar was observed white parts in the colonies, this corresponds to the heads of conidia. The degradation index of *Aspergillus niger* was 5.37% against the index of degradation of *Saccharomyces cerevisiae* that is 1.2%. The increase of biomass for the treatment with *Aspergillus niger* was 2.34%. The increase of biomass for the treatment applied with *Saccharomyces cerevisiae* that is 42.85%. The research paper concluded that *Aspergillus niger* is more effective in the degradation due to the degradation index that presented in 5.37% in the treatment with *Aspergillus niger* against the index of degradation of *Saccharomyces cerevisiae* is 1.2% possibly by the action of the emulsifying gel. 10 fatty acids present in the samples and with the results were that of the 10 fatty acids there is no significance level the p-value of all is greater than 0.05 so the null hypothesis is not rejected. Perform tests with microbial consortia to develop a more efficiency; treatment should be carried out for an estimated time of three months to determine if there is further degradation of the oil.

Key words: < FUNGUS [ASPERGILLUS NIGER] > <DEGRADATION INDEX> <BIOMASS> <FATTY OIL> <YEAST [SACCHAROMYCES CEREVISIAE]> <FATTY ACIDS> <AGAR CZAPEK> <ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY> < RIOBAMBA [CANTON] >

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

En la actualidad los aceites usados son arrojados al sistema de alcantarillado siendo una fuente de contaminación de las aguas que al unirse con trazas de detergentes y jabones forman “bolas de grasa” atascan los colectores, redes de saneamiento. El aceite vegetal contiene una gran cantidad de materia orgánica, se elevan y forman capas en la superficie del agua que no dan paso del oxígeno poniendo en riesgo la vida de los organismos acuáticos. (ECOGRAS, s.f., p. 1)

El potencial contaminante de los aceites usados en el agua es de 20L semanal en el Cantón Loreto, ya que 1L aceite contamina 1000 L de agua, equivalente a la cantidad de agua que bebe una persona en 1.15 años. El aceite usado desechado por los drenajes provoca obstrucciones y ruptura de tuberías cuando se arrojan en el agua produce una película y no permite el intercambio de oxígeno afectando flora, fauna acuática y puede adherirse a las agallas de los peces dificultando su respiración. (ECOGRAS, s.f., p. 1)

El aceite de cocina usado se lo utiliza como materia prima para la elaboración de alimento para animales siendo este proceso prohibido en varios países ya que esta práctica ocasiona que las dioxinas ingresen al ser humano mediante el consumo de carne animal a través de la cadena alimenticia. Los aceites dechados del proceso de fritura muchas veces son dispuestos en los basureros los mismos que favorecen la producción de lixiviados (ECOGRAS, s.f., p. 1)

La inadecuada disposición final de los aceites usados se genera por la ausencia de un sistema para almacenar, recolectar, transportar y tratar este desecho, así como también la falta de información y conciencia ambiental de población constituye uno de los principales motivos por los que cada vez se incrementa la contaminación de los recursos y la pérdida de especies especialmente acuáticas. (ECOGRAS, s.f., p. 1)

Un estudio realizado por la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda acerca de la Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*, en el que se utilizó el medio de cultivo Czapek dox que garantiza el mayor crecimiento de las especies fúngicas *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. (Marquez, et al., 2015, p. 90)

Se concluyó que los aceites residuales indican cambios de las propiedades físicas después del tratamiento biológico con las especies fúngicas, en la composición química del aceite vegetal residual no hubieron mayores variaciones en el perfil de ácidos grasos después del tratamiento, una reducción del ácido linolénico con la aplicación de *Saccharomyces cerevisiae*, y *Aspergillus niger* es la cepa que presentó mayor degradación. (Marquez, et al., 2015, p. 90)

Los resultados obtenidos arrojaron un incremento considerable en la biomasa (crecimiento de microorganismos) ya que se determinaron los valores más altos en el aumento de la biomasa y productividad para aceites residuales urbanos vegetales y para aceites residuales urbanos de lubricantes y los rendimientos en el consumo lipídico son 61,74% ($\pm 0,16$) para *Saccharomyces cerevisiae* y 59,69% ($\pm 0,6$) para respectivamente *Aspergillus niger* (Marquez, et al., 2015, p. 90)

La investigación realizada en el año 2008, con el tema “Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados se aplica la biorremediación para disminuir la concentración de dichos contaminantes”. Los lodos contaminados con residuos de aceites lubricantes usados producen alteraciones en la naturaleza, se planteó realizar una biorremediación con la finalidad de reducir la concentración de contaminantes. (Vásquez, et al., 2008, p. 1)

Los ensayos se realizaron en la planta de tratamiento de aguas residuales de Río Frío, donde se valoraron las actividades de consorcios microbianos nativos a los que consecutivamente se les introdujeron en las biopilas que estaban constituidas por lodos deshidratados que tienen origen en el tratamiento primario de aguas residuales domésticas, lodos provenientes de lavaderos de vehículos y lodos de alcantarillado de la zona industrial de Bucaramanga. (Vásquez, et al., 2008, p. 1)

Se aislaron, identificaron y conservaron cepas microbianas con capacidad de degradar hidrocarburos totales de petróleo (TPH) como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter spp.*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus spp* y *Nocardia spp.* Se hizo una serie de pruebas piloto donde se inoculó un consorcio bacteriano a una concentración *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, (Vásquez, et al., 2008, p. 1)

Los microorganismos mencionados en el párrafo anterior se monitorearon y se registraron valores de temperatura, pH, humedad y oxigenación, además se obtuvieron porcentajes de remoción hasta 94% de TPH durante 90 días ,84% en 40 días lo que arrojó como resultado un efecto positivo que al utilizar los consorcios microbianos se evidenció la reducción de la contaminación de lodos. (Vásquez, et al., 2008, p. 1)

En estudio de la evaluación de la actividad lipolítica de hongos sobre aceite de higuera (*ricinuscommunis*) se realizó la selección de las cepas de hongos que manifiestan una alta actividad lipolítica en aceite de higuera y comprobar si sus crudos enzimáticos que se obtuvieron por fermentación en substrato líquido presentan la misma actividad sobre el aceite de higuera. (Mendoza , et al., 2012, pp. 5-10)

Se aislaron 9 cepas de hongos, ocho de *Penicillium sp* y una de *Aspergillus sp*, a partir de aceites vegetales procedentes de desechos. Los resultados indicaron que *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentaron halos de degradación. El trabajo demostró que las cepas *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentaron mejor crecimiento de colonia en el aceite de higuera y buena actividad de hidrólisis en placa con el triglicérido de cadena corta tributirina. (Mendoza , et al., 2012, pp. 5-10)

JUSTIFICACIÓN

El uso de aceite vegetal resulta muy necesario en las cocinas de la gran mayoría de las viviendas y negocios de comidas, por lo que su consumo es continuo y se obtienen grandes cantidades de los residuos contaminantes, los aceites procedentes de frituras ocasionan alteraciones químicas en su estructura y también alteraciones en los alimentos por lo cual estos aceites son desechados después de un cierto tiempo de haber sido utilizados. (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

El cantón Loreto al no contar con un gestor adecuado para la disposición final de los aceites vegetales proveniente del proceso de frituras se ve en la necesidad de implementar un método efectivo y económico para tratar dichos aceites a través de técnicas biológicas que utilizan la capacidad de los microorganismos para degradar, remover o transformarlos a compuestos más inocuos para el Ambiente. (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

Por este motivo surge la necesidad de emplear el tratamiento biológico que beneficie al cantón y promueva la conservación de la flora, fauna acuáticas mejorando el medio ambiente y la calidad de vida de su toda la población. De este modo se pueda contribuir con una nueva alternativa en el tratamiento para eliminar o reducir su potencial peligrosidad y los centros de comida empezarían a dar un adecuado tratamiento de los aceites vegetales usados. (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

Los cambios que se producen en los aceites vegetales que son utilizados en el proceso de cocción, de fritura de alimentos y también las reacciones que puedan resultar nocivas para la salud a causa

de los cambios organolépticos del aceite, el rol de los aceites en el proceso de fritura es de gran importancia porque éste es un medio que transmite calor y a la vez aportan con datos importantes a la calidad del producto como son la textura, el sabor y el olor. (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

Una vez que los aceites son reutilizados a temperaturas altas y son expuestos a largos períodos de exposición en el calor en los alimentos, los aceites tienen la capacidad de producir compuestos tóxicos (dioxinas) en grasas y aceites estos son unos combinados químicos que reducen el colesterol bueno y al incrementarse el colesterol malo constituyen agentes cancerígenos en la población. (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

En los alimentos que son expuestos a aceites de fritura continuamente reutilizados la problemática son las características indeseables no apetecibles que pierden el valor nutritivo y existe una acumulación de compuestos resultantes del proceso de deterioro oxidativo de los ácidos grasos los que posteriormente estos ingresan a la dieta del ser humano ocasionando malestares en la salud para los consumidores (Fernández C, et al., 2010, pp. OT341-OT3410)

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar comparativamente la biodegradación de aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos específicos

- Caracterizar física y químicamente el aceite vegetal residual generado en el proceso de frituras.
- Acondicionamiento y crecimiento del hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en laboratorio.

- Determinar la capacidad degradadora del hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- Caracterizar física y químicamente el aceite vegetal residual después de su tratamiento con los microorganismos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Lípidos

Los lípidos son un conjunto heterogéneo de sustancias que tienen la propiedad de ser insolubles en agua pero son solubles en solventes orgánicos como el éter y el cloroformo, los lípidos están constituidos por carbono, hidrógeno, nitrógeno en el que encontramos mayor proporción de carbono y de hidrógeno, los lípidos constituyen una fuente concentrada de energía que proporciona a los organismos 9Kcal/g. (Ortega, 2013, pp. 2-9)

La diferencia entre grasa y aceites se hace referencia por el estado físico sea sólido o líquido en el que se encuentran a temperatura ambiente las grasas están en estado sólido con la particularidad de que aquí predominan los ácidos grasos saturados y los aceites a temperatura ambiente están en estado líquido donde los ácidos grasos insaturados constituyen la mayor proporción de los mismos. (Ortega, 2013)

1.2 Aceites vegetales

Los aceites y grasas vegetales son sustancias orgánicas, formadas por los ésteres de ácidos grasos y glicerina a los que se denominan glicéridos. La glicerina puede estar mono, di o triesterificada por los ácidos grasos, aquí se forman los mono, di o triglicéridos. Los ésteres de la glicerina y el aceite contienen pequeñas dosis de vitaminas, fosfátidos, esteroides, colorantes, agua e hidrocarburos que constituyen el material insaponificable. (Mirasolain, 1998, pp. 3-4)

Los triglicéridos son los acilglicéridos más abundantes en la naturaleza y los principales componentes de todas las grasas y aceites ya que representan más del 95 % de su composición y el 5% de ácidos grasos libre, esteroles, cera entre otros Las características físicas y químicas de los

triacilglicéridos dependen fundamentalmente del tipo, la concentración y la forma de distribución de los ácidos grasos en las tres posiciones (Badui Dergal, 2006, p. 253)

Los aceites vegetales resultan del proceso de extracción de frutos oleaginosos de algunas plantas las que poseen un alto contenido en vitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados en las semillas, los aceites que con mayor frecuencia encontramos en el mercado son de ricino, soja, girasol también existen otra variedad como algodón y lino, pero los aceites no solo son utilizados en el proceso de alimentación sino también en la industria cosmética. (Badui Dergal, 2006, p. 253)

1.2.1 Características

Los aceites vegetales son ésteres de glicerol de ácidos grasos llamados triglicéridos que constituyen un 95% y el 5% de ácidos grasos libre, esterol, cera entre otros. Los ácidos palmíticos oléicos y esteáricos son los más comunes, pero los ácidos grasos presentes en cantidad apreciable en los aceites que se usan comúnmente, van desde el ácido octanóico 5 a 10% en el aceite de coco, hasta el ácido erúxico 50% en ciertas variedades de aceite de colza. (CORPOBID, 2003)

Los pigmentos más importantes en las grasas son los carotenoides, el aceite de palma por lo general de un rojo anaranjado brillante, contiene hasta 0.2% de betacaroteno. En algunos aceites que son obtenidos a partir de semillas no maduras se encuentran niveles altos de clorofila lo que proporciona una coloración verdosa, el aceite de algodón presenta un color muy pronunciado por los pigmentos de gossypol (Pigmento embrión de la planta de algodón.) (CORPOBID, 2003)

La mayor parte de pigmentos son eliminados en el proceso de blanqueado y refinamiento por la aplicación de álcali. La eliminación de algunos pocos pigmentos fijos se torna difícil en el proceso y pueden ser el resultado del calor o de una oxidación excesiva en las materias primas que contienen las grasas. Los pigmentos carotenoides se empalidecen por acción del calor, luz o un tratamiento oxidativo. (CORPOBID, 2003)

1.2.2 Propiedades fisicoquímicas de los aceites

1.2.2.1 Solubilidad

Los aceites se caracterizan principalmente por ser inmiscibles en agua, pero en solventes orgánicos no polares son miscibles así mismo a temperaturas más altas a las de fusión las grasa y aceites son miscibles. La solubilidad de esta sustancia va a tener dependencia de las propiedades termodinámicas de los solutos y disolventes, también tiene dependencia de las fuerzas relativas de atracción entre las moléculas. (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

1.2.2.2 Tensión superficial e interfacial

Los aceites y ácidos grasos están separados, los aceites comerciales suelen presentar más baja tensión superficial e interfacial, esto se produce por la presencia de componentes polares de superficie activa, tales como monoglicéridos, fosfolípidos y jabones. Los monoglicéridos y jabones pueden reducir la tensión interfacial entre agua y aceite, los agentes emulsivos reducen la tensión superficial de grasa y aceites (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

1.2.2.3 Densidad

La densidad del aceite es la relación entre su peso y su volumen, y en este caso se ve afectada por la temperatura. La densidad de los aceites vegetales presenta variaciones esto va a depender del tipo de aceite y de las temperaturas en la que se encuentren los aceites, la densidad estándar para los aceites vegetales va de un valor mínimo de 0.90 g/ml a un valor máximo de 0.93 g/ml a una temperatura media de 15°C. (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

1.2.2.4 Viscosidad

La viscosidad es una medida de la fricción interna entre moléculas, o de la resistencia a fluir de los líquidos. En general, la viscosidad de los aceites tiende a bajar cuando se da un incremento en la instauración y con un decrecimiento del peso molecular de sus ácidos grasos. Los aceites deben su alta viscosidad a la estructura en largas cadenas de moléculas de sus glicéridos por esto la viscosidad de aceites calentados es mayor que los aceites sin tratar (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

Tabla 1-1: Densidad y viscosidad de algunos aceites vegetales.

TIPO DE ACEITE	DENSIDAD A 20°C	VISCOSIDAD A 20°C
Copra	0.915	30
Palma	0.945	60
Algodón	0.921	73
Tempate	0.920	77
Cacahuete	0.914	85
Colza	0.920	78
Soja	0.920	61
Girasol	0.925	58

Fuente: (Legaz, R 2000, p.1)

1.2.2.5 Porcentaje de ácidos grasos libres (AGL)

Básicamente se constituye como el porcentaje de ácido oleico, palmítico o láurico, según el ácido graso que predomine en el aceite o grasa. Los aceites y grasas refinados deben tener un nivel de ácidos grasos libres inferior al 0,2% como ácido oleico para ser aptos para su uso en alimentación Sin embargo, los aceites crudos y los usados previamente en frituras, tienen un contenido de ácidos grasos libres significativamente superior a éste (2% o más). (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

1.2.2.6 Índice de refracción

El índice de refracción de un aceite constituye la velocidad de la luz en el vacío con relación a la velocidad de la luz en el aceite. El valor del índice de refracción se relaciona con el grado de saturación y este a su vez es un claro indicador de la pureza del aceite, el índice de refracción de las grasa como de los ácidos grasos aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada y el número de enlaces dobles en ella (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

Tabla 2-1: Índice de refracción de algunos aceites

ACEITE	INDICE DE REFRACCIÓN
Aceite de maní	1,460-1,465
Aceite de babasu	1,448-1,451
Aceite de coco	1,448-1,450
Aceite de semilla de algodón	1,458-1,466
Aceite de semilla de uva	1,467-1,477
Aceite de maíz	1,465-1,468
Aceite de semilla de mostaza	1,461-1,469
Aceite de palma	1,454-1,456
Aceite de almendra de palma	1,448-1,452

Fuente: (Soto, 2014, p. 22)

1.2.2.7 Índice de peróxido

El índice de peróxido mide el grado de oxidación primaria que se ha producido en una grasa o aceite. Los peróxidos son los productos de descomposición primaria de la oxidación estos crean en los puntos de insaturación de las cadenas de carbonos de los ácidos grasos, la velocidad de oxidación directamente proporcional con la temperatura, con la exposición al oxígeno del aire, la presencia de luz y contacto con materiales pro-oxidantes (Cedeño, et al., 1999, pp. 359-368)

1.3 Aceites Residuales del Proceso de Fritura (ARPF)

1.3.1 Aspectos generales

Los aceites residuales resultantes de los procesos de fritura son derivadas de la industria de alimentos, que existen cambios físicos, químicos que además de un uso intensivo, constituyen un peligro, estos aceites tienen su origen en los procesos de fritura profunda de los alimentos, los que involucran el uso de elevadas cantidades de aceite porque demanda de la inmersión completa del alimento a temperaturas muy elevadas (<180 °C). (Cuesta, et al., 1991, pp. 443-445)

Los aceites residuales procedentes de las frituras forman uno de los mayores contaminantes que tienen mayor impacto, cuando los aceites son descargados en los sistemas de alcantarillado estas descargas producen una mayor carga orgánica superando los estándares normales que se utilizan en la aguas residuales domésticas lo que ocasiona una alteración en los tratamientos y en mantenimiento de las redes de saneamiento. (Quiñones, 2003, pp. 31-32)

1.4 Degradación de los aceites vegetales

La reutilización de los aceites de fritura producen un peligro para la salud de las personas de acuerdo a la clase del producto que es sometido a este proceso puesto que la capacidad de absorción va a variar de un 5% a un 20 % de este aceite, existe un incremento en la cantidad de compuestos peligrosos que contribuye un aceite degradado a los alimentos. (Franco , 2001, p. 18)
Entre los diversos compuestos que son generados a causa de la degradación de aceites tenemos:

1.4.1 Volátiles

Las reacciones oxidativas que implican la formación y descomposición de hidroperóxidos llevan a compuestos como aldehídos saturados e insaturados, cetonas, hidrocarburos, lactonas, alcoholes, ácidos y ésteres. Con el calentamiento a una temperatura de 180 °C en el período de 30 minutos y con presencia de aire es posible determinar por cromatografía gaseosa los productos de oxidación volátiles primarios. (Fenema , 2010, pp. 270-273)

Los productos volátiles que son obtenidos presentan una gran variación y esto depende del tipo de aceite, del alimento y del tratamiento térmico, cuando los aceites y grasas son expuestos a una

temperatura muy alta se alcanza un equilibrio en la producción de volátiles, debido a que se alcanza un equilibrio entre la formación de volátiles y su disminución por evaporación o descomposición. (Fenema , 2010, pp. 270-273)

1.4.2 Compuestos polares no poliméricos de volatilidad moderada

Los compuestos polares no poliméricos de volatilidad moderada constituyen los hidroxí y epoxi ácidos, la producción de estos compuestos se realiza mediante las rutas oxidativas en las que existe participación de radicales alcoxi. Las reacciones de oxidación forman hidroperóxidos, compuestos polares, monómeros, polímeros cíclicos, los que se relacionan con retraso en el crecimiento, hipertrofia o hiperplasia hepática, hígado graso, úlceras gástricas y lesiones titulares en corazón y riñón. (Fenema , 2010, pp. 270-273)

1.4.3 Dímeros y polímeros de ácidos y glicéridos

Estos compuestos son generados mediante combinaciones térmicas y oxidativas de radicales libres, el efecto de la polimerización da como resultado un incremento notable en la viscosidad del aceite que procede de actividades de fritura. Los dímeros, trímeros y otros polímeros pueden ser de dos tipos, según se combinen radicales oxidados o no oxidados: Dímeros y polímeros apolares (no oxidados), dímeros y polímeros polares (oxidados). (Fenema , 2010, pp. 270-273)

1.4.4 Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de carbono que poseen un grupo carboxilo como grupo funcional, los ácidos grasos como tales (ácidos grasos libres) son muy poco frecuentes en los alimentos y además son generalmente producto de la alteración lipolítica. Los ácidos grasos libres son compuestos se producen por hidrólisis de los triacilglicérols, por el calentamiento en presencia de agua (Fenema , 2010, pp. 270-273)

Las reacciones mencionadas en los párrafos anteriores son las responsables de los diversos cambios físicos y químicos que se observan el proceso de fritura, entre estos cambios, cabe citar el incremento de la viscosidad y del contenido en ácidos grasos libres, la coloración oscura así como el descenso del índice de yodo y la tensión superficial, alteración del índice de refracción y el acrecentamiento en la producción de espuma. (Fenema , 2010, pp. 270-273)

Resulta inevitable el deterioro de los aceites vegetales cuando son sometidos a altas temperaturas cabe destacar que no todos los aceites son degradados de la misma manera esto depende del tipo de ácidos y la cantidad de ácidos grasos que contengan, los aceites que tienen un porcentaje bajo de ácidos grasos insaturados como por ejemplo el aceite de palma se constituyen en aceites más estables que los aceites que poseen alto contenido en de ácidos grasos insaturados. (Du Plessis , et al., 1981, pp. 272-275)

1.4.5 Principales reacciones de degradación.

1.4.5.1 Hidrólisis

Cuando los triglicéridos se ponen en contacto con la humedad del alimento suelen liberar unas cadenas de ácidos grasos lo que ocasiona un aumento en la acidez del aceite con aparición de metilcetonas y lactonas que producen malos olores. Cuando se realiza la fritura del alimento y se alcanzan temperaturas de 180 a 190°C la humedad se evapora por lo que la hidrolisis no resulta importante. (Du Plessis , et al., 1981, pp. 272-275)

1.4.5.2 Oxidación térmica o Autooxidación

La autooxidación es un proceso oxidativo no enzimático que se da con frecuencia en la fritura, la oxidación de los ácidos grasos en oxígeno, origina a compuestos intermedios de poca estabilidad estos son hidroperóxidos y peróxidos estos son los que forman los radicales libres. El deterioro térmico origina a una división de material de alto peso molecular, la formación dímeros cuando están en contacto con el oxígeno producen cantidades elevadas de grupos hidroxilo carbonilo.

Las grasas y los aceites cuando atraviesan el proceso de oxidación suelen tomar una coloración oscura, se produce un incremento de la viscosidad, la formación de espuma aumenta, también los sabores y olores son desagradables, la variación del color se produce por la transformación de las sustancias que se están en presentes en los alimentos como azúcares, almidones y proteínas. La autooxidación se produce mayoritariamente en ácidos grasos (Cuesta, et al., 1991, pp. 443-445)

1.4.5.3 Polimerización

Los polímeros formados provienen en su gran mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados y radicales libres que tienden a combinarse entre ellos formando compuestos lineales más o menos

largos y ramificados o compuestos cíclicos. La polimerización se debe a la descomposición de los peróxidos, que forman radicales alquílicos y agua, que a su vez atacan a otros hidroperóxidos produciendo más radicales que finalmente se dimerizan. (Cuesta, et al., 1991, pp. 443-445)

Los polímeros al aumentar de tamaño y peso molecular, incrementan la viscosidad del aceite favoreciendo la formación de espuma y por tanto la oxidación; por otro lado, producen un arrastre mayor de aceite por parte del producto frito debido a que gotea con más dificultad. Estos forman en la superficie del aceite y los freidores una capa de consistencia plástica, muy adherente y difícil de eliminar. (Cuesta, et al., 1991, pp. 443-445)

1.5 Crecimiento de Microorganismos degradadores

El aumento del número de células microbianas en una población es denominado crecimiento, el mismo que puede ser determinado mediante el incremento de masa microbiana. El crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo que denominaremos ciclo celular, sino al demográfico de una población. (Madigan, et al., 2001, p. 16)

1.5.1 Factores que influyen sobre el crecimiento.

La velocidad de crecimiento depende del tipo de célula microbiana y de las condiciones físicas, químicas y medioambientales, generalmente el tiempo en el que se duplican las células microbianas se incrementa según la complejidad de los organismos de esta manera el tiempo de duplicación de células animales y vegetales son más amplios en relación al tiempo de duplicación de mohos y levaduras, y la duplicación de las bacterias suele ser menor (Madigan, et al., 2001, p. 16)

Algunos organismos son capaces de resistir a las condiciones adversas, que propiamente no son favorables para el crecimiento por ende hay que diferenciar las condiciones ambientales de los efectos sobre su viabilidad y crecimiento. Los requerimientos más importantes para el crecimiento de los microorganismos son: disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, disponibilidad de agua y oxígeno. (Madigan, et al., 2001, p. 16)

1.5.1.1 Nutrientes

Los microorganismos necesitan de nutrientes para su crecimiento y energía. Para cualquier célula las fuentes tanto de carbono como de nitrógeno son indispensables, también son indispensables en menores cantidades otros nutrientes como: azufre, fósforo, potasio y magnesio. Algunos aceites vegetales son utilizados como fuentes de carbono para el crecimiento de microorganismos que producen lipasas. (Kamikura & Mendieta, 1999, p. 1)

1.5.1.2 Temperatura.

La temperatura influye en el crecimiento de los microorganismos, para cada microorganismo existe una temperatura mínima que es la cantidad de calor más pequeña que necesita ese microorganismo para poder crecer, la temperatura óptima es la temperatura ideal y esta permite el crecimiento del microorganismo a mayor velocidad, la temperatura máxima es la máxima temperatura a la que ese microorganismo puede crecer. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

1.5.1.3 Acidez y alcalinidad (pH)

Existe un rango de pH dentro del cual se produce el crecimiento de microorganismos y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido. Una gran cantidad de ambientes naturales poseen valores de pH de 5.9 y los organismos con pH óptimo equivalente son los habituales, existen pocas especies que se pueden desarrollar en ambientes que tienen un pH inferior a 2 o mayor a 10. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

Los hongos, toleran ambientes más ácidos en relación a las bacterias, los microorganismos se pueden ser acidófilos si el pH es bajo, neutrófilos si el pH es neutro, alcalófilos el pH es alto. De manera independiente de las condiciones extremas en que vivan los microorganismos (pH del medio extracelular), el pH intracelular debe ser cercano a la neutralidad (7), para no destruir de las macromoléculas hábiles en condiciones ácidas o alcalinas. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

1.5.1.4 Tampones

En un cultivo con medio no renovado, el pH puede cambiar durante el crecimiento como consecuencia de las reacciones metabólicas por tal razón se usan con frecuencia tampones para mantener constante el pH del medio de cultivo. Las soluciones amortiguadoras funcionan si es

que hay rangos de pH muy pequeños por lo que para variaciones más altas se usan soluciones distintas. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

1.5.1.5 Disponibilidad de agua

Todos los microorganismos requieren del líquido vital para el crecimiento y desarrollo microbiano en la naturaleza, existe una gran cantidad de microorganismos que no tienen la capacidad de crecer en lugares que tienen poca disponibilidad de agua, de tal forma sin disposición adecuada de agua se deshidratan, y estos microorganismos pasan condiciones estáticas y mueren. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

Cuando algunos microorganismos crecen en un medio que tiene baja disponibilidad de agua logran obtener agua del ambiente para poder realizar las reacciones metabólicas produciéndose un incremento en el concentrado de solutos, este proceso es posible llevarlo a cabo porque los microorganismos bombean iones al interior celular o también sintetizando o concentrando un soluto orgánico. (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

1.5.1.6 Requerimientos de Oxígeno

Según los requerimientos de oxígeno los microorganismos pueden: aeróbicos si necesitan de oxígeno para crecer, microaerófilos estos son aerobios utilizan oxígeno solo cuando su tensión es más baja que la del aire, anaeróbicos si no poseen sistemas respiratorios no utilizan oxígeno como aceptor terminal de electrones, anaerobios facultativos pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno, anaerobios estrictos si mueren en presencia de oxígeno (Madigan, et al., 2001, pp. 15-16)

1.6 Hongo *Aspergillus niger*

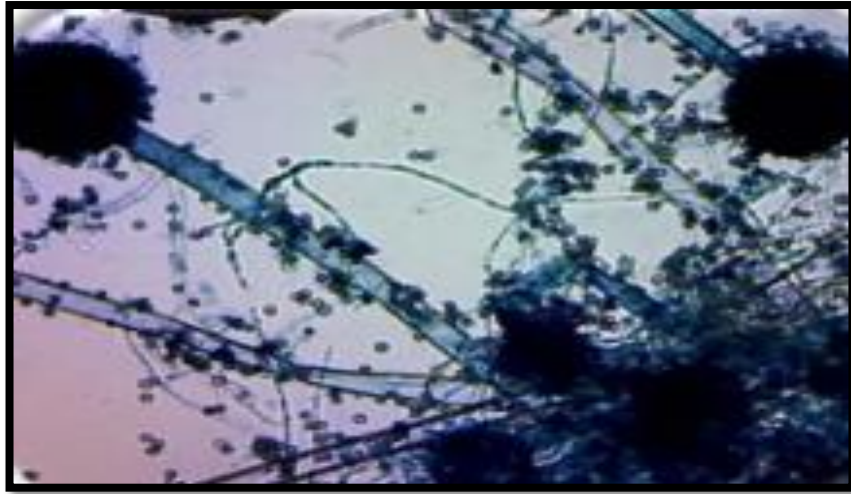


Figura 1-1: *Aspergillus niger*

Fuente: (Rosas & Terán, 2015, p. 15)

Taxonomía

Tabla 1-2: Taxonomía de *Aspergillus niger*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Mycota</i>
Subdivisión	<i>Eumycota</i>
Clase	<i>Deuteromyces</i>
Subclase	<i>Plectomycetidae</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Euroticia</i>

Fuente: (Useshe, et al., 2007, p. 1)

1.6.1.1 *Características Microscópicas:*

Aspergillus niger pertenece a los hongos filamentosos es decir aquellos que forman hifas que presentan un recubrimiento denominado micelio que posee una coloración blanquecina, mientras que la propia estructura posee un color negro, pardo, verde y amarillo sobre el sustrato en el cual crecen. La reproducción es asexual se realiza a través de microconidias ubicadas en esterigmatas en los extremos de la vesícula o cabeza (micelio aéreo). (Henera C., Ulloa P., 1990, pp. 103-106)

En el proceso de germinación las conidias incrementan su tamaño y forman algunos tubos germinativos que terminan en un micelio pluricelular ramificado que forma la colonia. Tienen esporas asexuales denominadas condiosporas que encuentran dentro del conidióforo y cuando llegan al estado de madurez toma la forma de un isopo, poseen hifas septadas, este microorganismo no presenta ciclo sexual. (Henera C., Ulloa P., 1990, pp. 103-106)

El micelio de *Aspergillus niger* presenta una variación de color desde el blanco al amarillo, que al llegar a la madurez se producen estructuras reproductoras llamadas conidióforos que dan origen, en el tipo silvestre, a esporas negras, o negro-púrpura. Las conidias en su morfología presentan formas que van desde redondas a ovales, 2,5-10 μm de diámetro y poseen una superficie rugosa. (Henera C., Ulloa P., 1990, pp. 103-106)

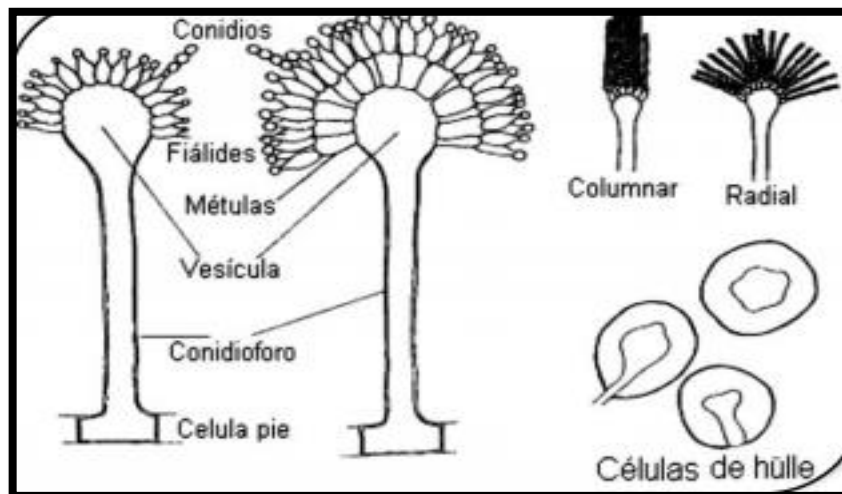


Figura 2-1: Morfología del género *Aspergillus*

Fuente: (Duque , 2008, p. 11)

1.6.1.2 Características Macroscópicas:

Aspergillus niger es un hongo y una de las especies más comunes del género *Aspergillus*. Las especies *Aspergillus* las encontramos a nivel mundial, se hallan especialmente en el suelo y en la materia vegetal. Este microorganismo resulta ser uno de los más contaminantes en los laboratorios de microbiología, este hongo es capaz de producir un moho negro en los vegetales siendo común ubicarlos en la lechuga, el tomate y la acelga.

El *Aspergillus niger* es la especie más abundante de *Aspergillus* y puede desarrollarse en gran diversidad de sustancias este hongo cumple un rol importante en biotecnología ya que ha sido utilizado por más de 80 años en la industria en fermentaciones industriales, pues tiene gran capacidad de acumular y excretar metabolitos, actualmente existen más de 2000 reportes de ciencia y más de 100 patentes que se relacionan con la explotación *A. niger*. (Reyes , et al., 2013)

1.6.1.3 *Requerimientos para el crecimiento de Aspergillus niger.*

Para un buen crecimiento de *A. niger* el rango de temperatura para el crecimiento es de 0-5°C hasta 35-40°C siendo la temperatura óptima entre 25-30°C y el pH de 4.5-5.5 de crecimiento óptimo, pero soporta pH ácidos de 3.5 y máximo 6.8. En cuanto a condiciones de iluminación este microorganismo no es exigente, sin embargo los cultivos de *A. niger* no debe estar limitados en Hierro ni Manganeso para ser utilizados en la producción de ácido acético. (Kozakiewicz , 1989, p. 122)

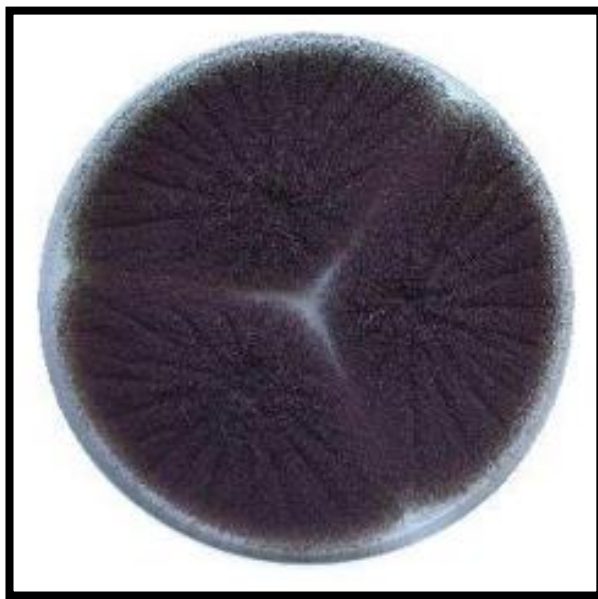


Figura 3-1: *Aspergillus niger*

Fuente: (Lucena , 2011, p. 19)

1.7 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

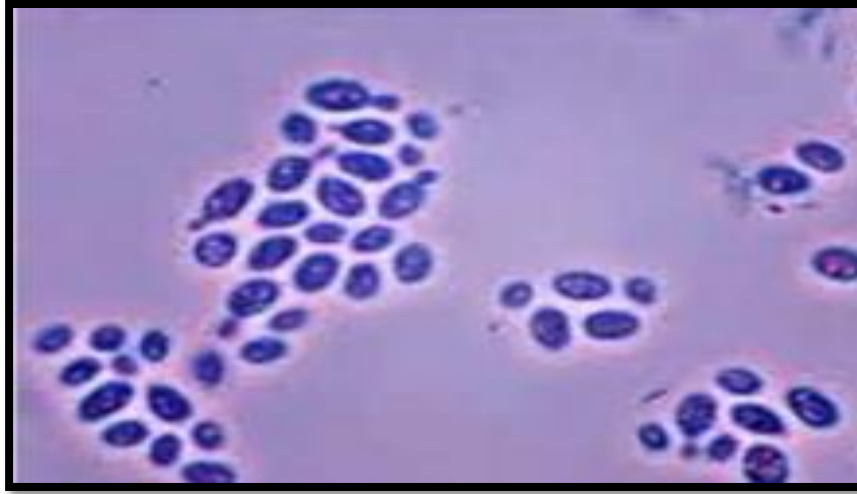


Figura 4-1: *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: (Robles , et al., 2012, p. 51)

Taxonomía

Tabla 1-3: Taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae*

Reino	<i>Hongo</i>
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Sacchaomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetaidae</i>

Fuente: (Carballo, 2000, p. 22)

1.7.1 Características macroscópicas

Saccharomyces cerevisiae su nombre genérico es levadura, se encuentran en especies que resultan beneficiosas y de utilidad especialmente para la industria. Las levaduras son hongos unicelulares que realizan el proceso de fermentación, la colonia de la levadura presenta un color crema o blanco, tiene un aspecto húmedo y brillante, sus formas son convexas, lisas, posee bordes irregulares, pueden variar de 2.5 a 21 micras de largo (Larone , 2011, pp. 143-146)



Figura 5-1: Colonias de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: (Rodríguez, 2016, p. 1)

1.7.2 Características microscópicas:

Las levaduras son organismos eucarióticos unicelulares, por lo tanto sus estructuras se encuentran constituidas por una pared celular, un núcleo diferenciado y organelos como ribosomas y mitocondrias, la formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas y el desarrollo de las mitocondrias dependen de las condiciones físico químicas y de la edad del cultivo (Tuite & Oliver , 1991, p. 272)

Saccharomyces cerevisiae tiene tanto la reproducción asexual y sexual. La reproducción asexual de los haploides de la levadura pasa por debajo de la mitosis y forma más haploides levaduras. Hay una A y á cepa de estos haploides, estas levaduras haploides, uno de cada cepa, pueden fusionarse y convertirse en la célula, a continuación los núcleos de las células fusibles y esta célula es ahora el cigoto.

Estas células diploides pueden ir a través de la mitosis, que llaman en ciernes, y cuatro más cigotos o pueden pasar por debajo de la meiosis y desde un asco, posteriormente se dividirá en cuatro ascosporas. Estos haploides pueden entonces bajo la germinación se convierten en la levadura haploide de nuevo. De acuerdo con las condiciones que se den podría suceder que la mayor parte pase por alguno de los 2 ciclos pero mayoritariamente se producen los dos simultáneamente

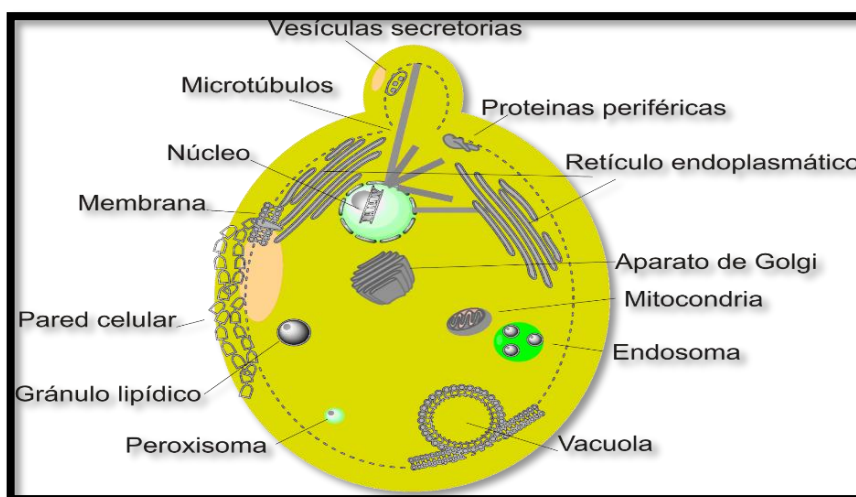


Figura 6-1: Microscopía de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: (Tracy, 1997, p. 1)

1.7.3 *Requerimientos para el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae requiere de ciertas condiciones ambientales para su crecimiento y desarrollo siendo el carbono uno de los principales fuente de energía y forma parte también de la masa celular. Otro elemento es el nitrógeno que se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, el fósforo presente en ácidos nucleicos, para que estos elementos sean aprovechados se requiere que se encuentren en forma asimilable. (Osipina & Palacios , 1994, pp. 23-29) .

El pH para un adecuado crecimiento de esta levadura es entre 4.0 y 5.0, no se logran desarrollar bien en un medio alcalino a excepción de que hayan realizado un proceso de adaptación, la temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. En un cultivo de levaduras la presencia de O₂ (efector externo químico) resulta beneficioso sea para producir biomasa (levaduras de panificación) o para producir alcohol etílico. (Tuite & Oliver , 1991, p. 272) .

1.8 Medio de cultivo Czapek

Este medio de cultivo se lo utiliza para multiplicar hongos, levaduras y bacterias del suelo, este medio sintético que contiene carbono y nitrógeno como únicas fuentes de carbono y nitrógeno correspondientemente, hay un excelente crecimiento de hongos y levaduras mientras que la

microflora del suelo solamente se logran desarrollar las bacterias que no son exigentes. (Sagardoy & Mandolesi, 2006, p. 40)

Tabla 1-4: Composición medio nutritivo Czapek

COMPONENTE	CANTIDAD
Nitrato sódico	3 g
Fosfato dipotásico	1 g
Sulfato magnésico	0.5 g
Cloruro potásico	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua estéril	1.000 ml

Fuente: (Moreno, 1988, p. 393)

Todos estos componentes se disuelven, se homogenizan en el agitador magnético, se esterilizan a 121°C por un período de 15 minutos posteriormente se distribuye en cajas Petri. El aspecto del medio de cultivo toma una coloración ámbar pálido, sólido, su pH final a 25 °C: 7.3 ± 0.2 y se puede alterar el pH añadiendo solución buffer fosfato.

1.9 Medio de cultivo Czapek Dox modificado.

La modificación respecto a la fórmula original consiste en reemplazar el sulfato magnésico y el fosfato dipotásico por Magnesio Glicerofosfato, con la finalidad de evitar la precipitación la del tri-Magnesio di-Fosfato. Cuando se requiere que el medio sea más selectivo para el desarrollo de hongos se puede agregar Estreptomicina a 30 mg/l o de Aureomicina a 2 mg/l que son inhibidores bacterianos con esta formulación se obtiene un pH de 6.2 ± 0.2

Tabla 1-5: Composición Czapek Dox modificado

COMPONENTE	CANTIDAD
Nitrato sódico	2 g
Glicerofosfato de magnesio	0.5 g
Cloruro potásico	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g

Sacarosa	30 g
Agar	12 g
Sulfato de potasio	0.35 g

Fuente: (Cultimed, 2003, pp. I-33)

1.10 Degradación de aceites a través de microorganismos.

Los microorganismos lipolíticos se han estudiado desde 1908, realizó un aislamiento de un microorganismo que produjo la rancidez de la leche y este microorganismo fue una bacteria a la que se la conoce *Bactridium lipolyticum*, algunos microorganismos filamentosos bacterias, hongos y levaduras son excelentes productores de lipasas. La lipasa es una enzima que se usa en el organismo para disgregar las grasas de los alimentos de manera que se puedan absorber.

Los microorganismos más investigados son: *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium restrictum*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Yarrowia lipolytica*, estos microorganismos son potenciales para actividades biorremediadoras y constituyen potenciales productores de lipasas.

Para los procesos degradativos de los aceites es posible utilizar biosurfactantes, microorganismos o los dos en conjunto, la acción principal de los biosurfactantes es reducir la tensión superficial en las interfaces constituidas por aceite agua, favoreciendo la separación en fases diferentes y la posterior recuperación de los hidrocarburos, en condiciones adecuadas facilitara a que se fragmenten las cadenas químicas de hidrocarburos y se desactiven sus propiedades.

Algunos sustratos en algunos estudios realizados se han utilizado para lograr detección de microorganismos con actividad lipolítica, dentro de estos sustratos encontramos grasas de tipo animal y vegetal además también triglicéridos sintéticos como el tributirin y trioleina, y otros esterios sintéticos como los Tween (esterios de sorbitan polioxietileno) y esterios de metilumbeliferil (Shelley , et al., 1987, p. 125)

Se usan tintes indicadores que se agregan al medio para determinar la actividad lipolítica, entre los indicadores más utilizados están: Victoria Blue, Night Blue y Nile Blue Sulphate. Cuando se liberan los ácidos grasos libres existe un cambio en la coloración de los tintes indicando la actividad lipolítica, pero existen estudios en los que se determina que hay un grado de toxicidad de los tintes (Fryer, et al., 1967, p. 480).

Sin embargo se realizó un nuevo procedimiento en el que se dejó crecer los microorganismos 72 horas a una temperatura de 30°C en agar Nutritivo, para posteriormente cubrir el agar con el tinte Victoria Blue Grasa de Leche para finalmente leer las placas de 3-6 días después que se ha realizado la incubación a una temperatura de 22°C, pese a que esta metodología es aceptada existen dos inconvenientes.

Al realizar esta técnica las colonias no pueden ser aisladas ni utilizadas para posteriores estudios y no existe un seguimiento adecuado acerca de la actividad lipolítica que ejercen estos microorganismos porque no se realizó un registro desde el inicio de la incubación (Fryer, et al., 1967, pp. 621-634) La observación directa en zonas más claras y turbias que rodean la colonia de la colonia, el apareamiento de cristales dentro de gotas del sustrato sobre la superficie del agar (Shelley , et al., 1987, p. 127)

El sustrato emulsificado que más se usa es el tributirin, este sustrato tiene un beneficio importante ya que resulta sencillo incorporarse en los medios de cultivo y verificar la transparencia de las reacciones de hidrólisis. Las lipasas hidrolizan el tributirin a dibutirin, monobutirin, glicerol y ácido butírico, todos estos se solubilizan en agua y producen una coloración clara alrededor de la colonia lipolítica en la emulsión de opaca (Shelley , et al., 1987, p. 129)

En el año de 1968 la British Standard Institution, aceptó el procedimiento en el que se aplicó el 1% Agar tributirin, como método estándar para la identificación de microorganismos lipotícos en la detección en grasas en estado sólido. Y el American Public Health Association (APHA) 2001, ha incorporado el uso de tributirin al 1% para el conteo de microorganismos que son productores de lipasas.

El uso de Tweens tiene aprobación como sustratos para lipasas en determinados microorganismos, los tweens poseen una alta solubilidad, y son esterres de ácidos grasos de un polioxialquileño derivado de sorbitan, existen variedades de tweens y sus diferencias radican en el particular componente de ácido graso el cual lo constituyen. Los polisorbatos pueden incrementar la absorción de parafina líquida y otras sustancias liposolubles.

Tween 40 es un éster de ácido palmítico, el tween 60 es un éster de ácido esteárico y el tween 80 es un éster de ácido oléico. Los Tweens son sustancias que poseen alta estabilidad en diluciones alcalinas y en soluciones acidas minerales, también son sustancias neutras y no-volátiles, presentan estabilidad ante el calor. Las dosificaciones de los tweens como emulsificantes y solubilizantes: 1 – 15 % y como humectantes: 0,1 – 3 %. (Sierra , 1957, pp. 15-22)

El texapón o genapón es utilizado para que las grasas puedan ser arrastradas con el agua de aclarado, este suele incrementar la viscosidad de la mezcla, evita que los detergentes se descompongan. El emulsificante ayuda a disolver algunos componentes poco solubles en agua de la mezcla. Texapón o Genapón son nombres comerciales de distintos detergentes empleados en estas formulaciones.

En la investigación del tema “Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*” se realizó la preparación de 10, 20 y 30 % de aceites residuales vegetal y de lubricante en este estudio se realizaron mediciones de la cinética de crecimiento a través del método de densidad óptica midiendo el índice de transmitancia. (Marquez, et al., 2015, p. 90)

Biodegradación este procedimiento fue aplicado por el método del consumo lipídico en el que se había pesado previamente el matraz con medio Czapekdox+ARU (vegetal y lubricante) y por diferencia de peso inicial versus final (tratado) por 20 días a 28 a 30°C. La biodegradación se determinó por el índice de degradación (I.D) en el que juega un papel importante la concentración de la emulsión y la absorción leída.

Se determinó que las tres especies fúngicas que crecen en presencia de aceites residuales como única fuente de carbono, estas cuentan con el sistema enzimático para la degradación y/o transformación de este tipo de sustancias. Siendo la concentración óptima de los aceites residuales en el medio de cultivo Czapekdox de 10% v/v que garantiza el mayor crecimiento de las especies fúngicas *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* Y *Saccharomyces cerevisiae*.

Se demostró que los aceites residuales presentan cambios significativos de sus propiedades físicas fundamentales mientras que en la composición química del aceite vegetal residual no se observó cambios significativos en el perfil de ácidos grasos después del biotratamiento, con la excepción del ácido linolenico el cual presentó una ligera disminución en presencia de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se demostró que *Aspergillus niger* es la cepa fúngica que posee mayor potencial biodegradador de aceites residuales usados, ya que el mismo obtuvo los valores más altos en el incremento de la biomasa y productividad tanto para el ARUV como para ARUL obteniéndose un porcentaje de rendimiento en consumo del lípido de 61,74% ($\pm 0,16$) para ARUV y 59,69% ($\pm 0,6$) ARUL . (Marquez, et al., 2015, p. 90)

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Hipótesis y especificación de las variables

2.1.1 *Hipótesis General:*

- La capacidad para degradar aceites vegetales residuales utilizando el hongo *Aspergillus niger* es mayor a la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.2 *Hipótesis Específicas:*

- Las características físico-químicas del aceite vegetal residual influyen en la acción microbiológica del hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Es posible realizar el crecimiento y acondicionamiento del hongo *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio
- El hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen capacidad de degradar los aceites vegetales residuales generados en el proceso de frituras.
- Las características físico-químicas del aceite vegetal residual influyen en su tratamiento con microorganismos *Aspergillus niger* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Tipo y Diseño de Investigación

Por el diseño de investigación es experimental para el cual se realizó un diseño de bloques completamente al azar DBCA para las pruebas en el laboratorio en lo referente la determinación de biomasa y biodegradación de aceite vegetal procedente de la actividad de frituras de alimentos, antes y después del tratamiento aplicado con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente.

Por el tipo de investigación es aplicada, porque se persigue un fin directo e inmediato el cual propuso la biodegradación de los aceites vegetales procedentes del proceso de fritura mediante la aplicación de los tratamientos utilizando del hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para determinar cuál es el microorganismo que mayormente degrada los aceites usados.

Por temporalidad es longitudinal, mediante esta investigación se obtuvieron datos a lo largo de la investigación en períodos de tiempo concretos los mismos que determinan una evaluación con respecto a las variaciones del aceite vegetal procedente del proceso de frituras antes y después de aplicar el tratamiento con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las variaciones se determinaron en las propiedades físico químicas de los aceites.

Por el tipo de enfoque son cualitativo y cuantitativo. Cualitativo porque se recolectó datos sin medición numérica que demuestran las características de adaptabilidad de *Aspergillus niger* y de *Saccharomyces cerevisiae*. Es cuantitativo porque se va a recolectar datos físicos, químicos antes y después del proceso de biodegradación, datos recolectados durante el período: abril 2016-enero de 2017

2.3 Unidad de análisis

- Aceite vegetal procedente de frituras antes de aplicar el tratamiento
- Microorganismos (*Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*)
- Aceite vegetal procedente de frituras después del tratamiento

2.4 Población de estudio

El lugar de estudio se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias Pecuarias en el Laboratorio de Biotecnología animal y en la Facultad de Ciencias en el

laboratorio de Química Analítica donde se realizaron los procedimientos para la biodegradación de aceites vegetales procedentes de fritura los mismos que se trasladaron desde el cantón Loreto, los análisis de los perfiles de ácidos grasos se los determinó en el Laboratorio del INIAP

El restaurante “El turista” ubicado en el Cantón Loreto Provincia de Orellana realiza el cambio de aceite que ha sido utilizado en el proceso de frituras cada 7 días, la actividad del mismo genera unos 20 litros de aceite de frituras en el periodo de 30 días, estos aceites desechados hacia los colectores de basura en envases plásticos ocasionando la contaminación de los recursos naturales (suelo, agua), una pequeña cantidad es eliminada por los desagües.

El Cantón Loreto se encuentra ubicado en la parte oeste de la provincia de Francisco de Orellana, se encuentra a unos 60 km de la capital provincial, limita al norte, sur y oeste con la provincia del Napo, y al este con el cantón Orellana. La temperatura oscila de 20°C a 30°C, el clima en la zona baja, es lluvioso tropical, en la zona intermedia es lluvioso templado y en la zona alta es lluvioso frío, con precipitaciones que van desde 5.000 a 6.000 mm.

2.5 Tamaño de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 3 litros aceite vegetal procedente de frituras para la determinación de ensayos en los laboratorios.

2.6 Selección de la muestra

- Por lo que se tomaron 1.00 litros de aceites en cada muestreo por lo que se obtuvieron un total de 3 litros de aceite vegetal procedente de frituras tomados durante 3 semanas.
- cepa de *Aspergillus niger*
- cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

2.7 Esquema del Proceso

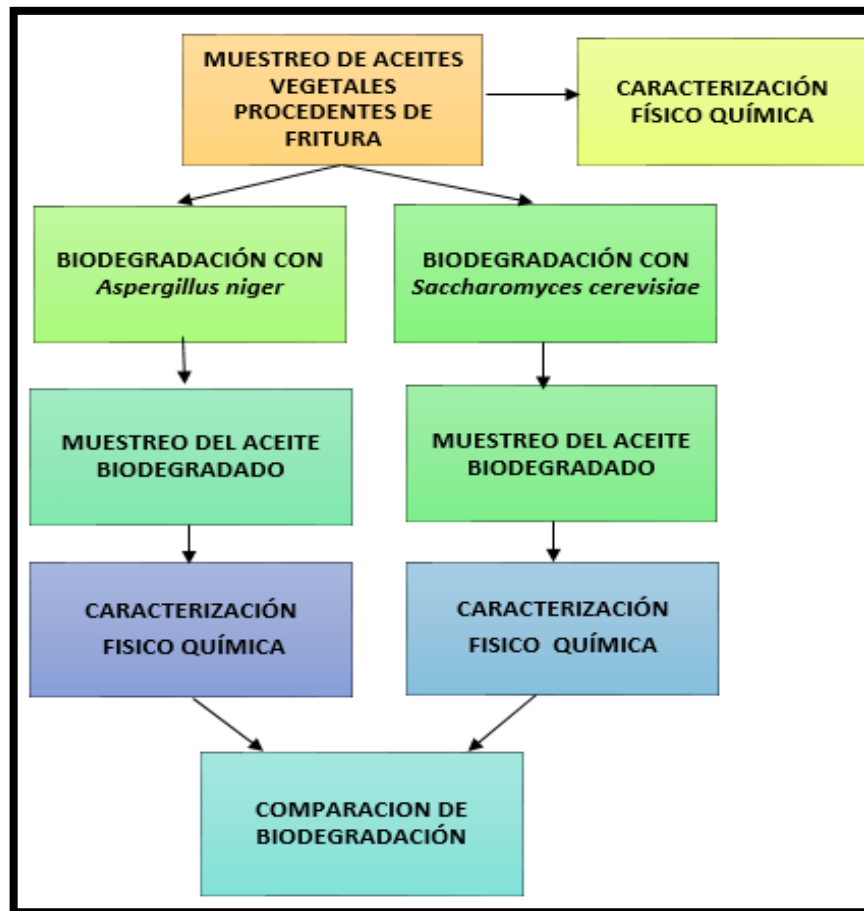


Figura 1-2: Esquema general del proceso

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

2.7.1 Fase de muestreo de aceites vegetales procedentes de frituras

2.7.1.1 Método

Mediante un entrevista que se la realizó al Sr. Neldon Agila propietario del Restaurant “El Turista” se determinó que el cambio de aceite se lo hacía cada 7 días cada sábado por lo que se realizó el muestreo de 1.00 litro de aceite vegetal este proceso se lo repitió durante 3 semanas obteniéndose un volumen total de 3 L cada muestreo se realizó a las 6:00 am hora en la que el aceite de encuentra a temperatura ambiente, se recolectaron datos del pH temperatura del aceite.

Colocado el equipo de protección se realizó el muestreo de forma manual identificando las muestras como: muestra 1 (M1): aceite vegetal de frituras en la semana 1, fecha 9 de abril de 2016, muestra 2 (M2): aceite vegetal de frituras en la semana 2 fecha 16 de abril de 2016, muestra 3 (M3): aceite vegetal de frituras en la semana 3 fecha 23 de abril de 2016 para el etiquetado de cada muestra. Se llenaron campos ver Anexo H.

Los frascos en los que se realizó la recolección de las muestras estuvieron previamente lavados y bien secos, el transporte se realizó en un cooler con gel hielo y las muestras fueron finalmente almacenadas en refrigeración a 4°C en el laboratorio de Biotecnología animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, hasta el momento de su utilización.

Tabla 1-2 : Tabla de materiales y reactivos utilizados

Materiales	Equipos	Reactivos
Aceite vegetal procedente de frituras	Agitador magnético	Agar
Agua estéril	Agitador orbital	alcohol
Algodón	Autoclave	Cloranfenicol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Asa de siembra	Balanza analítica	Cloruro de potasio KCl
Bolsas de tela	Cámara de calor	Fosfato dipotásico K_2HPO_4
Cajas petri	Espectrofotómetro	Glicerofosfato de magnesio $C_3H_7O_2PO_4Mg$
Cepas de <i>Aspergillus niger</i>	Incubadora	Nitrato sódico $NaNO_3$
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mechero	Sulfato ferroso $FeSO_4$
Cooler	Refrigeradora	Sulfato de potasio K_2SO_4
Esfero tinta indeleble	Sorbona	Sulfato magnésico $MgSO_4$
Espátula	Viscosímetro	Texapón
Etiquetas		
Frasco de vidrio con tapa de 150 mL		
Frascos de vidrio color ámbar 1L		

Frascos de vidrio color ámbar de 30 mL
Frascos de vidrio de 300 mL con tapa
Gasa
Gel hielo
Gradillas
Guantes
Mandil
Marcador
Mascarilla
Matraces de 500 mL
Mechero
Papel aluminio
Parafilm
Pipetas de 10 mL
Recipiente plástico de 5 litros
Termómetro
Tiras medidoras de Ph
Tubos de ensayo

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

2.7.2 Caracterización físico química del aceite vegetal procedente de frituras antes y después del tratamiento

2.7.2.1 Método

Se colocaron las muestras simples del aceite vegetal procedente de frituras en el recipiente plástico de 5 litros, se homogenizó la muestra, se filtró el aceite, se registraron datos de pH, temperatura, se tomaron 500 ml de la muestra compuesta y se realizaron los análisis de densidad con el método del picnómetro y viscosidad los 2.5 litros restantes se almacenaron en la botella ámbar en refrigeración.

Posteriormente se tomaron 15 ml de aceite vegetal procedente de frituras antes del biotratamiento, el mismo se colocó en un frasco ámbar y fue enviado al laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias donde se realizaron análisis químicos del aceite vegetal procedente de frituras. Ver anexo A

Luego del tratamiento con El Hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se tomó una muestra de 15 ml correspondiente de cada tratamiento y se realizó los análisis de densidad con el método del picnómetro y viscosidad con el viscosímetro rotatorio. Ver Anexo J. Luego del biotratamiento se tomaron 15 ml de aceite vegetal procedente de frituras, el mismo se colocó en un frasco ámbar y fue enviado al laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias donde se realizaron análisis químicos del aceite vegetal procedente de frituras. Ver anexo A

2.7.3 Adaptación del Hongo *Aspergillus niger* en medio czapek sólido con aceite vegetal procedente de frituras

2.7.3.1 Método

Se preparó el medio de cultivo czapek para lo cual se utilizaron: el nitrato sódico NaNO_3 , el fosfato dipotásico K_2HPO_4 , sulfato magnésico MgSO_4 , cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , agar, (ver anexo D) el aceite vegetal de frituras que fue sustituido en vez de sacarosa de la fórmula original del medio de cultivo czapek, a esta mezcla se le incorporó Texapón como gel emulsificante y cloranfenicol.

Todos estos componentes se utilizaron con 100 mL de agua estéril, posteriormente se colocó en el agitador magnético para homogenizar los componentes del medio de cultivo alrededor de 8 minutos estuvieron en el agitador, se midió el pH mediante tiras medidoras de pH, en una bolsa de tela se colocaron las cajas Petri, y en otra bolsa de tela se colocó el medio de cultivo y se procedió a esterilizar en el autoclave.

Se desinfectó del área de trabajo y de la Sorbona, una vez que salieron las cajas petri y el cultivo estériles se trabajó en la sorbona se distribuyó el contenido del medio de cultivo en las cajas, se rotularon las cajas, solidificó el medio, se desinfectó el asa de siembra, se sembró el hongo *Aspergillus niger*, se colocó parafilm alrededor de las cajas de petri y se incubó en un periodo de 7 días.

2.7.4 Adaptación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio czapek solido con aceite vegetal procedente de frituras.

2.7.4.1 Método

Se preparó el medio de cultivo czapek para lo cual se utilizaron: el nitrato sódico NaNO_3 , el fosfato dipotásico K_2HPO_4 , sulfato magnésico MgSO_4 , cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , agar, aceite vegetal de frituras que fue sustituido en vez de sacarosa de la fórmula original del medio de cultivo czapek, (ver anexo D) a esta mezcla se le incorporó Texapón como gel emulsificante y cloranfenicol.

Todos estos componentes se utilizaron con 100 mL de agua estéril, posteriormente se colocó en el agitador magnético para homogenizar los componentes del medio de cultivo alrededor de 8 minutos estuvieron en el agitador, se midió el pH mediante tiras medidoras de pH, en una bolsa de tela se colocaron las cajas Petri, y en otra bolsa de tela se colocó el medio de cultivo y se procedió a esterilizar en el autoclave.

Se desinfectó el área de trabajo y de la sorbona, una vez que salieron las cajas petri y el cultivo estériles se utilizó la sorbona se distribuyó el contenido del medio de cultivo en las cajas y se rotularon, solidificó el medio, se desinfectó el asa de siembra, se sembró el *Saccharomyces cerevisiae*, se colocó parafilm alrededor de las cajas de petri y se incubó en un periodo de 8 días.

2.7.5 Crecimiento del hongo *Aspergillus niger* en medio líquido con aceite vegetal procedente de frituras.

2.7.5.1 Método

Se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado con los reactivos el nitrato sódico NaNO_3 , glicerofosfato de magnesio $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , sulfato de potasio K_2SO_4 , el aceite vegetal procedente de frituras reemplazó a la sacarosa, posteriormente se le añadió Texapón y cloranfenicol. Los Cálculos para la elaboración el medio czapek sólido para 234 mL de agua para 26 tubos de ensayo con 9ml de compuesto en cada tubo (ver anexo F).

Consecutivamente se usó el agitador magnético para homogenizar los componentes del medio de cultivo en un periodo de 8 minutos, se midió el pH mediante tiras medidoras de pH, se colocaron

en una bolsa de tela los tubos de ensayo previamente rotulados y se colocaron sus respectivos tapones de gasa-algodón, las pipetas, y en otra bolsa se tela se procedió a esterilizar en el medio de cultivo en el autoclave.

Se desinfectó el área de trabajo y de la sorbona, una vez que salieron los tubos de ensayo se colocaron en la gradilla, se esperó que el medio adquiera temperatura ambiente luego se agregó *Aspergillus niger*, se agitó y se procedió a distribuir el medio con el microorganismo en los 26 tubos rotulados y en los frascos de vidrio con tapa, Se realizó de medición de la capa de aceite en cada tubo.

Luego se incubaron en una cámara de calor a una temperatura constante y se mantuvo en agitación constante con el agitador orbital, se tomaron datos cualitativos (olor, color del aceite) y cuantitativos (densidad óptica) por un periodo de 25 días.

En otros 4 matraces se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado con los reactivos el nitrato sódico NaNO_3 , glicerofosfato de magnesio $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , sulfato de potasio K_2SO_4 , se reemplazó la sacarosa por el aceite vegetal procedente de frituras por una mezcla de aceite de frituras más texapón en un relación 60-40 utilizando 27mL de este compuesto al que se le añadió Texapón y cloranfenicol. Ver anexo G

Se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado pesando los siguientes reactivos: 0.5 g de NaNO_3 , 0.125 g de $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, 0.125 g de KCl , 0.00234 g de FeSO_4 , 0.0875 g de K_2SO_4 reemplazando los 7.02 g de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ por una mezcla de aceite de frituras más texapón en un relación 60-40 utilizando 27 ml de este compuesto, posteriormente se agrega media capsula de $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ (cloranfenicol).

Todos estos componentes en un frasco de vidrio con tapa se aforó con agua destilada hasta alcanzar los 250 ml, posteriormente se colocó el frasco de vidrio tapado en el agitador magnético durante 8 minutos, se registró el pH posteriormente se tapó el matraz de 500 ml con un tapón elaborado con gasa y algodón el tapón fue cubierto por papel aluminio el matraz fue colocado en una bolsa de tela para su posterior esterilización.

Una vez que salió estéril el material se esperó hasta que adquiera temperatura ambiente y se inoculó el *Aspergillus niger* 0.05 g en cada uno de los matraces se taparon los matraces con los tapones de gasa-algodón y se colocó como capuchón papel aluminio, este material se llevó a la cámara de calor a 32 °C y en el agitador orbital se mantuvieron durante 25 días realizando observaciones periódicas.

Una vez transcurridos los 25 días se dejó en reposo se midió la cantidad de aceite presente después de aplicado el tratamiento dando 25 mL (capa lipídica final), posteriormente se tomaron 15 mL de aceite tratado, los mismos se colocaron en un frasco ámbar y fue enviado al laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias donde se realizaron análisis de los ácidos grasos. Ver anexo A

Cálculo Incremento de la Biomasa (I.B)

$$I.B = \frac{x_f - x_t}{x_f} * 100 \quad \text{Ecuación 1-2}$$

Donde:

Xf= Biomasa final;

Xi= Biomasa Inicial.

(Ver resultados Anexo K)

Índice de Degradación (I.D)

$$ID = \frac{x_i}{x_t} * 100 \quad k \quad \text{Ecuación 2-2}$$

$$k = \frac{A\lambda}{C * e} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Donde:

Xi= capa lipídica inicial;

Xf= capa lipídica final

Aλ= absorción leída

C= concentración de la disolución leída

e= espesor de la cubeta en cm

(Ver resultados Anexo L)

2.7.6 Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido con aceite vegetal procedente de frituras

2.7.6.1 Método

Se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado con los reactivos el nitrato sódico NaNO_3 , glicerofosfato de magnesio $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , sulfato de potasio K_2SO_4 , se reemplazó la sacarosa por el aceite vegetal procedente de frituras por una mezcla de aceite de frituras más texapón en un relación 60-40 utilizando 27 ml de este compuesto al que se le añadió Texapón y cloranfenicol como para ejercer control bacteriano. (ver anexo F)

Consecutivamente se usó el agitador magnético para homogenizar los componentes del medio de cultivo czapek dox modificado se midió el pH, en una bolsa tela los tubos de ensayo con sus respectivos tapones de gasa-algodón, las pipetas, y en otra bolsa se tela se procedió a esterilizar en el medio de cultivo en el autoclave. Se desinfectó el área de trabajo y de la sorbona, una vez que salieron los tubos de ensayo se colocaron en la gradilla y se rotularon.

Luego se agregó *Saccharomyces cerevisiae* en el medio de cultivo estéril y frío, se agitó y se procedió a distribuir el medio con el microorganismo en los tubos rotulados y en los frascos de vidrio con tapa, posteriormente se incubaron en una cámara de calor y se mantuvo en agitación constante con el agitador orbital, se tomaron datos cualitativos (color, olor) y cuantitativos (densidad óptica)

En otros 4 matraces se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado con los reactivos el nitrato sódico NaNO_3 , glicerofosfato de magnesio $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, cloruro de potasio KCl , sulfato ferroso FeSO_4 , sulfato de potasio K_2SO_4 , se reemplazó la sacarosa por el aceite vegetal procedente de frituras por una mezcla de aceite de frituras más texapón en un relación 60-40 utilizando 27 ml de este compuesto al que se le añadió Texapón y cloranfenicol. (ver anexo G)

Se elaboró el medio de cultivo czapek-dox modificado pesando los siguientes reactivos: 0.5 g de NaNO_3 , 0.125 g de $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$, 0.125 g de KCl , 0.00234 g de FeSO_4 , 0.0875 g de K_2SO_4 reemplazando los 7.02 g de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ por una mezcla de aceite de frituras más texapón en un relación 60-40 utilizando 27 ml de este compuesto posteriormente se añade media capsula de $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ (cloranfenicol)

Todos estos componentes en un frasco de vidrio con tapa se aforó con agua destilada hasta alcanzar los 250 ml, posteriormente se colocó el frasco de vidrio tapado en el agitador magnético durante 8 minutos, se registró el pH, posteriormente se tapó el matraz de 500 ml con un tapón

elaborado con gasa y algodón el tapón fue cubierto por papel aluminio el matraz fue colocado en una bolsa de tela para su posterior esterilización.

Una vez que salió estéril el material se esperó hasta que adquiriera temperatura ambiente y se inoculó *Saccharomyces cerevisiae* 0.05 g cada uno de los matraces se taparon los matraces con los tapones de gasa-algodón y se colocó como capuchón papel aluminio, este material se llevó a la cámara de calor a 32 °C y en el agitador orbital se mantuvieron durante 25 días realizando observaciones periódicas.

Transcurridos los 25 días se dejó en reposo se midió la cantidad aceite presente después de aplicado el tratamiento dando 25,5 mL, posteriormente se tomaron 15 ml de aceite tratado y se colocaron en un frasco ámbar y en un cooler transportador con gel hielo la muestra fue enviada al laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias donde se analizaron análisis de los ácidos grasos. Ver anexo A

Cálculo Incremento de la Biomasa (I.B)

$$I.B = \frac{x_f - x_t}{x_f} * 100 \quad \text{Ecuación 1-2}$$

Dónde:

Xf= Biomasa final;

Xi= Biomasa Inicial.

(Ver resultados Anexo K)

Índice de Degradación (I.D)

$$ID = \frac{x_i}{x_t} * 100 \quad \text{Ecuación 2-2}$$

$$k = \frac{A\lambda}{C * e} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Dónde:

Xi= capa lipídica inicial;

Xf= capa lipídica final

Aλ= absorción leída

C= concentración de la disolución leída

e= espesor de la cubeta en cm

(Ver resultados Anexo)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de Resultados

3.1.1 Fase de muestreo de aceites vegetales procedentes de frituras

En el proceso de muestreo del aceite vegetal procedente de frituras se procedió a ubicar los puntos de muestreo en el Restaurante “El Turista” ubicado en el cantón Loreto, se procedió a tomar tres muestras representativas de 1 litro con los estándares de seguridad, se transportaron en cooler con gel hielo en botellas ámbar para su conservación.

Se tomaron datos físicos como pH, temperatura, en el laboratorio en el Biotecnología animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH. Los datos tomados de la primera muestra de aceite vegetal procedente de frituras fue de pH 5 y Temperatura de 16°C, la segunda muestra arrojó un pH de 5 y temperatura de 17°C y la tercera muestra tuvo un pH de 5 y Temperatura de 16°C cada muestreo se lo realizó a las 6 am por lo que a esa hora se encuentra temperatura ambiente y no existía actividad en el lugar.

3.1.2 *Caracterización físico del aceite vegetal procedente de frituras antes y después de la biodegradación*

El resultado del parámetro físico del aceite antes de someterse al tratamiento presentó una densidad de 0,901 g/cm³ y la viscosidad fue de 138.87 η Poise.

Después del tratamiento disminuye con el Hongo *Aspergillus niger* a una densidad de 0.876 g/cm³ y la viscosidad fue de 138.34 η Poise esto se debe que además del caldo microbiano la adición de texapon altera significativamente las propiedades físicas, su coloración fue menos turbia de la muestra inicial.

Con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presento una densidad de 0.866 g/cm^3 y la viscosidad fue de $138.22 \text{ } \eta \text{ Poise}$ esto se debe que además del caldo microbiando la adición de texapon altera significativamente las propiedades físicas y presento una coloración menos turbia y de color amarillo claro.

En las muestras iniciales el aceite de frituras proveniente del muestreo presento un olor característico fuerte y desagradable. Después del tratamiento su olor fue característico para cada uno de los tratamientos su intensidad fue baja y soportable (Ver Anexo J).

3.1.3 Caracterización química del aceite vegetal procedente de frituras antes y después de la biodegradación

En base a los análisis obtenidos del aceite vegetal proveniente de frituras los ácidos grasos más significativos sus unidades son en porcentaje y también se procedió a realizar una réplica de cada uno de estos.

Los ácidos grasos de la primera muestra de aceite vegetal proveniente de frituras Ácidos Grasos ; Mirístico 0,41, Ácido Palmítico 29,69, Ácido Palmitoléico 1,07, Ácido Heptadecanoico 0,13, Ácido Esteárico 4,69, Ácido Oléico 32,61, Ácido Araquídico 0,91, Ácido cis-11 Eicosanoico 0,63, Ácido Linolénico 2,82.

Cabe destacar que cada uno de ellos son independientes y su composición varía en porcentaje. Así que se clasifica en base a los resultados obtenidos y se hace un análisis:

1. Primera muestra: Aceite vegetal proveniente de frituras su titulación es AcFr
2. Segunda muestra: Aceite vegetal proveniente de frituras con el medio de cultivo y el emulsificante cuya titulación es Em.
3. Tercera muestra: Tratamiento con el hongo *Aspergillus niger* y su titulación es Asp.
4. Cuarta muestra: Tratamiento con *Saccharomyces cerevisiae* y su titulación es Scc.

A partir de los resultados obtenidos hacemos una comparación a cada uno de los ácidos grasos.

Ácido Mirístico

La concentración inicial del Ácido Mirístico en el aceite de frituras es 0,41 % (concentración máxima) en la segunda muestra (emulsión) es de 0,32 % se hace una solución menos concentrada por la mezcla con el medio de cultivo. Según los tratamientos aplicados: para *Aspergillus niger* es de 0,41 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,44 %, ninguno de los dos tratamientos fue eficiente ya que en el primero se mantiene y en el segundo aumenta su concentración.

Ácido Palmítico

La concentración inicial del Ácido Palmítico en el aceite de frituras es 20,69 %, la segunda muestra (emulsión) es de 22,68% esta concentración aumenta 2,01 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Según los tratamientos aplicados obtenemos: para *Aspergillus niger* es de 20,63% y para *Saccharomyces cerevisiae* 21,38 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente se redujo un 0,06 % y en el segundo hubo un incremento de este ácido en 0,69 %.

Ácido Palmitoléico

La concentración inicial del Ácido Palmitoléico en el aceite de frituras es de 1,07 % es la concentración máxima, en la segunda muestra (emulsión) es de 0,79 % se hace una solución menos concentrada posiblemente por la acción del gel emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 1,05 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 1,10 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente se redujo un 0,02 % y en el segundo hubo un incremento de este ácido en 0,03 %.

Ácido Heptadecanoico

La concentración inicial del Ácido Heptadecanoico en el aceite de frituras es de 0,13 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 0,17 % esta concentración aumenta en un 0,04 % posiblemente por la reacción del agente emulsificante. Finalmente, según los tratamientos aplicados obtenemos los siguientes valores: para *Aspergillus niger* es de 0,12 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,13 %, en base a estos resultados determinamos que la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente ya que se redujo un 0,01 % y en el segundo se mantuvo la concentración de 0,13 %.

Ácido Esteárico

La concentración inicial del Ácido Esteárico en el aceite de frituras es de 4,69 %, en la segunda muestra (emulsión) es de 8,88 % esta concentración aumenta en un 4,19 % este incremento se debe posiblemente a la composición del agente emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 4,60 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 4,69 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente ya que se redujo un 0,09 % y en el segundo se mantuvo la concentración de 4,69 %.

Ácido Oléico

La concentración inicial del Ácido Oléico en el aceite de frituras es de 32,61 %, la segunda muestra (emulsión) es de 34,89 % esta concentración aumenta probablemente a la presencia de texapón, Para *Aspergillus niger* es de 33,35 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 32,79 %, la concentración con el primer tratamiento se incrementó 0,74 % y en el segundo aumentó la concentración de 0,18 % por lo tanto los dos tratamientos fueron ineficientes para la reducción de este ácido graso

Ácido Linoléico

La concentración inicial del Ácido Linoléico en el aceite de frituras es de 34,18 %, la segunda muestra (emulsión) es de 26,82 % esta concentración disminuye 7,36 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Para *Aspergillus niger* es de 34,24 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 33,47%, en base a estos resultados determinamos que la concentración con el primer tratamiento aumento 0,06 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,71 %, el segundo tratamiento es más eficiente.

Ácido Araquídico

La concentración inicial del Ácido Araquídico en el aceite de frituras es de 0,91 %, la segunda muestra (emulsión) es de 0,53 % esta concentración disminuye 0,38 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Para *Aspergillus niger* es de 0,67 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,98 %, que la concentración con el primer tratamiento disminuyo 0,24 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,07 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

Ácido cis-11 Eicosanoíco

La concentración inicial del Ácido cis-11 Eicosanoico en el aceite de frituras es de 0,63 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 0,46 % esta concentración disminuye 0,17 % posiblemente por la compatibilidad con el agente emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 0,56 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,60 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyo 0,07 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,03 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

Ácido Linolénico

La concentración inicial del Ácido Linolénico en el aceite de frituras es de 2,82 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 1,97 % esta concentración disminuye 0,85 % posiblemente por la compatibilidad del gel emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 2,66 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 2,65 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyó 0,16 % y en el segundo disminuyó la concentración en 0,17 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

3.1.4 Adaptación del Hongo Aspergillus niger y la levadura Saccharomyces cerevisiae en medio sólido con aceite vegetal procedente de frituras.

La adaptación del hongo *Aspergillus niger* al medio sólido se realizó una réplica para obtener colonias puras y se procedió al almacenamiento estas colonias, fueron controladas en sus requerimientos físicos y nutritivos diariamente.

Se evidenció adaptabilidad positiva ya que se constató a los 7 días crecimiento del hongo y presentó una coloración negra característica del mismo.

El crecimiento del hongo *Aspergillus niger* en medio sólido con aceite de fritura no existió un mayor cambio en proceso de crecimiento del hongo, notándose el incremento normal, su crecimiento fue de 90% en el medio de cultivo.

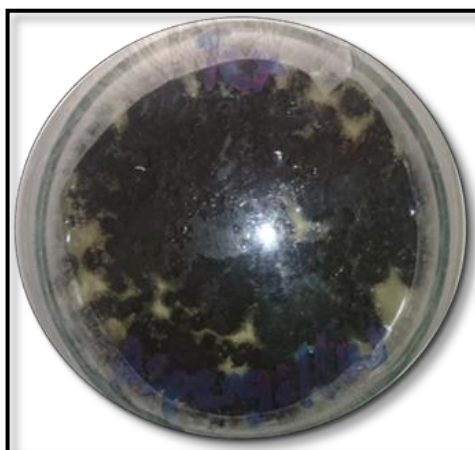


Figura 1-3: Adaptación del hongo *Aspergillus niger* en medio sólido con aceite vegetal procedente de frituras.

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

El crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio sólido con aceite de fritura fue normal y no hubo mayor cambio en el medio de cultivo, notándose el incremento normal de la levadura (colonias), sin embargo su crecimiento fue de 75% en el medio.

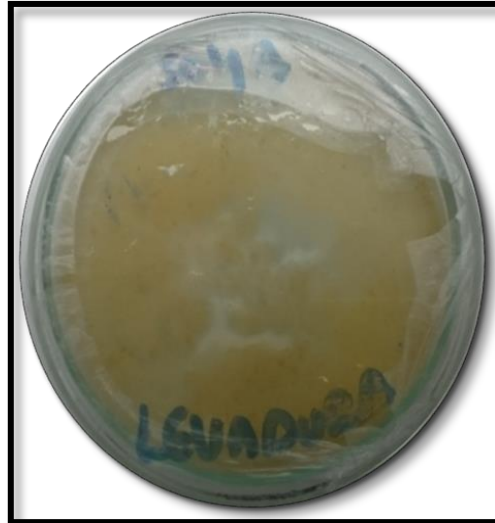


Figura 2-3: Adaptación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio sólido con aceite de fritura

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

En condiciones controladas en la estufa tomando en cuenta la temperatura óptima para el crecimiento que es de 32°C, el periodo de crecimiento tuvo una duración de 7 días desde las réplicas del hongo y levadura respectivamente en el medio sólido con aceite vegetal procedente de frituras.

3.1.5 Crecimiento del Hongo *Aspergillus niger* en medio líquido con aceite vegetal procedente de frituras.

El crecimiento del Hongo *Aspergillus niger* con el caldo czapek-dox modificado y la emulsión requirió de condiciones controladas, el cual tuvo un lapso de tiempo necesario para su desarrollo de 25 días y agitación constante en la cámara de calor desde su inoculación. Para el tratamiento se tomó una muestra testigo la cual no fue inoculada para evidenciar si existía algún tipo de contaminación su color era amarillento, olor a comida descompuesta y su aspecto fue turbio claro. Para evidenciar sus características se tomó un tubo de muestra designado para cada día.

Se constató que el día 1-8 presento un color Marrón coloración amarillenta oscura, olor a comida descompuesta su aspecto fue turbio.

Pasando los 9-18 días tuvo un color Marrón sin agitar se eleva el aceite y presenta coloración amarillenta más clara, se redujo el mal olor y su aspecto fue turbio.

Luego de haber transcurrido un periodo de 25 días de crecimiento con el Hongo *Aspergillus niger* en medio líquido con aceite vegetal proveniente de frituras se constató un color amarillento clara casi transparente sin presencia de olor.

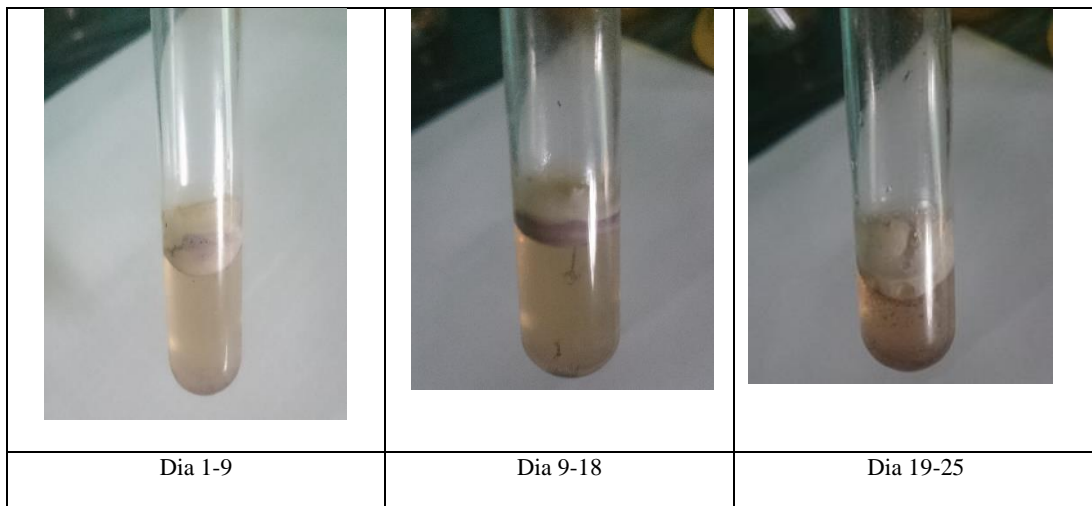


Figura 3-3: Crecimiento el Hongo *Aspergillus niger* en caldo czapek dox modificado con aceite vegetal proveniente de frituras en 9ml de muestra.

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

3.1.6 Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido con aceite vegetal proveniente de frituras.

Se constató el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el caldo czapek-dox modificado y la emulsión requirió de condiciones controladas, el cual tuvo un tiempo de desarrollo de 25 días y agitación constante en la cámara de calor desde su inoculación. De la misma manera para este tratamiento se tomó una muestra testigo no fue inoculada para evidenciar si existió algún tipo de contaminación su coloración era amarillenta olor a comida descompuesta y su aspecto era turbio claro.

Los resultados del crecimiento durante los 25 días se constató que el día 1-9 presento un color Marrón presentó coloración amarillenta oscura un olor a comida descompuesta su aspecto fue turbio.

Pasando 10-19 días tuvo un color Marrón sin agitar se eleva el aceite y presenta coloración amarillenta más clara, se redujo el mal olor y su aspecto fue turbio.

Luego de haber transcurrido un periodo de 22-25 días de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido con aceite vegetal proveniente de frituras se constató un color amarillento clara casi transparente sin presencia de olor.

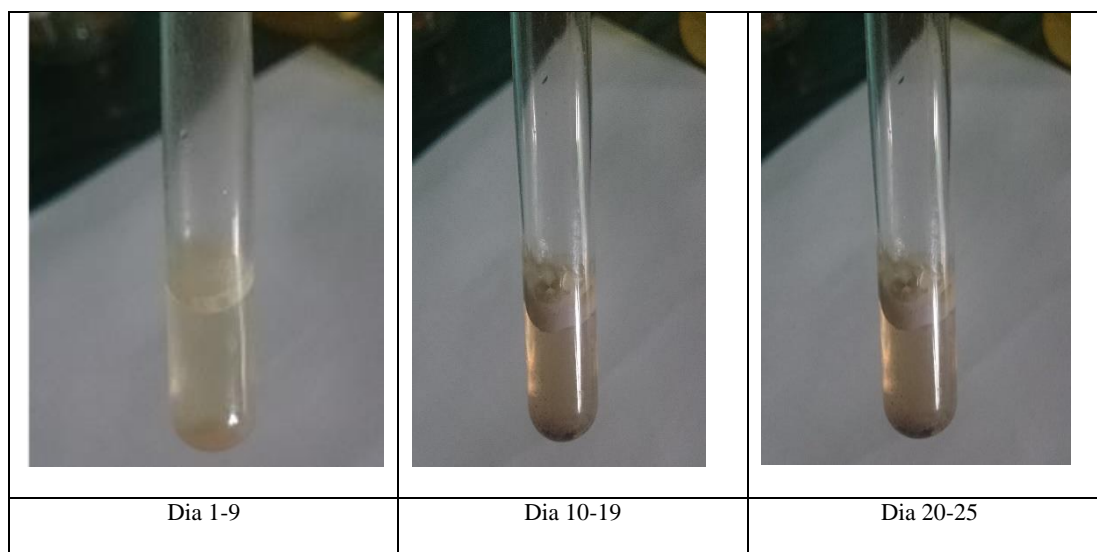


Figura 4-3: Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en caldo czapek-dox modificado con aceite vegetal procedente de frituras en 9ml de muestra.

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

3.1.7 Medición espectrofotométrica del caldo microbiano utilizado para la biodegradación con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*

Medición espectrofotométrica de la muestra con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente, se encuentran los resultados de dichas mediciones que se realizaron durante 25 días. (Ver anexo I)

La medición de absorbancia de la muestra con el Hongo *Aspergillus niger* tubo t1 Asp 0.292 cuando empezó el crecimiento microbiano, el tubo t7 presento 0.295 crecimiento en día 7 lo que significa que hay un crecimiento normal y consumo de carbono del aceite de frituras. El t16 Asp 0.297 de crecimiento fue el óptimo de la exponencial donde se observa su consumo máximo de carbono obtenido del aceite de frituras, en el día 25 de crecimiento fue de 0.299 t25 Asp en este día no se observaron cambio significativos en el consumo de carbono y después del día 25 el hongo pierde su tiempo de vida útil.

En la figura 3-5 se encuentra plasmado el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* durante los 25 días en este se evidencio mayor crecimiento.

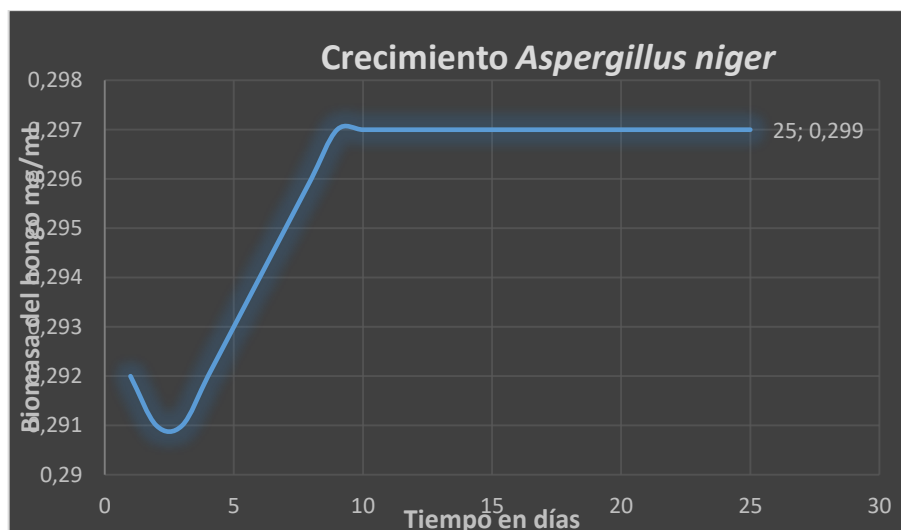


Figura 5-3: Crecimiento del hongo *Aspergillus niger*

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La medición de absorbancia de la muestra con la Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* tubo t1 Asp 0.040 cuando empezó el crecimiento microbiano, el tubo t7 presento 0.066 crecimiento en día 7 lo que significa que hay un crecimiento normal y consumo de carbono del aceite de frituras. El t16 0.068 de crecimiento fue el óptimo de la exponencial donde se observa su consumo máximo de carbono obtenido del aceite de frituras, en el día 25 de crecimiento fue de 0.07 t25 Sc en este día no se observaron cambio significativos en el consumo de carbono y después del día 25 el hongo pierde su tiempo de vida útil.

En la figura 3-5 se encuentra plasmado el crecimiento de la Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* durante los 25 días en este se evidencio mayor crecimiento.

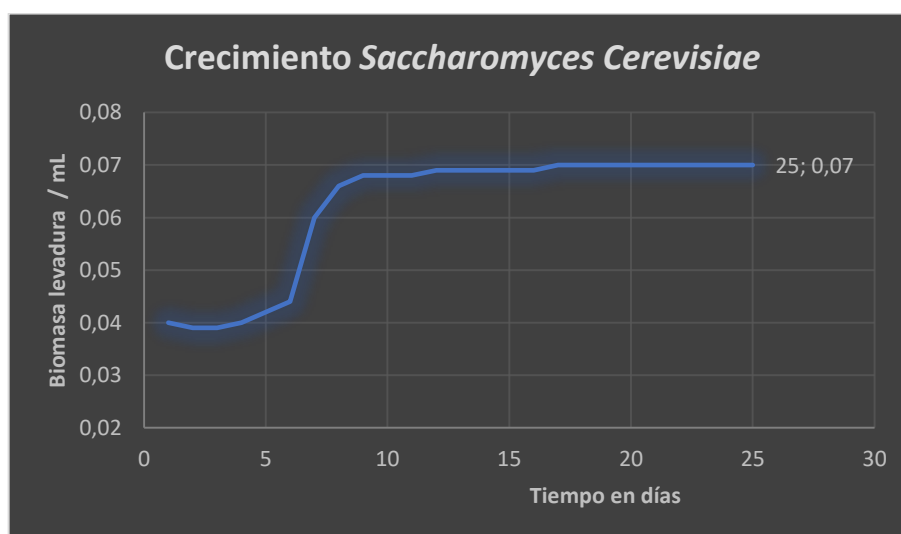


Figura 6-3: Crecimiento de la Levadura *Saccharomyces Cerevisiae*

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

Resultado del coeficiente de Incremento de la Biomasa (I.B)

El índice del incremento de biomasa se determina con el coeficiente de las mediciones de absorbancia obtenidas tomando en cuenta las mediciones finales e iniciales (ver anexo K) arrojan los siguientes resultados en la siguiente tabla:

Tabla 1-3: Tabla de coeficiente de incremento de Biomasa

	xf	xi
<i>Aspergillus niger</i>	0.299	0.292
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.07	0.04

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

Resultados del Índice de Degradación (I.D)

Se realizó por el método del consumo lipídico, el cual se llevó a cabo cada especie fúngica con el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pesando previamente el matraz con medio Czapekdox modificado y por diferencia de peso inicial versus final (tratado) por 25 días a 32°C (ver anexo L). La biodegradación se determinó por el índice de degradación (I.D).

Tabla 2-3: Tabla del índice de Degradación (I.D)

	xf	xi	Aλ	C	e	ID
<i>Aspergillus niger</i>	27	25	0.299	60	1	5.37 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27	25.5	0.07	60	1	1.2 %

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

3.2 Comprobación de Hipótesis

Hipótesis a probar

$$H_0 = \text{efecto } \alpha_i = 0$$

$$H_1 = \text{efecto } \alpha_i \neq 0$$

Significancia

$$\alpha = 0,05$$

Los resultados obtenidos de los análisis de ácidos grasos más importantes se encuentran ubicados en el Anexo A. Los análisis estadísticos para cada ácido graso se representan a continuación.

Variable respuesta: Ácido Mirístico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,0009	1	0,0009	65535	0,0036	0,07
error	0	2	0			
Total	0,0009	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Mirístico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Mirístico	0,41	0,32	0,41	0,44

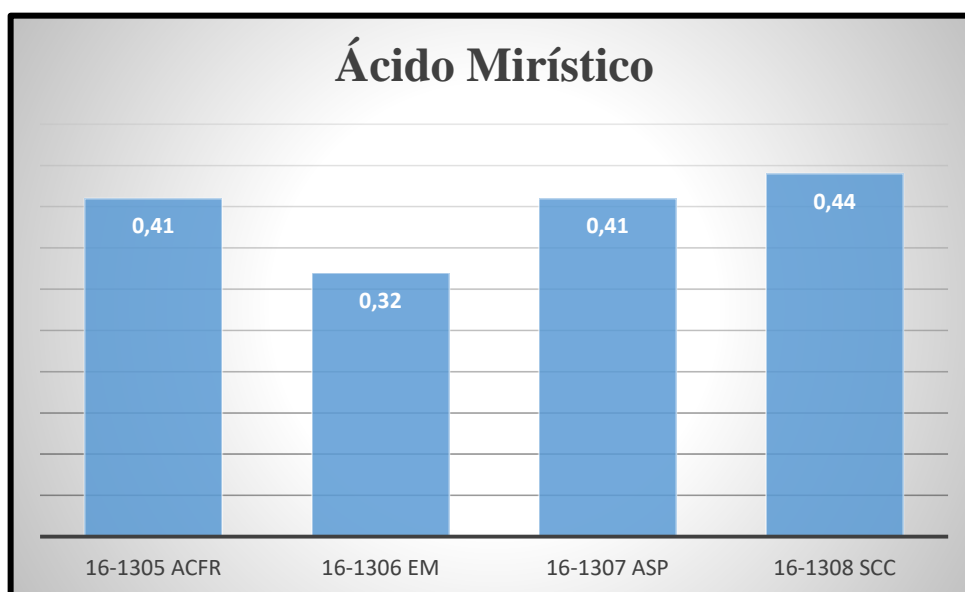


Figura 7-3 : Análisis del ácido mirístico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Mirístico en el aceite de frituras es 0,41 % (concentración máxima) en la segunda muestra (emulsión) es de 0,32 % se hace una solución menos concentrada por la mezcla con el medio de cultivo. Según los tratamientos aplicados: para *Aspergillus niger* es de 0,41 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,44 %, ninguno de los dos tratamientos fue eficiente ya que en el primero se mantiene y en el segundo aumenta su concentración.

Variable respuesta: Ácido Palmítico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,5625	1	0,5625	10,0987433	1,0506	0,08638434
error	0,1114	2	0,0557			
Total	0,6739	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Palmítico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Palmítico	20,69	22,68	20,63	21,38

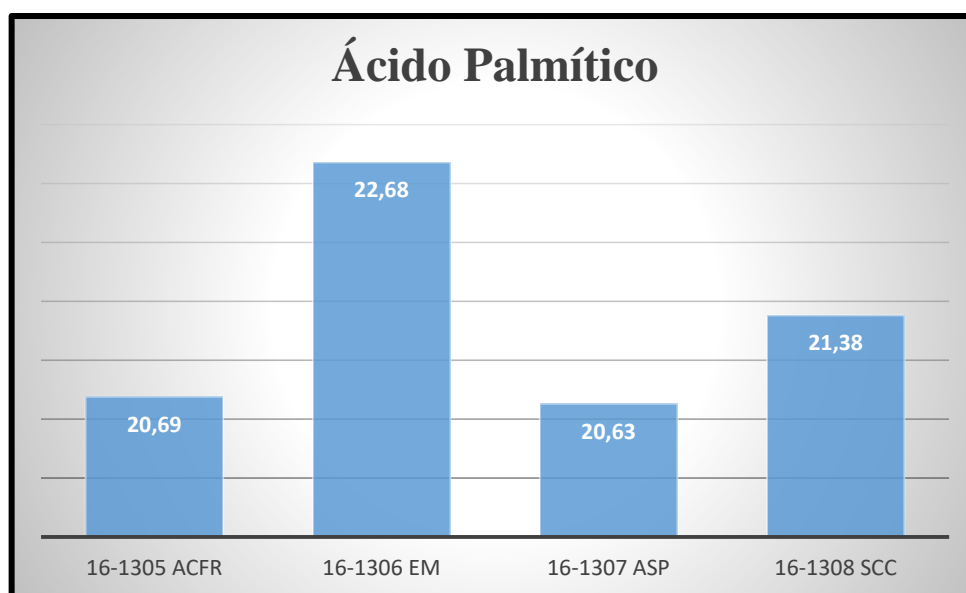


Figura 8-3: Análisis del ácido palmítico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Palmítico en el aceite de frituras es 20,69 %, la segunda muestra (emulsión) es de 22,68% esta concentración aumenta 2,01 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Según los tratamientos aplicados obtenemos: para *Aspergillus niger* es de 20,63% y para *Saccharomyces cerevisiae* 21,38 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente se redujo un 0,06 % y en el segundo hubo un incremento de este ácido en 0,69 %.

Variable respuesta: Ácido Palmitoléico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,002025	1	0,002025	3,24	0,0240	0,21366635
error	0,00125	2	0,000625			
Total	0,003275	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Palmitoléico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Palmitoléico	1,07	0,79	1,05	1,1

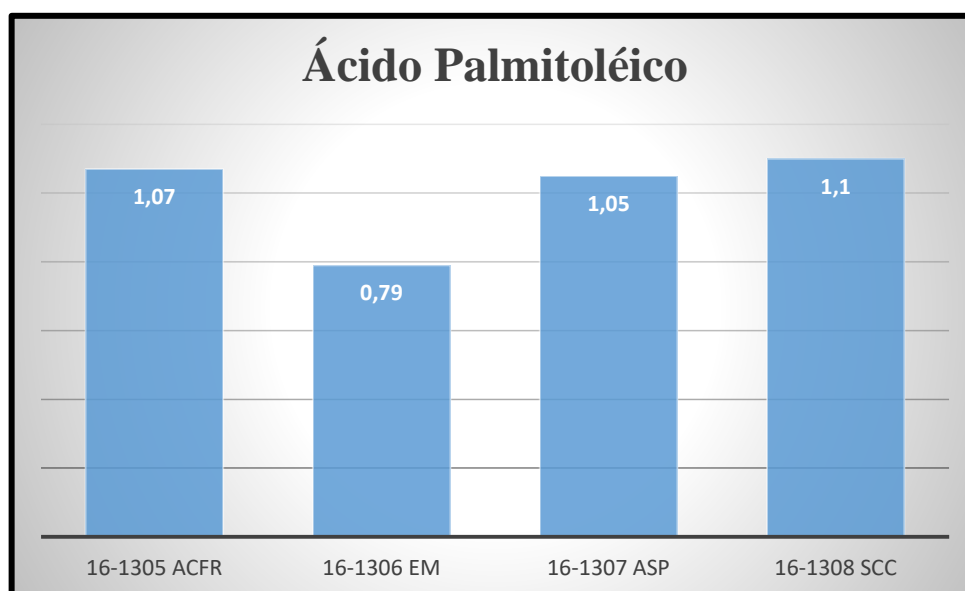


Figura 9-3: Análisis del ácido palmitoléico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Palmitoléico en el aceite de frituras es de 1,07 % es la concentración máxima, en la segunda muestra (emulsión) es de 0,79 % se hace una solución menos concentrada posiblemente por la acción del gel emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 1,05 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 1,10 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente se redujo un 0,02 % y en el segundo hubo un incremento de este ácido en 0,03 %.

Variable respuesta: Ácido Heptadecanoico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,0001	1	0,0001	65535	0,0006	0,06
error	0	2	0			
Total	0,0001	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Heptadecanoico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Heptadecanoico	0,13	0,17	0,12	0,13

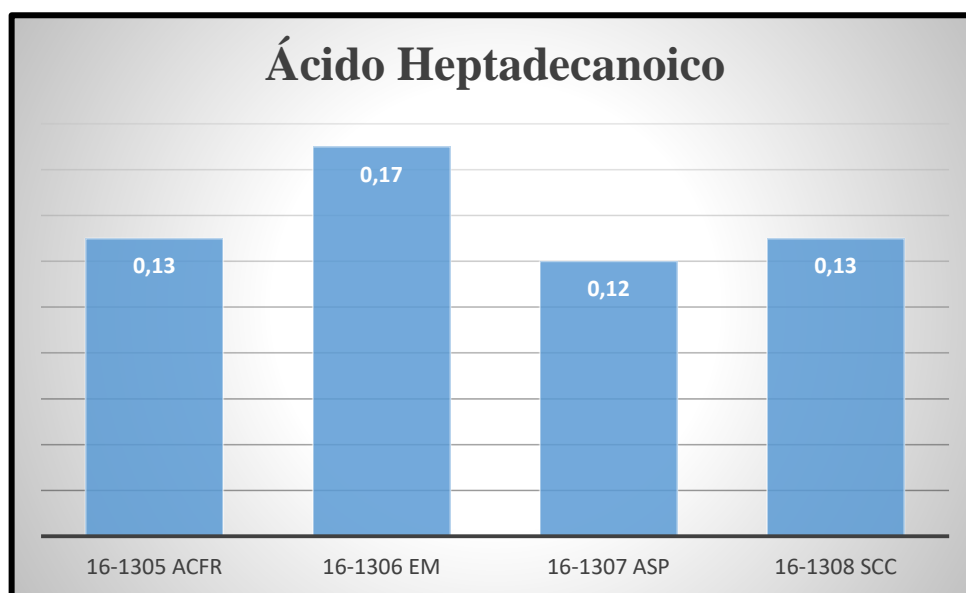


Figura 10-3: Análisis del ácido Heptadecanoico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Heptadecanoico en el aceite de frituras es de 0,13 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 0,17 % esta concentración aumenta en un 0,04 % posiblemente por la reacción del agente emulsificante. Finalmente, según los tratamientos aplicados obtenemos los siguientes valores: para *Aspergillus niger* es de 0,12 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,13 %, en base a estos resultados determinamos que la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente ya que se redujo un 0,01 % y en el segundo se mantuvo la concentración de 0,13 %.

Variable respuesta: Ácido Esteárico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,009025	1	0,009025	3,19469027	4,5796	0,21578607
error	0,00565	2	0,002825			
Total	0,014675	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Esteárico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Esteárico	4,69	8,88	4,6	4,69

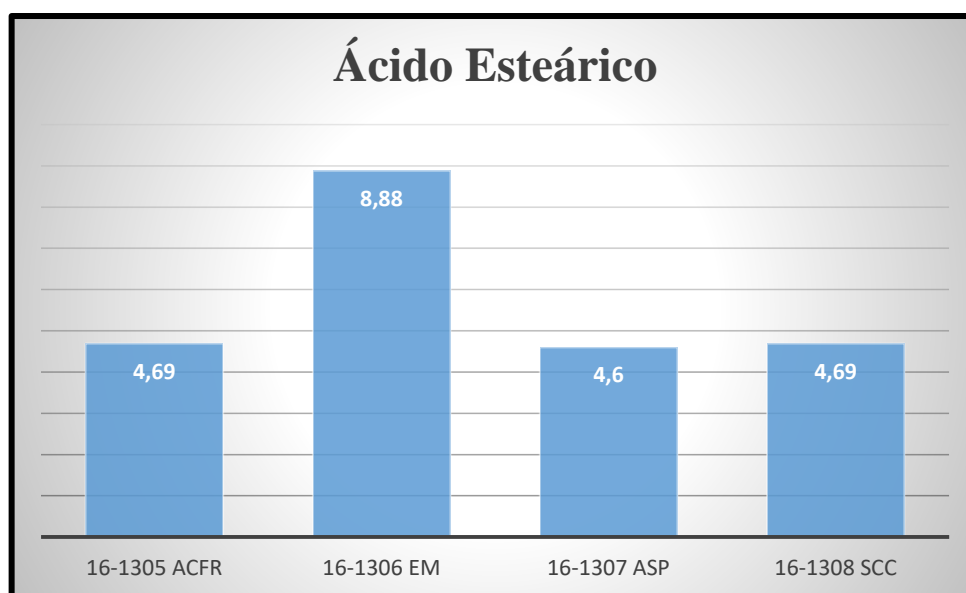


Figura 11-3: Análisis del ácido esteárico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Esteárico en el aceite de frituras es de 4,69 %, en la segunda muestra (emulsión) es de 8,88 % esta concentración aumenta en un 4,19 % este incremento se debe posiblemente a la composición del agente emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 4,60 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 4,69 %, la concentración con el primer tratamiento fue más eficiente ya que se redujo un 0,09 % y en el segundo se mantuvo la concentración de 4,69 %.

Variable respuesta: Ácido Oléico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,319225	1	0,319225	2,38005592	1,2996	0,26285359
error	0,26825	2	0,134125			
Total	0,587475	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al ácido oléico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Oléico	32,61	34,89	33,35	32,79

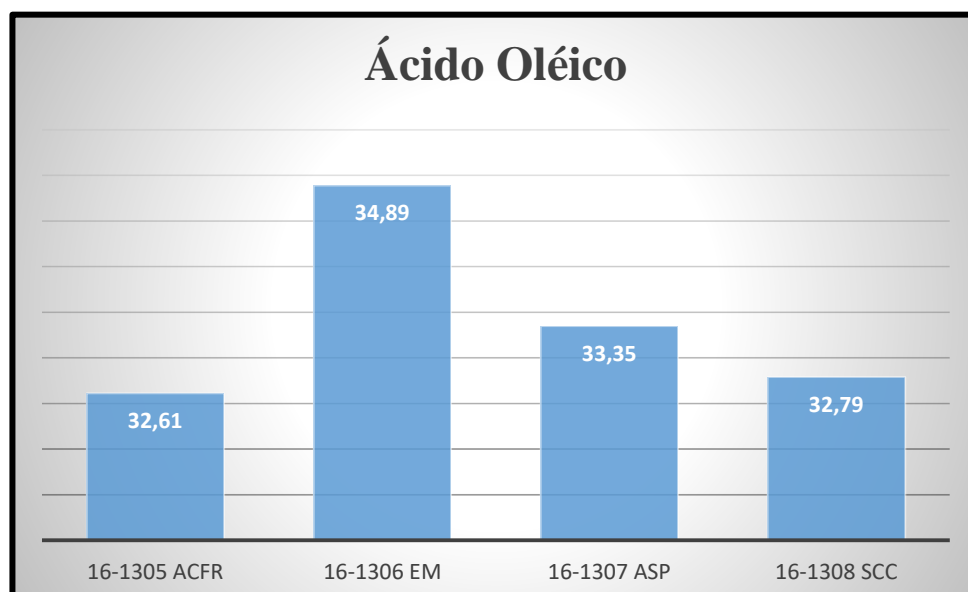


Figura 12-3: Análisis de ácido oléico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Oléico en el aceite de frituras es de 32,61 %, la segunda muestra (emulsión) es de 34,89 % esta concentración aumenta probablemente a la presencia de texapón, Para *Aspergillus niger* es de 33,35 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 32,79 %, la concentración con el primer tratamiento se incrementó 0,74 % y en el segundo aumentó la concentración de 0,18 % por lo tanto los dos tratamientos fueron ineficientes para la reducción de este ácido graso.

Variable respuesta: Ácido Linoléico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,5929	1	0,5929	2,05868056	13,7641	0,28779987
error	0,576	2	0,288			
Total	1,1689	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Linoléico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Linoléico	34,18	26,82	34,24	33,47

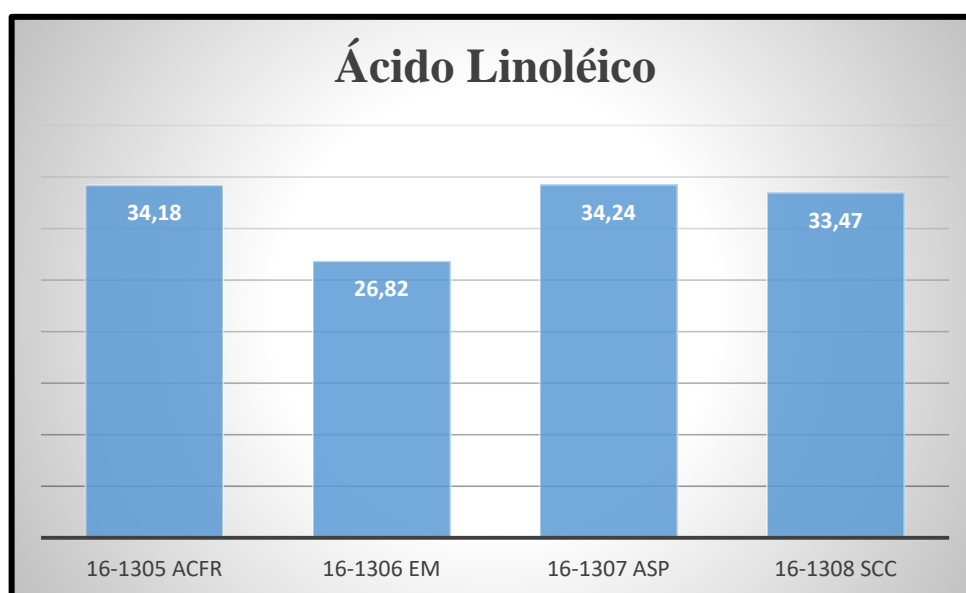


Figura 13-3: Análisis de linoléico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Linoléico en el aceite de frituras es de 34,18 %, la segunda muestra (emulsión) es de 26,82 % esta concentración disminuye 7,36 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Para *Aspergillus niger* es de 34,24 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 33,47%, en base a estos resultados determinamos que la concentración con el primer tratamiento aumento 0,06 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,71 %, el segundo tratamiento es más eficiente.

Variable respuesta: Ácido Araquídico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,093025	1	0,093025	1,74776891	0,1806	0,31710237
error	0,10645	2	0,053225			
Total	0,199475	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es menor que un $\alpha = 0,05$; se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Araquídico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Araquídico	0,91	0,53	0,67	0,98

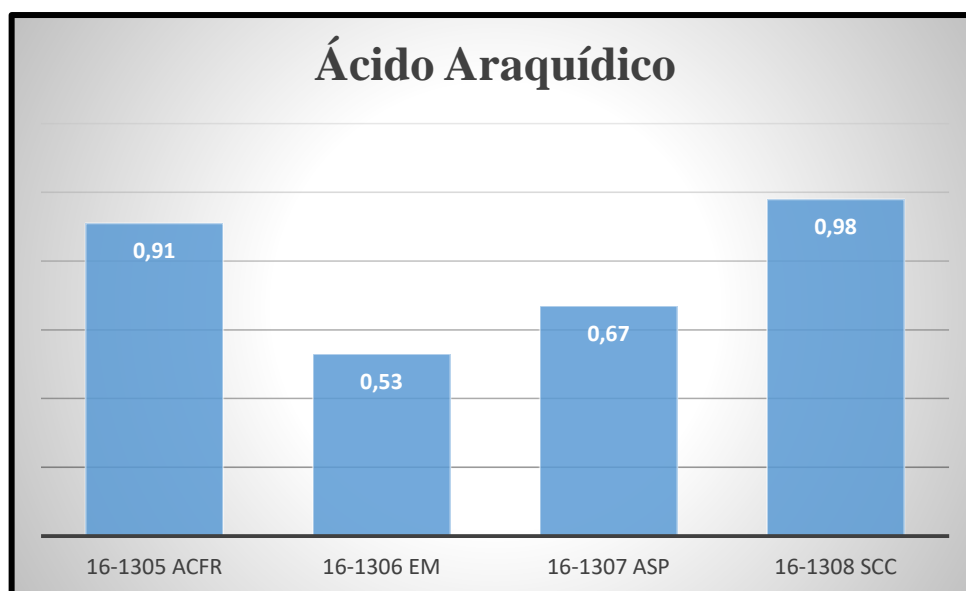


Figura 14-3: Análisis del ácido araquídico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Araquídico en el aceite de frituras es de 0,91 %, la segunda muestra (emulsión) es de 0,53 % esta concentración disminuye 0,38 % se debe a los aditivos del medio de cultivo. Para *Aspergillus niger* es de 0,67 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,98 %, que la concentración con el primer tratamiento disminuyo 0,24 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,07 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

Variable respuesta: Ácido cis-11 Eicosanoíco

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	0,0016	1	0,0016	3,2	0,0072	0,21553546
error	0,001	2	0,0005			
Total	0,0026	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido cis-11 Eicosanoico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido cis-11 Eicosanoico	0,63	0,46	0,56	0,6

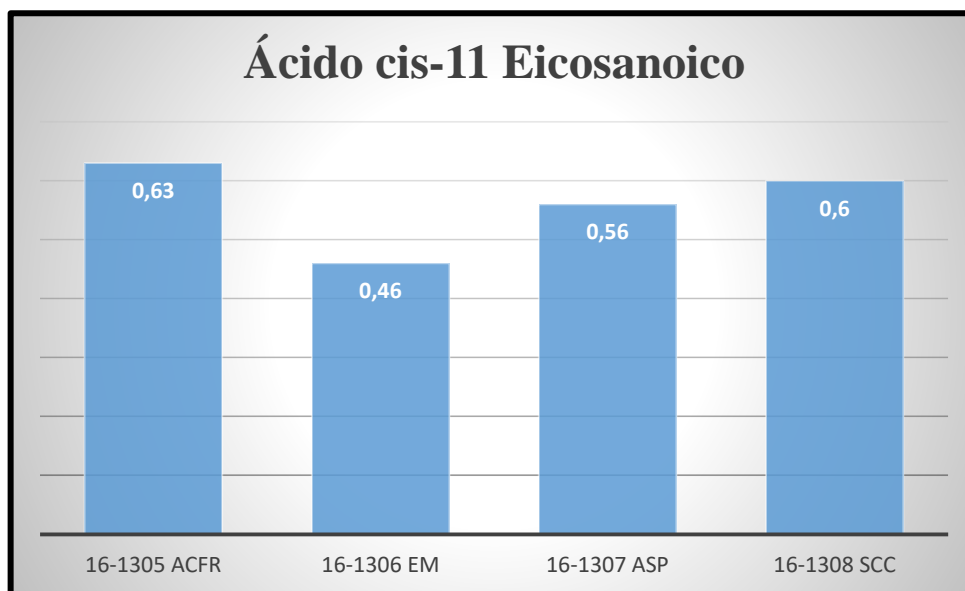


Figura 15-3: Análisis del ácido cis-11 Eicosanoico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido cis-11 Eicosanoico en el aceite de frituras es de 0,63 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 0,46 % esta concentración disminuye 0,17 % posiblemente por la compatibilidad con el agente emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 0,56 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,60 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyó 0,07 % y en el segundo disminuyó la concentración en 0,03 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

Variable respuesta: Ácido Linolénico

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	CV	valor -p
microorganismos	2,5E-05	1	2,5E-05	1	0,1806	0,42264973
error	5E-05	2	2,5E-05			
Total	7,5E-05	3				

De acuerdo al análisis de varianza se verifica que el valor-p es mayor que un $\alpha = 0,05$; no se rechaza H_0 ; y se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre el Asp y Scc con respecto al Ácido Linolénico.

Nombre	16-1305 AcFr	16-1306 Em	16-1307 Asp	16-1308 Scc
Ácido Linolénico	2,82	1,97	2,66	2,65

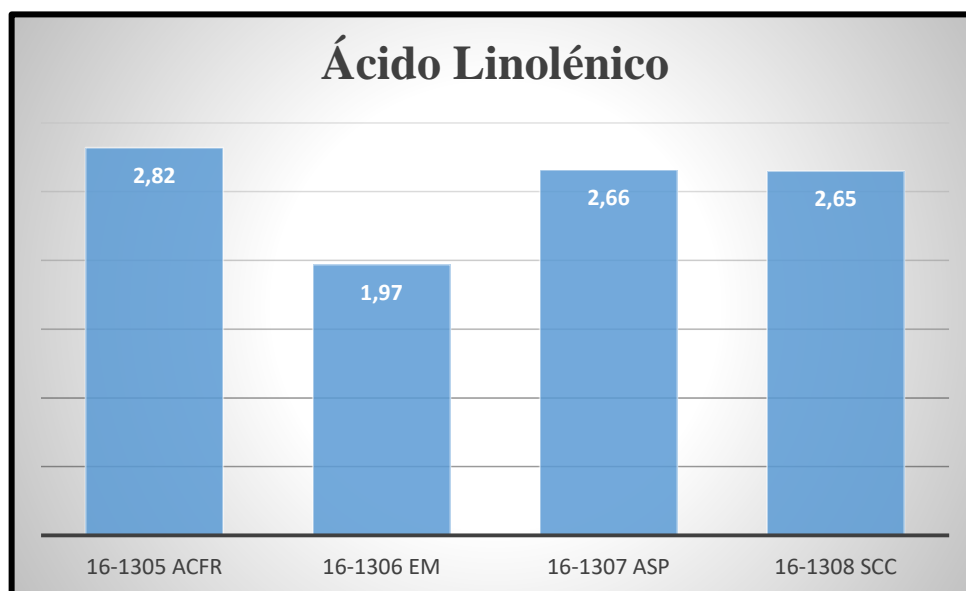


Figura 16-3: Análisis del ácido linolénico

Realizado por: LÓPEZ, Karina, 2017

La concentración inicial del Ácido Linolénico en el aceite de frituras es de 2,82 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 1,97 % esta concentración disminuye 0,85 % posiblemente por la compatibilidad del gel emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 2,66 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 2,65 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyó 0,16 % y en el segundo disminuyó la concentración en 0,17 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.

3.3 Discusión de resultados.

En el estudio presentado por la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda acerca de la Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* Y *Saccharomyces cerevisiae*, en el que se utilizó el medio de cultivo Czapek dox que garantiza el mayor crecimiento de las especies fúngicas *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se concluyó que los aceites residuales indican una cambios de las propiedades físicas después de haber aplicado el tratamiento biológico con las especies fúngicas.

La composición química del aceite vegetal residual no hubieron mayores variaciones en el perfil de ácidos grasos después de aplicado el tratamiento, solo una ligera variación del ácido linolénico el mismo que se redujo ligeramente con la aplicación de *Saccharomyces cerevisiae*, y *Aspergillus niger* es la cepa que presentó mayor actividad degradativa, puesto que los resultados obtenidos arrojaron un incremento considerable en la biomasa ya que se obtuvieron los valores más altos en el aumento de la biomasa y productividad tanto para aceites residuales urbanos vegetales como para aceites residuales urbanos de lubricantes y los rendimientos en el consumo lipídico son 61,74% ($\pm 0,16$) y 59,69% ($\pm 0,6$) respectivamente. (Marquez, et al., 2015, p. 90) .

De la misma manera en esta investigación no se encuentra una diferencia significativa en los análisis de ácidos grasos de aceites vegetales procedentes de fritura presentadas antes y después del tratamiento microbiológico con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* existe una ligera variación los ácidos eicosanoico y linolénico donde se aprecia una ligera disminución mientras que en la formación de las emulsiones existe variaciones dependiendo de los ácidos esto se produce posiblemente por la reacción del aceite con el gel emulsificante.

La investigación realizada en el año 2008, con el tema “Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados se aplica la biorremediación para disminuir la concentración de dichos contaminantes”. Los ensayos se realizaron en la planta de tratamiento de aguas residuales de Río Frío, donde se valoraron las actividades de consorcios microbianos nativos a los que consecutivamente se les introdujeron en las biopilas que estaban constituidas por lodos deshidratados que tienen origen en el tratamiento primario de aguas residuales domésticas, lodos provenientes de lavaderos de vehículos y lodos de alcantarillado de la zona industrial de Bucaramanga.

Se aislaron, identificaron y conservaron cepas microbianas con capacidad de degradar hidrocarburos totales de petróleo (TPH) como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter spp.*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus spp.* y *Nocardia spp.* Se hizo una serie de pruebas piloto donde se inoculó un consorcio bacteriano a una concentración *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, se monitorearon temperatura, pH, humedad

y oxigenación, se obtuvieron porcentajes de remoción hasta de 94% de TPH en 3 meses y 84% en 40 días, lo que dio como resultado un efecto positivo utilizando los consorcios para reducir la contaminación de lodos. (Vásquez, et al., 2008, p. 1) .

Las cepas microbianas utilizadas para esta investigación fueron proporcionadas en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, la poca biodegradación presentada por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* es posiblemente por el trabajo aislado de los microorganismos presentado para tratar el aceite vegetal procedente de frituras en cada bloque de tratamiento, probablemente la acción microbiológica en consorcio pueda incrementar dicha biodegradación al igual someter mayor tiempo de tratamiento para poder determinar la eficacia.

En estudio de la evaluación de la actividad lipolítica de hongos sobre aceite de higuera (*Ricinus communis*) se realizó la selección de las cepas de hongos que manifiestan una alta actividad lipolítica en aceite de higuera y comprobar si sus crudos enzimáticos que se obtuvieron por fermentación en sustrato líquido presentan la misma actividad sobre el aceite de higuera. Se aislaron 9 cepas de hongos, ocho de *Penicillium sp* y una de *Aspergillus sp*, a partir de aceites vegetales procedentes de desechos.

Los resultados indicaron que tanto *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentaron halos de degradación. El trabajo demostró que las cepas estudiadas de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentaron un mejor crecimiento de colonia en el aceite de higuera y una muy buena actividad de hidrólisis en placa con el triglicérido de cadena corta: tributirina. (Mendoza , et al., 2012, pp. 5-10)

CONCLUSIONES

- Se comparó la biodegradación de los aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se determinó que el hongo *Aspergillus niger* es más efectivo en la degradación debido a al índice de degradación que presentó en un 5.37% en el tratamiento realizado con *Aspergillus niger* frente al índice de degradación de *Saccharomyces cerevisiae* en un 1.2%.
- Los análisis físicos iniciales de los aceites vegetales procedentes de fritura presentan una densidad de 0.901 g/cm³ y la viscosidad de 0.0087 ηPoise y después del tratamiento con *Aspergillus niger* una densidad de 0,876 g/cm³ y la viscosidad de 138,34 ηPoise y con *Saccharomyces cerevisiae* una densidad de 0,866 g/cm³ y la viscosidad de 138,22 ηPoise.
- Los análisis químicos iniciales del aceite vegetal procedente de frituras presentan los Ácidos Grasos más representativo para la degradación en aceite vegetal de frituras son:
 - La concentración inicial del Ácido cis-11 Eicosanoico en el aceite de frituras es de 0,63 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 0,46 % esta concentración disminuye 0,17 % posiblemente por la compatibilidad con el agente emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 0,56 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 0,60 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyo 0,07 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,03 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.
 - La concentración inicial del Ácido Linolénico en el aceite de frituras es de 2,82 %, encontramos que en la segunda muestra (emulsión) es de 1,97 % esta concentración disminuye 0,85 % posiblemente por la compatibilidad del gel emulsificante. Para *Aspergillus niger* es de 2,66 % y para *Saccharomyces cerevisiae* 2,65 %, la concentración con el primer tratamiento disminuyo 0,16 % y en el segundo disminuyo la concentración en 0,17 % por lo tanto el primer tratamiento es más eficiente.
 - Por lo tanto, se demostró que hay degradación de ácidos grasos en la composición química del aceite de frituras con los distintos tratamientos.
- Se logró el acondicionamiento y crecimiento tanto del *Aspergillus niger* como de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la utilización del agar czapek y el medio líquido czapek dox modificado, la incubación se la realizó a 32°C, para el medio líquido se mantuvo en constante agitación, en agar las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* se presentan de color blanco brillante existió el crecimiento de las colonias y aparición de nuevas colonias, en el caso de agar con *Aspergillus niger* se observó partes blancas en las colonias esto corresponde a las cabezas de las conidias.

RECOMENDACIONES

- Utilizar diferentes concentraciones en las emulsiones para determinar cuál es el valor adecuado para la mayor eficiencia en la degradación del aceite usado mediante la aplicación de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Realizar pruebas con consorcios microbianos para desarrollar una mayor eficiencia
- Emplear el tratamiento durante un mayor tiempo un tiempo estimado de tres meses para determinar si existe una mayor degradación del aceite.
- Se recomienda manejar la misma temperatura tanto para el empleo del hongo *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*

BIBLIOGRAFÍA

BADUI DERGAL, Salvador; *Química de Alimentos*, 4^{ta} ed. México DF- Mexico; Pearson Educación, 2006, p. 253

CARBALLO, GARCÍA, Javier, Francisco; *Microbiología Industrial. Microorganismos de interes industrial*. 1^{ra} ed. Zaragoza- España: Acribia, 2000, pp. 20-31.

CEDEÑO, Oscar; et al: Estudio de la densidad y viscosidad de algunos ácidos grasos puros. *Grasas y Aceites*, 3^{ra} ed Madrid- España 1999, pp. 359-368.

COLOMBIA, CORPOBID (Programa Estratégico para la Producción de Biodiesel) - Combustible Automotriz- A partir de Aceites Vegetales". Bogotá - Colombia, 2003 pp. 433-435
[Consulta: 21 de septiembre 2016

<http://www.si3ea.gov.co/si3ea/documentos/documentacion/Biodiesel/Capitulo%200.pdf>

CUESTA, Claudio., SÁNCHEZ, Muniz. & HERNÁNDEZ, Daniela ; "Evaluation of nonpolar methyl esters by column and gas chromatography the assessment of used frying olive oils". *Journal of the American Oil Chemistry Society*, México DF- México, 1991 pp. 443-445.

[Consulta: 22 septiembre 2016]

<https://link.springer.com/journal/11746>

ESTADOS UNIDOS ICT, S.L. (INSTITUCION CIENTIFICO TECNICO CULTIM),. *Manual Básico de microbiología*. 4^{ta} ed. Nueva York- Estados Unidos . Panred Química s.a. 2003. p. I33

DU PLESSIS , L., VAN , P., NIEKER, J. & STEYN, M; "Evaluation of peanut an cottonseed oils for deep frying". *Journal American Chemists Society Technical Document*", Republic of South Africa 1980, pp. 272-275.

[Consulta: 28 septiembre 2016]

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02672367>

DUQUE BETANCUR , Natalia; Evaluacion de la actividad antifungica de los extractos de *Miconia Caudata*, *Miconia sp*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens* frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Candida Albicans*, [En línea](**TESIS**). (Tecnología). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira-Colombia: 2008, pp. 8-15.

[Consulta: 28 Diciembre 2016].

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1821/6602842D946.pdf?sequence=>

FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza & SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Evaluación de la Melaza de Caña como Sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, (**TESIS**). (Ingeniería). Pontificia Universidad Javeriana , Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá-Colombia. 2007. pp.61-102.

[Consulta: 22 Diciembre 2016] <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>

FENEMA , Owen. Química de los Alimentos. 2^{da} ed. Málaga-España: Acribia. 2010, pp. 270-273;350.

FERNÁNDEZ C, L., ALVAREZ DE LA CADENA Y YAÑEZ, L. & SOSA MORALES, M., "XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Deterioro de Aceite de Soya y Oleína de Palma durante el freido de papas a la francesa"., Puebla-México, 2010, pp.345-349

FRYER, T., LAWRENCE, R. & REITER, B., "Methods for isolation and enumeration of lipolytic organism" *Journal of Dairy Science*. [En línea] Pennsylvania-Harrisburg 1967 pp 621-634.

[Consulta: 15 diciembre 2016]

[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(67\)87450-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(67)87450-2/pdf)

GONZALES Alicia ., VANEZUELA Lourdes,. *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea]: Departamento De Genetica Molecular, Instituto De Fisiologia Celula, 2007., Mexico D.F, MEXICO pp.61-102

[Consulta: 15 diciembre 2016]

Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

HERNÁNDEZ Alicia, ALFARO Ileana. & ARRIETA Ronal. Microbiología Industrial. 2^{da} ed, San Jose-Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia, 2003. pp.47-48

KAMIKURA, E. & MENDIETA, O. "Production of lipase from *Geotrichum* sp and adsorption studies on affinity resin".. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, [En línea] Sao Paulo, Brasil 1999 pp. 41-56.

[Consulta: 15 enero 2017].

n: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321999000200001

MENDOZA L, LINO M, LEÓN J, SANTIAGO J. "Evaluación sobre la actividad lipolítica de hongos sobre aceite de Higuierilla (*Ricinus communis*) ", *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* [En línea] Lima, Perú 2012 . pp. 5-10.

Consulta: 23 enero 2017

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4751/3823>

LARONE , Davice. *Medically Important Fungi*. 4^{ta} ed Washington DC-Estados Unidos: ASM Press, 2011, pp. 143-146, 485.

LUCENA CALVET, Paloma. Significación clínica del aislamiento de *Aspergillus* spp. en secreciones respiratorias del paciente con enfermedad estructural pulmonar, (TESIS)(Grado) Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España, 2011, pp. 17-19.

[Consulta: 02 diciembre 2016]

<http://eprints.ucm.es/13019/1/T32868.pdf>

MADIGAN, Michael., MARTINKO, John. & PARKER , Jack. Biología de los microorganismos, 8^{va} ed. Madrid, España: Prentice Hall, 2001, pp. 15-16,25-26.

MÁRQUEZ , M., NAVAS , P., YEGRES, F. & VIVAS , C., "Biodegradación parcial de aceites, residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*." *Química Viva*. [En línea] 2015 Buenos Aires, Argentina. 2015. pp. 90-102.

[Consulta: 13 enero 2017]

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86340672009>

MIRASOLAIN, Ainhoa, Las Grasas como Materia Prima, España: Universidad de Almería, 2^{da} ed , Almeria, España 2012, pp, 1-5

MORENO, Ernesto. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados, 4^{ta} ed, Mexico DF, México,Ciudad Universitaria, 1988, pp. 1-5.

ORTEGA, Rosa. Prejuicios y Verdades sobre Grasas. Importancia de las grasas en la alimentación. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 3^{ra} ed Madrid-España, 2013. pp. 2-7

REYES OCAMPO I, GONZALEZ-BRAMBILA M & LOPEZ-ISUNZA F , "Un analisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato solido". *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. [En línea] 2013 México DF- México pp. 41-56.

[Consulta: 02 enero 2017]

Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62028007005.pdf>

ROBLES , H., MIRANDA , H. & LORA , C., "Aislamiento de levaduras productoras de etanol a partir de chicha de jora del Mercado Mayorista de Trujillo". *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. [En línea], 2012, Trujillo-Perú. , p. 51.

[Consulta: 27 febrero 2017]

<https://es.scribd.com/document/207484296/Aislamiento-de-Levaduras-Productoras-de-Etanol-A>

ROMERO GOMEZ Sergio de Jesús. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida, [En línea] (TESIS) (Doctorado) Universidad autónoma Metropolitana, Iztapalapa-México, 2001, pp.4-2.

[Consulta: 14 marzo 2017]

<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspum/presentatesis.php?recno=2828&docs=UAM2828.PDF>

ROSAS CRIOLLO María Belén. & TERÁN FUENTES Diego Felipe . Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cacahaza, mediante fermentaciónn utilizando una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 1688. [En línea] (TESIS) (Grado) Universidad Técnica del Norte, Ibarra-ECUADOR , 2015. pp. 15-55.

[Consulta: 26 marzo 2017]

<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/4483/1/03%20EIA%20377%20TESIS.pdf>

SHELLEY , A., DEETH, H. & MAC , I. "Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy aplications". *Journal of Microbiological*, [En línea] 1987 Canberra- Australia, pp. 123-137

[Consulta: 26 marzo 2017].

https://www.researchgate.net/profile/Hilton_Deeth/publication/240160267_Review_of_methods_of Enumeration_Detection_and_Isolation_of_Lipolytic_Microorganisms_with_Special_Reference_to_Dairy_Applications/links/53fbc88f0cf2364ccc045510.pdf

SIERRA , G., "A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganism and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates". *Journal Microbiological. Serology*. [En línea] 1957 Canberra-Australia , pp. 15-22.

[Consulta: 02 abril 2017]

<https://link.springer.com/article/10.1007%2F02545855>

SOTO VÁSQUEZ, Marilú Roxana. Control de calidad de aceites vegetales, Trujillo-Perú [En línea] 2014. p. 12.

[Consulta: 02 abril 2017].

<https://es.slideshare.net/maryluz/control-de-calidad-de-aceites-vegetales-por-qf-maril-roxana-soto-vsquez>

TRACY, Aquila. Debuking the myth of yeast respiration and putting Oxygen in its proper place. *The biomesyry of yeast.*, [En línea] 1997 Ottawa-Canadá , p. 1.
[Consulta: 13 abril 2017]
https://www.morebeer.com/articles/how_yeast_use_oxygen

USESHE, Y., PEÑA, C. & CARDONA , G. *Aspergillus Níger* Tiegh Catálogo de la Biodiversidad de Colombia. [En línea] Bogotá- Colombia, p.13.
[Consultado 04 de Octubre 2016]
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=546&method=displayAAT>.

VALDIVIESO Magdalena. Obtención y caracterización de cepas *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutation, Granada, 1^{ra} Editorial de la universidad de Granada. Granada - España, 2006, pp. 73-74

VÁSQUEZ María, GUERRERO Jennifer, & QUINTERO Andrea , "Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados" , *Revista Colombiana de Biotecnología*.(TESIS) [En línea] Bogota, Colombia 2010.
[Consulta: 28 de septiembre 2016]
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15579/38076>

**ANEXOS B. FOTOGRAFIAS DEL PROCESO DE BIODEGRADACION DE ACEITE
PROCEDENTE DE FRITURAS**



1. Muestreo del aceite procedente de frituras



2. Transporte de la muestra



3. Pesaje de reactivos



4. Homogenización del medio de cultivo



5. Esterilización del medio de cultivo



6. Crecimiento de *A. niger* y *S. cerevisiae* en medio sólido



7. Control de cajas petri con microorganismos



8. Elaboración de medio líquido



9. Esterilización de medio líquido



10. Medio de cultivo líquido inoculado con *S. cerevisiae*



11. Inoculación de *A. niger*



12. Control de temperatura en cámara de calor



14. Cámara de calor con medio líquido inoculado con *S. cerevisiae* y *A. niger*



16. Determinación de biomasa en el espectrofotómetro.



17. Muestreo de aceite tratado con *S. cerevisiae*.



18. Muestreo de aceite tratado con *S. cerevisiae*, *A niger*, muestra compuesta, muestra en emulsión

ANEXO C: FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD AGAR CZAPK DOX (MODIFICADO)

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD AGAR CZAPEK DOX (MODIFICADO)

Fecha de emisión - 12/02/2009.

CM0097

Sección 1. Identificación del producto y de la compañía

No del producto	CM0097
Nombre comercial	AGAR CZAPEK DOX (MODIFICADO)
Fabricante	Oxoid Limited Wade Road Basingstoke Hants RG24 8PW ENGLAND Tel: + 44 (0)1256 841144 Fax: + 44 (0)1256 463388
Proveedor	Oxoid Limited Wade Road Basingstoke Hants RG24 8PW ENGLAND Tel: + 44 (0)1256 841144 Fax: + 44 (0)1256 463388

Sección 2. Identificación de los riesgos

Peligros más importantes	No clasificado como peligroso.
Peligros para la salud humana - Ojos	Puede provocar irritación temporal.
Peligros para la salud humana - Piel	El material puede provocar irritación.
Peligros para la salud humana - Ingestión	Una dosis grande puede tener los siguientes efectos: diarrea, náusea, vomito.
Peligros para la salud humana - Inhalación	La exposición al polvo en altas concentraciones puede tener los siguientes efectos:- irritación de la nariz, garganta y las vías respiratorias.

Sección 3. Composición e Información sobre los Ingredientes

Preparado - Ingredientes peligrosos (Europa)

Componente	Nº CAS	Concentración	Clasificación	Fraseo de riesgo
Sacarosa	57-50-1 200-334-0	86.15 % w/w	-	-
Nitrato de sodio	7631-89-4 231-684-3	4.40 % w/w	O - Comburente. Xi - Nocivo. Xi - Irritante.	R5- Peligro de fuego en contacto con materias combustibles. R22- Nocivo por ingestión. R36/37/38- Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

Sección 4. Primeros auxilios

Primeros Auxilios - Ojos	Lavar el ojo con abundante agua. Obtenga atención médica si el dolor o enrojecimiento persisten.
Primeros Auxilios - Piel	Lave la piel con agua y jabón.
Primeros Auxilios - Ingestión	Haga que la persona afectada beba 1-3 vasos de agua para diluir lo ingerido.
Primeros Auxilios - Inhalación	Retire de la exposición. Si no se siente bien consulte a un médico.

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD AGAR CZAPEK DOX (MODIFICADO)

Fecha de emisión - 12/02/2009.

CM0097

Sección 5. Medidas de extinción de incendios

Medios de extinción - Aprobado(s) Use vaporizador de agua, espuma, producto químico en polvo o dióxido de carbono.

Sección 6. Medidas a tomar en el transcurso de derrames accidentales

Precauciones personales Use ropa protectora correspondiente.

Derrame Poner en recipientes apropiados para su recuperación o eliminación. Finalmente, lavar el área con abundante agua.

Sección 7. Manejo y almacenaje

Manipulación Evítase la inhalación de polvo. Evítase el contacto con los ojos, la piel y la ropa.

Almacenamiento Tienda sobre cuarto temperatura. Retener bien cerrado y protegido desde dirigir luz del sol y moisture.

Sección 8. Controles de exposición/protección personal

Límites de exposición laboral (Preparado) - Europa

Sacarosa UK EH40: OES 10mg/m³ 8h TWA.
UK EH40: OES 20mg/m³ 15min STEL.

Medidas de protección - Respiratoria Recomendado: Máscara antipolvo (EN149 FFP2S).

Medidas de protección - Manos Guantes desechables de nitrilo.

Medidas de protección - Ojos Gafas químico-protectoras o escudo facial (EN166, 167 y 168).

Sección 9. Propiedades físicas y químicas

Estado físico Polvo.

Color Pálido paja

pH 6.5 - 7.0

Sección 10. Datos sobre la estabilidad y la reactividad

Estabilidad Estable en las condiciones de conservación y manipulación recomendadas (ver sección 7).

Condiciones que deben evitarse Exposición a la luz solar directa.

Sección 11. Información toxicológica

Toxicidad aguda Bajo nivel de toxicidad aguda.

Irritación ocular El grado de irritación no fue suficiente como para clasificarlo como irritante ocular.

Irritación de la piel El grado de irritación fue insuficiente para clasificarlo como irritante de la piel.

Sección 12. Información sobre la ecología

Ecotoxicidad No se ha identificado estudios relevantes.

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
AGAR CZAPEK DOX (MODIFICADO)

Fecha de emisión - 12/02/2009.

CM0097

Sección 13. Consideraciones en el momento de la eliminación

Consideraciones sobre la eliminación	No es un desecho peligroso. Elimínese según las disposiciones locales y nacionales que correspondan.
Información del envase	Los recipientes deben limpiarse usando métodos adecuados y luego reutilizados o eliminados por relleno de tierra o incineración, según corresponda.

Sección 14. Información sobre el transporte

ONU : Número ONU No clasificado.

Sección 15. Informaciones reglamentarias

Frases de riesgo	No aplicable.
Frases de seguridad	Evitar el contacto con los ojos y la piel.
CE Clasificación	Esta preparación no está clasificada como peligrosa según la Directiva comunitaria 89/379/EEC.

Sección 16. Datos complementarios

Primera Emisión MSDS	13/05/2002
MSDS Datos Revisados	12/02/2009
Revisiones Señaladas	Fecha de emisión

CM Versión - 4

Página: 3/3

ANEXO D: COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPEK PARA BIODEGRADACIÓN DE ACEITES PROCEDENTES DE FRITURA PARA *Aspergillus niger* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO SÓLIDO

Nitrato sódico: NaNO_3

$$X = \frac{2.00 \text{ g NaNO}_3 * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.2 \text{ g NaNO}_3$$

Fosfato di potásico: K_2HPO_4

$$X = \frac{1.00 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.1 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Sulfato magnésico: MgSO_4

$$X = \frac{0.5 \text{ g MgSO}_4 * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.05 \text{ g MgSO}_4$$

Cloruro de potasio: KCl

$$X = \frac{0.5 \text{ g KCl} * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.05 \text{ g KCl}$$

Sulfato ferroso: FeSO_4

$$X = \frac{0.01 \text{ g FeSO}_4 * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.001 \text{ g FeSO}_4$$

Agar:

$$X = \frac{15 \text{ g agar} * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 1.5 \text{ g agar}$$

Sacarosa: $C_{12}H_{22}O_{11}$

$$X = \frac{30 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11} * 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 3 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11}$$

ANEXO E: COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPEK DOX MODIFICADO PARA BIODEGRADACIÓN DE ACEITES PROCEDENTES DE FRITURA PARA *Aspergillus niger* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO LÍQUIDO (234 mL)

Los Cálculos para la elaboración el medio czapek sólido para 234 mL de agua para 26 tubos de ensayo con 9ml de compuesto en cada tubo:

Nitrato sódico: NaNO_3

$$X = \frac{2.00 \text{ g NaNO}_3 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.468 \text{ g NaNO}_3$$

Glicerofosfato de magnesio: $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$

$$X = \frac{0.5 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.117 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$$

Cloruro de potasio: KCl

$$X = \frac{0.5 \text{ g KCl} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.117 \text{ g KCl}$$

Sulfato ferroso: FeSO_4

$$X = \frac{0.01 \text{ g FeSO}_4 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.00234 \text{ g FeSO}_4$$

Sacarosa: $C_{12}H_{22}O_{11}$

$$X = \frac{30 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 7.02 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11}$$

Sulfato de potasio: K_2SO_4

$$X = \frac{0.35 \text{ g } K_2SO_4 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.0819 \text{ g } K_2SO_4$$

ANEXO F: COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPEK DOX MODIFICADO PARA BIODEGRADACIÓN DE ACEITES PROCEDENTES DE FRITURA PARA *Aspergillus niger* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO LÍQUIDO (234 mL)

Nitrato sódico: NaNO_3

$$X = \frac{2.00 \text{ g NaNO}_3 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.468 \text{ g NaNO}_3$$

Glicerofosfato de magnesio: $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$

$$X = \frac{0.5 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.117 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$$

Cloruro de potasio: KCl

$$X = \frac{0.5 \text{ g KCl} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.117 \text{ g KCl}$$

Sulfato ferroso: FeSO_4

$$X = \frac{0.01 \text{ g FeSO}_4 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.00234 \text{ g FeSO}_4$$

Sacarosa: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

$$X = \frac{30 \text{ g C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 7.02 \text{ g C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$$

Sulfato de potasio: K_2SO_4

$$X = \frac{0.35 \text{ g } K_2SO_4 * 234 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.0819 \text{ g } K_2SO_4$$

ANEXO G: COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPEK DOX MODIFICADO PARA BIODEGRADACIÓN DE ACEITES PROCEDENTES DE FRITURA PARA *Aspergillus niger* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO LÍQUIDO (250 mL)

Nitrato sódico: NaNO_3

$$X = \frac{2.00 \text{ g NaNO}_3 * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.5 \text{ g NaNO}_3$$

Glicerofosfato de magnesio: $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$

$$X = \frac{0.5 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg} * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.125 \text{ g C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{PO}_4\text{Mg}$$

Cloruro de potasio: KCl

$$X = \frac{0.5 \text{ g KCl} * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.125 \text{ g KCl}$$

Sulfato ferroso: FeSO_4

$$X = \frac{0.01 \text{ g FeSO}_4 * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.00250 \text{ g FeSO}_4$$

Sacarosa: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

$$X = \frac{30 \text{ g C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 7.5 \text{ g C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$$

Sulfato de potasio: K_2SO_4

$$X = \frac{0.35 \text{ g } K_2SO_4 * 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0.0875 \text{ g } K_2SO_4$$

ANEXO H: TABLA DE REGISTRO DE LOS MUESTREOS

Codificación de la muestra	M1	M2	M3
Fecha de toma de muestra	09 de abril del 2016	16 de abril del 2016	23 de abril del 2016
Hora de toma de muestra	6:00 am	6:00 am	6:00 am
Identificación de la entidad donde se ha realizado el muestreo	Restaurant "El Turista"	Restaurant "El Turista"	Restaurant "El Turista"
Identificación del interlocutor de la entidad	Sr Neldon Agila	Sr Neldon Agila	Sr Neldon Agila
Características de la muestra	pH : 5 Temperatura: 16	pH : 5 Temperatura: 17	pH : 5 Temperatura: 16
Destinos de la muestra	Facultad de Ciencias Pecuarias Espoch	Facultad de Ciencias Pecuarias Espoch	Facultad de Ciencias Pecuarias Espoch

ANEXO I: RESULTADOS DE MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL CALDO MICROBIANO UTILIZADO PARA LA BIODEGRADACIÓN CON *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*

Día	Tubo rotulado con <i>Aspergillus niger</i>	Medición Absorbancia <i>Aspergillus niger</i>	Tubo rotulado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medición Absorbancia <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1	t1 Asp	0.292	t1 Sc	0.040
2	t2 Asp	0.291	t2 Sc	0.039
3	t3 Asp	0.292	t3 Sc	0.04
4	t4 Asp	0.293	t4 Sc	0.042
5	t5 Asp	0.294	t5 Sc	0.044
7	t7 Asp	0.295	t7 Sc	0.066
8	t8 Asp	0.296	t8 Sc	0.068
9	t9 Asp	0.297	t9 Sc	0.068
10	t10 Asp	0.297	t10 Sc	0.068
11	t11 Asp	0.296	t11 Sc	0.069
12	t12 Asp	0.296	t12 Sc	0.069
13	t13 Asp	0.296	t13 Sc	0.069
14	t14 Asp	0.296	t14 Sc	0.069
15	t15 Asp	0.297	t15 Sc	0.069
16	t16 Asp	0.297	t16 Sc	0.069
17	t17 Asp	0.297	t17 Sc	0.07
18	t18 Asp	0.299	t18 Sc	0.07
19	t19 Asp	0.299	t19 Sc	0.07
20	t20 Asp	0.299	t20 Sc	0.07
21	t21 Asp	0.299	t21 Sc	0.07
22	t22 Asp	0.299	t22 Sc	0.07
23	t23 Asp	0.299	t23 Sc	0.07
24	t24 Asp	0.299	t24 Sc	0.07
25	t25 Asp	0.299	t25 Sc	0.07

ANEXO J: TABLA DE RESULTADOS DE LOS PARAMETROS FISICOS DEL ACEITE ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO

Determinaciones	Unidades	Valor sin tratamiento	Con tratamiento <i>Aspergillus niger</i>	Con tratamiento <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Densidad	g/cm³	0,901	0.876	0.866
Viscosidad	η Poise	138.87	138.34	138.22

ANEXO K: CALCULO DE INCREMENTO DE LA BIOMASA

Cálculo Incremento de la Biomasa (I.B) *Aspergillus niger*

$$I.B = \frac{x_f - x_t}{x_f} * 100$$

Donde:

Xf= Biomasa final;

Xi= Biomasa Inicial.

$$I.B = \frac{0.299 - 0.292}{0.299} * 100$$

$$I.B = 2.34 \%$$

Cálculo Incremento de la Biomasa (I.B) *Saccharomyces cerevisiae*

$$I.B = \frac{x_f - x_t}{x_f} * 100$$

Donde:

Xf= Biomasa final;

Xi= Biomasa Inicial.

$$I.B = \frac{0.07 - 0.04}{0.07} * 100$$

$$I.B = 42.85 \%$$

ANEXO L: CALCULO DE INDICE DE DEGRADACION

Índice de Degradación (I.D) *Aspergillus niger*

$$ID = \frac{x_i}{x_t} * 100 k$$

$$k = \frac{A\lambda}{C * e}$$

Donde:

Xi= capa lipídica inicial;

Xf= capa lipídica final

Aλ= absorción leída

C= concentración de la disolución leída

e= espesor de la cubeta en cm

$$k = \frac{0.299}{60 * 1}$$

$$k = 4.98 * 10^{-3}$$

$$ID = \frac{27}{25} * 100(4.98 * 10^{-3})$$

$$ID = 5.37\%$$

Índice de Degradación (I.D) *Saccharomyces cerevisiae*

$$ID = \frac{x_i}{x_t} * 100 k$$

$$k = \frac{A\lambda}{C * e}$$

Donde:

X_i= capa lipídica inicial;

X_f= capa lipídica final

Aλ= absorción leída

C= concentración de la disolución leída

e= espesor de la cubeta en cm

k= coeficiente de extinción molar

$$k = \frac{0.07}{60 * 1}$$

$$k = 4.9 * 10^{-3}$$

$$ID = \frac{27}{25.5} * 100(1.16 * 10^{-3})$$

$$ID = 1.2 \%$$