



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

UNT

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Efecto de la melaza de caña de azúcar, glicerol y sulfato de amonio en la producción de biomasa, contenido de lípidos y cinética de crecimiento de *Rhodosporidium toruloides*

Effect of sugar cane molasse, glycerol and ammonium sulphate on the production of biomass, lipids content and *rhodosporidium toruloides* growth cinetics

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

AUTORES: Díaz Gutiérrez, Kevin Steve

Julca González, Manuel Alejandro

ASESOR: Dr. Vásquez Villalobos, Víctor Javier

TRUJILLO – PERÚ

2021

-i-

Sustentado y Aprobado ante el Honorable Jurado:

Efecto de la melaza de caña de azúcar, glicerol y sulfato de amonio en la producción de biomasa, contenido de lípidos y cinética de crecimiento de *Rhodospiridium toruloides*

Presentado por:

Díaz Gutiérrez, Kevin Steve

Julca González, Manuel Alejandro

Aprobado por:



Dr. Linares Luján, Guillermo Alberto

Presidente



Dra. Rojas Padilla, Carmen Rosa

Secretario



Dr. Ninaquispe Zare, Viviano Paulino

Miembro Vocal



Dr. Vásquez Villalobos, Víctor Javier

Miembro Asesor

DEDICATORIA

Kevin Steve Díaz Gutiérrez

El presente trabajo lo dedico con mucho respeto y cariño a mis seres queridos Arturo e Irene, a mis padres Manuel y Violeta, a mi hermana Claudia y Melissa, quienes, con su apoyo incondicional permitieron mi desarrollo personal y profesional, por ello siempre serán pilares importantes en mi vida.

Manuel Alejandro Julca Gonzalez

La presente tesis la dedico a mis padres Ana y Antonio, por su esfuerzo y dedicación en mí, en todos los años vividos a su lado. Agradezco a toda mi familia por su apoyo brindado, de manera constante en cada etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, pues su voluntad permitió la culminación del presente trabajo de investigación.

A nuestro asesor, Dr. Víctor Vásquez Villalobos, cuyo apoyo constante fue vital y permitió la realización de la presente tesis

A todas aquellas personas por su aporte brindado en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Los autores

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. Lugar de ejecución	5
2.2. Materiales y equipos.....	5
2.2.1. Materiales.....	5
2.2.2. Equipos.....	5
2.3. Metodología	6
2.3.1. Proceso de producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos de <i>R. toruloides</i>	6
2.3.2. Esquema experimental.....	9
2.3.3 Métodos fisicoquímicos y microbiológicos	11
2.3.3.1. Análisis fisicoquímico.....	11
2.3.3.2. Análisis fisicoquímico y microbiológico	11
2.3.4. Análisis estadístico.....	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4. CONCLUSIONES.....	24
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS.....
ANEXO 1. Composición fisicoquímica de la melaza
ANEXO 2. Determinación de azúcares reductores totales (Del Castillo, 2012)
ANEXO 3. Determinación del recuento de levadura (Del Castillo, 2012).....
ANEXO 4. Conteo mediante Microscopio Motic.....

ANEXO 5. Análisis C/N de melaza mediante la metodología Walkley y Black y método KJELDAHL respectivamente (Walkley y Black, 1934, Bremner,1960).....

ANEXO 6. Cálculo de C/N representativo en cada tratamiento.....

ANEXO 7. Agitador orbital BioMarker BS-E24-1004

BIBLIOTECA DE AGROPECUARIAS

RESUMEN

La utilización de levaduras oleaginosas como fuente alternativa de aceite de oleoquímicos y biodiésel es de sumo interés, en este sentido, la búsqueda de sustratos disponibles que proporcionen elevado rendimiento y bajo costo, es importante. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de los azúcares reductores de melaza de caña de azúcar (ARM), glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA) en la producción biomasa (ϕ_g), contenido de lípidos (L) y cinética de crecimiento de *Rhodospiridium toruloides* CCT 0783 NCYC. Se empleó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR), realizándose 18 ensayos, con ARM, Gli y SA entre 0.0 a 66.49 g/L, 0.0 y 50.0 g/L y 0.1 a 4.76 g/L respectivamente. Los cultivos se realizaron en matraces de 250 mL de capacidad con un volumen de medio de cultivo de 99 mL e inóculo de 1 mL a 250 rpm y temperatura de 28°C, por un tiempo de 48 h. El mayor contenido de L y ϕ_g fue 52.37% y 4.487 g/L respectivamente con T11, utilizando 33.24 g/L, y 2.43 g/L de ARM, y SA respectivamente, con una relación C/N de 29.32.

La utilización del modelo de Gompertz, no permitió obtener una consistencia estadística de los datos experimentales (R^2 entre 0.76 a 0.93), debido a la fase de adaptación de las células de *R. toruloides* al medio de cultivo y una alta dispersión de la cinética de crecimiento.

Palabras clave: *Rhodospiridium toruloides*, melaza de caña, glicerol, sulfato de amonio, biodiésel, oleoquímicos, parámetros cinéticos.

ABSTRACT

The use of oleaginous yeasts as an alternative source of oleochemical oil and biodiesel is of great interest, in this sense, the search for available substrates that provide high performance and low cost is important. The purpose of this study was to evaluate the effect of sugarcane molasses reducing sugars (MSR), glycerol (Gly) and ammonium sulfate (AS) on biomass production (ϕ_g), lipid content (L) and *Rhodospiridium toruloides* CCT 0783 NCYC growth kinetics. A Rotational Central Composite Design (RCDD) was used, performing 18 tests, with MSR, Gly and AS between 0.0 to 66.49 g/L, 0.0 and 50.0 g/L and 0.1 to 4.76 g/L respectively. The cultures were carried out in 250 mL flasks with a volume of 99 mL culture medium and inoculum of 1 mL at 250 rpm and a temperature of 28 ° C, for a time of 48 h. The highest content of L and ϕ_g was 52.37% and 4.487 g/L respectively with T11, using 33.24 g/L, and 2.43 g/L of MSR, and AS respectively, with a C/N ratio of 29.32.

The use of the Gompertz model did not allow obtaining a statistical consistency of the experimental data (R^2 between 0.76 to 0.93), due to the adaptation phase of *R. toruloides* cells to the culture medium and a high dispersion of growth kinetics.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, cane molasses, glycerol, ammonium sulfate, biodiesel, oleochemicals, kinetic parameters.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la contaminación ocasionada por la actividad agroindustrial es un problema latente, que avanza a un ritmo acelerado en el país, aumentando su impacto en el medio ambiente. Por tal motivo, las agroindustrias se encuentran cada vez más comprometidas con su mitigación, reduciendo la emisión de gases y vapores contaminantes a la atmosfera mediante el uso de filtros especiales, disminuyendo el nivel de contaminación de sus aguas servidas, mediante la aplicación de sistemas purificadores, entre otros. Pero son en especial interés los residuos (sólidos y líquidos) que se producen durante sus procesos, lo cual podría generar ingresos económicos contribuyendo a la reducción del impacto medioambiental.

Se ha tomado particular interés en los ingenios azucareros, de los cuales se obtienen variedades de azúcar (blanca, refinada y rubia, etc.) como producto principal, y a su vez subproductos tales como fibra de bagazo la cual es usada como combustible de los propios ingenios y en la fabricación de papel, los alcoholes usados en la obtención de alimentos y bebidas, la melaza la cual es vendida para ser parte de piensos en la alimentación animal, entre otros subproductos. El presente estudio se ha centrado en el uso de la melaza dada la gama de compuestos que posee. Dicha composición varía de acuerdo a la variedad de la caña y eficiencia de la operación entre otros, pero aun así posee un gran potencial, en el cual recae el enfoque del presente estudio, otorgándole un uso alternativo (Fajardo y Sarmiento, 2007).

La melaza compuesta mayoritariamente de fuentes de carbono, puede ser aprovechada como sustrato por microorganismos oleaginosos los cuales, mediante fermentación, son capaces de replicarse usando dicha fuente, aumentando su contenido lipídico, con la posterior extracción de dichos compuestos, de cuyos variados usos, podría ser aprovechado elaboración de biodiesel, así como en la industria oleoquímica, el cual es un sector con diversas aplicaciones e importantes logros en los referente a tensoactivos, cuyos estudios poseen gran proyección, debido a los aportes ecológicos, energéticos, económicos y sanitarios que representan.

La cepa de *R. toruloides* se presenta en este estudio como la levadura idónea para realizar dicha función, por su alta capacidad de producción de lípidos, lo cual constituye una vía alternativa para el uso de la melaza y la posterior obtención del biocarburante biodiesel, por su alto rendimiento hallado en trabajos previos (Wang *et al.*, 2012). Por otro lado, se reporta que *R. toruloides* posee gran valor biotecnológico por producir también, carotenoides e

importantes enzimas como cefalosporina esterasa y epóxido hidrolasa (Zhu *et al.*, 2012), además posee un ciclo de vida corto. Cabe resaltar la composición de ácidos grasos obtenidos de *R. toruloides* 24.3% de Ac. Palmítico, 1.1% de Ac. Palmitoleico, 7.7% de Ac. Esteárico, destacando la obtención de 54.6% de Ac. Oléico (Omega 9) y 2.1% de Ac. Linoleico (Omega 6), lo cual podría ser aprovechada en el rubro de la industria alimentaria y fármacos, adicional a su aplicación en producción de biodiésel. (Corpas-Rodriguez *et al.*, 2019).

Otro sustrato de interés es el glicerol, un alcohol compuesto con tres grupos -OH (hidroxilos) y una cadena carbonada; es una sustancia higroscópica y con pH neutro, estable químicamente bajo condiciones normales de almacenamiento y manipulación. A su vez, se ha reportado microorganismos, que tienen la capacidad de utilizarlo como fuente de carbono para la producción de biomasa y lípidos (Saenge *et al.*, 2011) entre los cuales se puede mencionar a las levaduras oleaginosas para la producción de biodiesel (Faife-Pérez *et al.*, 2012) cuya producción mundial va en aumento como una alternativa para la sustentabilidad (REN21, 2019).

Por otro lado, el sulfato de amonio, es una fuente de nitrógeno y azufre, destacándose su utilización como fuente nitrogenada para el cultivo de levaduras (Durango, 2007), dicho compuesto, como fuente de nitrógeno, incide en la concentración el desarrollo celular aportando estos nutrientes y resaltando por su gran poder acidificante, aportante de azufre de bajo costo, permitiendo la dotación de nitrógeno con eficiencia, y al poder ser usado con otros compuestos posibilita una mezcla homogénea (Tello, 1999). Ha sido utilizado en diversas investigaciones para evaluar el crecimiento de levaduras oleaginosas y su acumulación lipídica, demostrando un aporte significativo como fuente de nitrógeno (Saenge *et al.*, 2011).

La forma más común de elaborar biodiesel es mediante la utilización de biomasa renovable por transesterificación de triacilgliceroles, que permiten obtener esteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena corta (Vicente *et al.*, 2004). Generalmente se fabrican de aceites vegetales (Tejada *et al.*, 2013) o grasas animales (Goodrum *et al.*, 2003) inclusive residuos de aceites (Gutiérrez *et al.*, 2009). A diferencia del

diésel o gasóleo, el biodiesel es biodegradable, no tóxico, no aporta dióxido de carbono, ni azufre al medio ambiente, emitiendo menos contaminantes gaseosos.

Por cada litro de gasóleo reemplazado por biodiesel, se evita la emisión de 2.4 kg de CO₂ a la atmosfera (Lang *et al.*, 2001). Además, las características técnicas del biodiesel son muy similares al diésel en lo que refiere al número de cetano, viscosidad y lubricidad, que además mejora con el uso de biodiesel, lo que puede suponer un aumento de la vida útil de motores de los vehículos (REN21, 2016). Lo cual genera gran interés entre los consumidores a nivel mundial. Otro aspecto a tener en cuenta es la tendencia del crecimiento poblacional global y su demanda energética, se suma la disminución de las reservas de petróleo y el incremento en el precio del mismo, por parte de los países con mayores reservas.

Los biocombustibles, principalmente etanol y biodiesel, proporcionan alrededor del 3% de la energía del transporte, asimismo la producción mundial de biocombustibles aumentó un 5% en 2019 (161 mil millones de litros). La producción de biodiesel aumentó un 13% en 2019 (47.4 mil millones de litros) e Indonesia se convirtió en el mayor productor mundial (17% producción global), superando a los Estados Unidos (14%) y Brasil (12%), asimismo los productores más importantes de fueron Alemania (8%), Francia (6.3%) u Argentina (5.3%). (REN21, 2020).

Cabe precisar que el Perú posee un marco legal para la producción y uso de los biocombustibles, asimismo tanto en el sector privado empresarial como algunas ONG y universidades se han realizado estudios para determinar la viabilidad del uso de los biocombustibles como alternativa energética. Siendo las principales materias primas usadas en el Perú en la obtención de biodiesel, la palma aceitera, *Jatropha* y en menor proporción la colza.

En el año 2014 el Perú importaba biodiesel extranjero (Argentina), por un monto de 500 a 600 millones, lo cual puso en desventaja a los productores nacionales (Heaven Petroleum Operators, Palma del Espino, y Pure Biofuels) debido a que el biodiesel argentino llegaba hasta el Perú con precios subsidiados, motivo por el cual las plantas nacionales cerraron en ese año. Asimismo, con los derechos compensatorios impuestos contra Argentina (2016), se dio fin a los precios subsidiados que perjudicaban la industria de país, promoviendo una mayor producción y competencia, cabe indicar que posterior a ello, la legislación peruana

aprobó la utilización de un 5% de biodiesel para uso como fuente de combustible (2018) incentivando la producción en el país del referido biocombustible (AGRARIA.PE, 2018). Para el 2020 se proyectó la adquisición de 40 mil toneladas de biodiesel (a partir de palma aceitera) de producción nacional como parte del acuerdo suscrito entre la Junta Nacional de Palma Aceitera del Perú (JUNPALAM) y la empresa Heaven Petroleum Operators (HPO), proveedora de biodiesel de PETROPERÚ (AGRARIA.PE, 2019).

Por otro lado, existe expectativa por los acuerdos tomados por el Consejo de la Unión Europea, el cual decidió limitar el consumo de biocombustible provenientes de cultivos alimentarios en el transporte para el año 2020, esperando que el 10 % del combustible para dicho sector provenga de fuentes renovables. Se acordó fijar un tope de 7 % a los llamados “biocombustibles de primera generación”, para dar lugar a la producción mediante algas, levaduras y algunos residuos, lo cual corresponde a la producción de biodiesel de tercera generación, ello presenta amplias ventajas como su alto rendimiento, ser una alternativa de cultivo sin necesidad de grandes extensiones de terrenos y la no competición con la industria alimentaria.

Sin embargo, la generación de insumos alternativos para la obtención de biodiesel que no perjudique la producción de otros sectores y que permitan una producción continúa a bajo costo y de manera sustentable constituye un reto actualmente. Motivo por el cual, el presente trabajo plantea la necesidad de conocer si es posible mejorar la producción de biomasa de la levadura *R. toruloides* por efecto de la concentración de melaza por su presencia de azúcares reductores (ARM), glicerol y sulfato de amonio. La elección de la levadura se debe a sus características oleaginosas la cual constituye una fuente potencial a ser usada en como parte del proceso de elaboración de biodiesel, dejando así un precedente para la obtención de productos oleoquímicos con eficiencia y sustentabilidad. Siendo elegido el uso de levaduras oleaginosas por poseer mucho mayor capacidad de retención de lípidos a comparación de las microalgas y bacterias (Wang *et al.*, 2012).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

Laboratorios de Biomoléculas y Microbiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias Agroindustriales de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.2. Materiales y equipos

2.2.1. Materiales

Cepa *R. toruloides* CCT 0783 NCYC adquirida del Instituto André Tosello de Brasil. Agar Maltosa-Levadura (AML), compuesto de extracto de levadura (3 g), extracto de malta (3 g), bacto peptona (5 g), dextrosa (10 g), agar (20 g), agua destilada (1000 mL). Caldo Maltosa-Levadura (CML), de igual composición que el medio anterior sin dosificación de agar.

Medio de cultivo (MGSA) constituido por melaza de caña de azúcar (Anexo 1) proveniente de la Empresa Agroindustrial Laredo, glicerol (Gli) químicamente puro, y sulfato de amonio (SA) químicamente puro, adecuadamente formulado de acuerdo a la Tabla 2.

2.2.2. Equipos

Agitador orbital BioMarker BS-E24-1004, regulado a una velocidad de 250 rpm, con matraces de 250 mL de capacidad a temperatura de 28°C. Estufa de laboratorio MEMMERT 400 de 32 L de volumen con rango de temperaturas de 30 °C a 120 °C, microscopio óptico Motic BA310, balanza analítica Ohaus, pH metro Mettler Toledo con electrodo inlab 43, autoclave vertical Fravill-905070, cámara de Neubauer Brand, Alemania.

2.3. Metodología

2.3.1. Proceso de producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos de *R. toruloides*

La secuencia del proceso es la mostrada en la Figura 1, la cual se detalla a continuación:

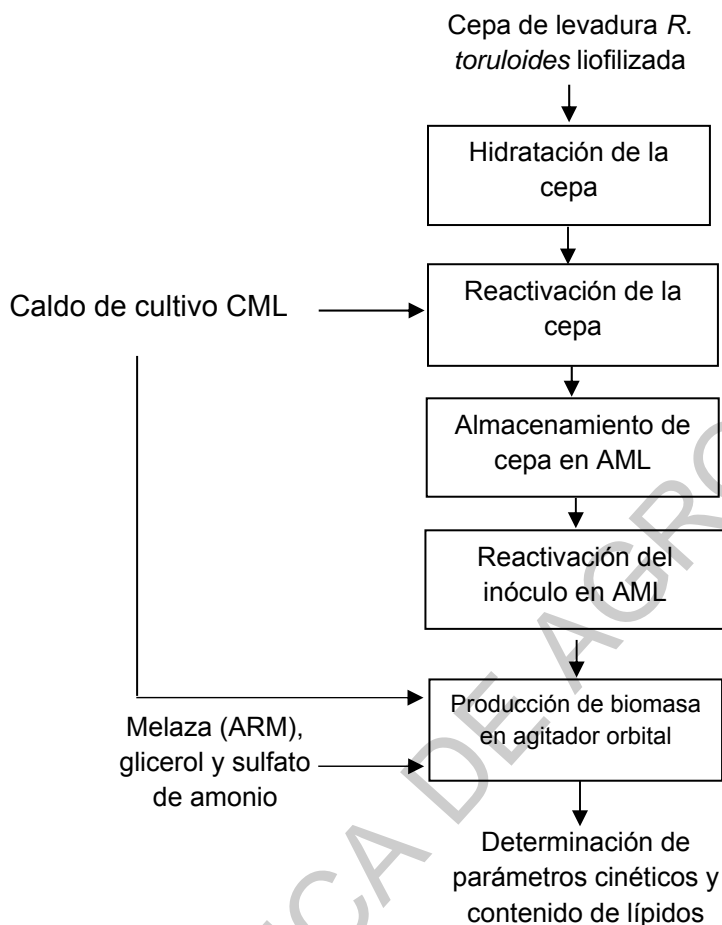


Figura 1. Secuencia del proceso para la producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos de *R. toruloides*.

Hidratación de la cepa

Se realizó el rompimiento de la ampolla liofilizada con *R. toruloides* en un ambiente estéril, para ello se desinfectó la superficie exterior de la ampolla con un algodón empapado en alcohol etílico al 70%, luego se procedió a la rotura de la ampolla por choque térmico, mediante la aplicación de llama de un mechero de Bunsen, posteriormente se agregó 0.2 mL de agua destilada para la hidratación que se realizó mediante un tiempo de espera de 10-15 minutos.



Figura 2. Rotura de ampolla para posterior hidratación de cepa de *R. toruloides*

Reactivación de la cepa

Se transfirió los 0.2 mL de la cepa hidratada a un tubo con 5 mL de CML, incubándose a 28°C por 24 horas, hasta observar turbidez (indicador de crecimiento). Posteriormente se realizó una siembra de agotamiento por estría en AML en placas Petri y/o en tubo de ensayo.



Figura 3. Almacenamiento de cepa *R. toruloides* 28°C, durante 48h, y siembra en placa mediante estrías de agotamiento (De izquierda a derecha).

Almacenamiento de cepa en AML

Seguidamente las placas y/o tubos de ensayo se almacenaron a una temperatura de 5°C para su conservación y utilización posterior para diferentes fines.

Reactivación del inóculo en AML

De los 5 mL de CML con cepa reactivada se realizó un replique en 10 tubos de ensayo conteniendo 5 mL de CML, a los cuales se le proporcionó agitación constante por 48 h en agitador orbital a 28°C y 250 rpm.

De cada tubo de ensayo se obtuvieron dos azadas, que se sembraron en placas con AML mediante agotamiento por estrías, de las cuales se recolectó muestras que fueron sembradas por azadas en matraces con 250 mL conteniendo CML. Los que se incubaron por 48 h en agitador orbital a 28°C y 250 rpm hasta llegar a una densidad celular de 9.6×10^5 cel/mL, los que sirvieron para cada uno de los tratamientos realizados.

Producción de biomasa en agitador orbital

Se realizó mediante el agregado del inóculo obtenido en el paso anterior (25 mL) a 18 matraces de 250 mL con un volumen de operación de 100 mL compuesto por 99 mL de medio MGSA conveniente esterilizado en autoclave a 120 °C durante 15 min y 1 mL de inóculo, los cuales fueron agitados en un agitador orbital por 48 h a 250 rpm a una temperatura de 28°C. Los medios de cultivo MGSA en los 18 tratamientos variaron en el contenido de ARM de 0.0 a 66.5 g/L el cual se obtuvo a partir de melaza con 48.8% de ARM. Asimismo, los contenidos de glicerol variaron de 0.0 a 50.0 g/L y sulfato de amonio de 0.1 a 4.76 g/L. Durante el proceso fermentativo, cada 3 horas se determinaron los valores de pH, para lo cual se extrajo 4 mL de medio con la asepsia adecuada realizándose el recuento de las células en cámara Neubauer.

Determinación de los parámetros cinéticos

Fueron obtenidos utilizando el modelo Gompertz (Miñano y Villalobos, 2012) de acuerdo a:

$$YA = \phi * \exp(-\exp(b-c*TA))$$

Donde:

$$YA = \log(N/N_0)$$

N es el número de células/mL formadas en el tiempo (TA: h)

N_0 es el número de células/mL en el tiempo inicial del experimento

ϕ es el valor máximo de la biomasa ($\log(N/N_0)$)

b y c constantes de la función

μ_{\max} es el valor máximo de la biomasa ($\phi \cdot c$), h^{-1}

λ es la fase de adaptación $[(b-1)/c]$, h

G es el tiempo de generación $[\ln(2)/\mu_{\max}]$, h

Determinación del contenido de lípidos

Llegada la máxima estacionaria y a un tiempo de 48 h, se procedió a concentrar la biomasa húmeda por centrifugación, determinándose el contenido de lípidos por método gravimétrico (Mendez *et al.*, 2021).

2.3.2. Esquema experimental

Se siguió la secuencia experimental mostrada en la Figura 4.

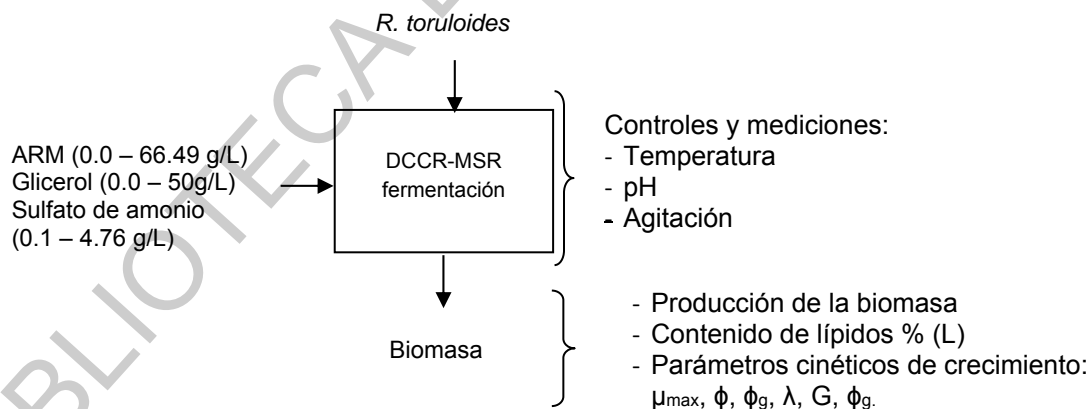


Figura 4. Esquema experimental para la producción de biomasa, lípidos y determinación de los parámetros cinéticos de *R. toruloides* por efecto de la concentración de ARM de la melaza de caña, glicerol y sulfato de amonio.

Se utilizó un DCCR (Diseño Compuesto Central Rotacional) para evaluar el efecto de la concentración de la melaza utilizando los ARM entre los límites de 0.0 a 66.49 g/L de ARM, sulfato de amonio entre 0.1 y 4.76 g/L (0.02 a 1 g/L de N amoniacal) y glicerol entre 0.0 y 50 g/L. El planteamiento experimental se basó en una ampliación del rango máximo de azúcares reductores totales de la melaza (50 g/L de ARM) y el valor máximo de sulfato de amonio utilizados por Vieira *et al.*, (2014), asimismo teniendo en cuenta las concentraciones de glicerol crudo reportadas por Xu *et al.* (2012) como fuente de carbono.

Los valores utilizados en el presente estudio se indican en la Tabla 1. Usando un planeamiento factorial completo: 2^n , incluido 6 puntos axiales y 4 puntos centrales, con lo cual se obtuvo 18 unidades experimentales. El exponencial n es el número variables independientes ($n=3$) ARM, glicerol (G) y sulfato de amonio (SA). El Diseño Compuesto se hizo rotatable mediante la elección de α el cual a su vez fue igual a $(2^n)^{1/4}$ (Baltazar *et al.*, 2013).

Tabla 1. Valores utilizados en el DCCR

Variables independientes	Niveles (g/L)				
	-1.68	-1	0	1	1.68
ARM	0.00	13.48	33.24	53.01	66.49
Glicerol (G)	0.00	10.13	25.00	39.87	50.00
Sulfato de amonio (SA)	0.10	1.04	2.43	3.82	4.76

Con los valores de la Tabla 1 se elaboró la Tabla 2 donde además de las variables independientes mencionadas, se consideraron como variables dependientes ϕ , μ_{\max} , λ , G, peso seco de la biomasa en gramos (ϕ_g) y producción de lípidos en porcentaje (L).

Tabla 2. Matriz experimental para la evaluación de la producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos de *R. toruloides* por efecto de la concentración ARM de melaza de caña, glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA).

T	Variables independientes						C/N	Variables dependientes					
	Valores codificados			Valores Reales				Φ	Φ_g	μ	λ	G	L
	X ₁	X ₂	X ₃	ARM (g/L)	Gli (g/L)	SA (g/L)							
T1	-1	-1	-1	13.48	10.13	1.04	37.68	ϕ_1	ϕ_{g1}	μ_1	λ_1	G ₁	L ₁
T2	-1	-1	1	13.48	10.13	3.82	15.96	ϕ_2	ϕ_{g2}	μ_2	λ_2	G ₂	L ₂
T3	-1	1	-1	13.48	39.87	1.04	64.54	ϕ_3	ϕ_{g3}	μ_3	λ_3	G ₃	L ₃
T4	-1	1	1	13.48	39.87	3.82	27.34	ϕ_4	ϕ_{g4}	μ_4	λ_4	G ₄	L ₄
T5	1	-1	-1	53.01	10.13	1.04	49.74	ϕ_5	ϕ_{g5}	μ_5	λ_5	G ₅	L ₅
T6	1	-1	1	53.01	10.13	3.82	31.93	ϕ_6	ϕ_{g6}	μ_6	λ_6	G ₆	L ₆
T7	1	1	-1	53.01	39.87	1.04	60.75	ϕ_7	ϕ_{g7}	μ_7	λ_7	G ₇	L ₇
T8	1	1	1	53.01	39.87	3.82	39.00	ϕ_8	ϕ_{g8}	μ_8	λ_8	G ₈	L ₈
T9	-1.68	0	0	0	25	2.43	18.99	ϕ_9	ϕ_{g9}	μ_9	λ_9	G ₉	L ₉
T10	1.68	0	0	66.49	25	2.43	45.23	ϕ_{10}	ϕ_{g10}	μ_{10}	λ_{10}	G ₁₀	L ₁₀
T11	0	-1.68	0	33.24	0	2.43	29.32	ϕ_{11}	ϕ_{g11}	μ_{11}	λ_{11}	G ₁₁	L ₁₁
T12	0	1.68	0	33.24	50	2.43	48.13	ϕ_{12}	ϕ_{g12}	μ_{12}	λ_{12}	G ₁₂	L ₁₂
T13	0	0	-1.68	33.24	25	0.1	73.78	ϕ_{13}	ϕ_{g13}	μ_{13}	λ_{13}	G ₁₃	L ₁₃
T14	0	0	1.68	33.24	25	4.76	26.25	ϕ_{14}	ϕ_{g14}	μ_{14}	λ_{14}	G ₁₄	L ₁₄
T15	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	ϕ_{15}	ϕ_{g15}	μ_{15}	λ_{15}	G ₁₅	L ₁₅
T16	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	ϕ_{16}	ϕ_{g16}	μ_{16}	λ_{16}	G ₁₆	L ₁₆
T17	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	ϕ_{17}	ϕ_{g17}	μ_{17}	λ_{17}	G ₁₇	L ₁₇
T18	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	ϕ_{18}	ϕ_{g18}	μ_{18}	λ_{18}	G ₁₈	L ₁₈

2.3.3 Métodos fisicoquímicos y microbiológicos

2.3.3.1. Análisis fisicoquímico

Se realizaron mediciones de pH (AOAC INTERNATIONAL,1982) en la melaza y en el medio MGSA con la biomasa durante el proceso fermentativo.

Determinación de los azúcares reductores totales según Del Castillo (2012) (Anexo 5).

Determinación del contenido de lípidos utilizando el método gravimétrico (Mendez *et al.*, 2021).

2.3.3.2. Análisis fisicoquímico y microbiológico

Determinación de la biomasa húmeda (g m.h./L) y biomasa seca (g m.s./L) utilizando gravimetría (Ling *et al.*, 2013).

Determinación de la biomasa celular ($N = \text{células/mL}$), realizado cada 3 horas utilizando cámara Neubauer y microscopía óptica con un objetivo de 40X (Anexo 6 y 7).

Determinación del contenido de C/N mediante la metodología Walkley y Black y método Kjeldahl (Walkley y Black, 1934; Bremner, 1960) (Anexo 8 y 9).

2.3.4. Análisis estadístico

Para determinar la consistencia estadística de la relación entre las variables dependientes e independientes consignadas en la matriz experimental de la Tabla 2, se utilizó el software Statistica (N° de licencia: ZZS9990000099100363), y un ANOVA para verificar si el modelo estadístico fue significativo ($p < 0.05$), así como el coeficiente de determinación R^2 .

BIBLIOTECA DE AGROPECUARIAS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se muestran los valores de obtenidos de producción máxima de biomasa (ϕ) calculados a partir del modelo de Gompertz como $\log(N/N_0)$, así como μ_{\max} , λ , G; asimismo producción de biomasa en masa seca (ϕ_g), % de lípidos (L) en *R. toruloides*. También se consigna la relación C/N calculada en los medios de cultivo de los 18 tratamientos.

Se observa en el T2 el mayor valor de ϕ con 6986, en un medio con 13.48 g/L de ARM, 10.13 g/L Gli y 3.82 g/L SA. Los más bajos valores de ϕ se dan en dos extremos sin presencia de ARM (T9, 2800) y con la máxima concentración de ARM (T10, 2204). Todos los tratamientos se desarrollaron a una temperatura adecuada de 28°C (Wang *et al.*, 2012). Los valores de SA en el medio para los tratamientos mencionados no tuvieron valores extremos marcadamente distantes (2.43 a 3.82 g/L).

Tabla 3. Resultados experimentales para la evaluación de la producción de biomasa (ϕ , ϕ_g), lípidos (L), número de células (N) y parámetros cinéticos (μ , λ , G) en *R. toruloides* por efecto de la concentración de azúcares reductores de melaza de caña de azúcar (ARM), glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA)

T	Variables independientes						Variables dependientes							
	Valores codificados			Valores Reales			C/N	ϕ	ϕ_g (g/L)	N (cel/mL)	μ (h ⁻¹)	λ (h)	G(h)	L(%)
	X ₁	X ₂	X ₃	ARM (g/L)	Gli (g/L)	SA (g/L)								
T1	-1	-1	-1	13.48	10.13	1.04	37.68	1.65	0.927	5744	0.41	0.84	1.70	29.33
T2	-1	-1	1	13.48	10.13	3.82	15.96	1.74	2.760	6986	0.12	4.59	5.78	30.36
T3	-1	1	-1	13.48	39.87	1.04	64.54	1.61	0.391	5167	0.43	1.48	1.61	32.92
T4	-1	1	1	13.48	39.87	3.82	27.34	1.61	2.024	5239	0.40	2.60	1.74	28.18
T5	1	-1	-1	53.01	10.13	1.04	49.74	1.69	2.178	6255	0.25	2.69	2.78	31.04
T6	1	-1	1	53.01	10.13	3.82	31.93	1.60	2.416	5037	0.40	4.45	1.71	32.86
T7	1	1	-1	53.01	39.87	1.04	60.75	1.48	2.387	3821	0.29	-0.18	2.40	32.31
T8	1	1	1	53.01	39.87	3.82	39.00	1.51	2.647	4104	0.47	4.80	1.48	38.23
T9	-1.68	0	0	0	25	2.43	18.99	1.34	0.784	2800	0.46	3.31	1.49	25.34
T10	1.68	0	0	66.49	25	2.43	45.23	1.24	1.144	2204	0.25	3.92	2.77	38.53
T11	0	-1.68	0	33.24	0	2.43	29.32	1.48	4.487	3901	0.32	3.12	2.15	52.37
T12	0	1.68	0	33.24	50	2.43	48.13	1.41	1.809	3305	0.20	9.17	3.54	42.80
T13	0	0	-1.68	33.24	25	0.1	73.78	1.31	4.460	2619	0.37	2.26	1.88	42.37
T14	0	0	1.68	33.24	25	4.76	26.25	1.43	1.289	3477	0.22	1.90	3.13	39.07
T15	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	1.30	1.044	2560	0.28	4.32	2.49	45.50
T16	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	1.36	1.067	2939	0.26	2.65	2.65	52.70
T17	0	0	0	33.24	25	2.43	38.72	1.32	1.178	2668	0.28	3.08	2.47	46.46
T18	0	0	0	33.24	25	2.43	35.58	1.29	0.933	2479	0.40	5.10	1.75	37.23

Esto demuestra que la melaza tiene un efecto importante en el desarrollo de *R. toruloides*. La melaza como fuente de carbono en el medio de cultivo de *R. toruloides* es una alternativa debido al bajo costo para la obtención de biomasa y lípidos (Gao *et al.*, 2017), sin embargo, una elevada concentración de fuente de carbono puede llegar a generar limitación en el desarrollo de *R. toruloides*, tal como lo evidenciaron Kraisintu *et al.* (2010) en concentraciones mayores a los 70 g/L de glucosa, que contenían adicionalmente 0.75 g/L extracto de levadura, 0.55 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L de KH_2PO_4 y 2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sumado al exceso de carbono, la limitación de nutrientes como el nitrógeno, pueden llegar a impedir el crecimiento celular, con la posterior conversión del exceso de carbono en lípidos de almacenamiento (Saenge *et al.*, 2011).

El glicerol juega un papel importante en el desarrollo de la levadura, ya que como se observa a pesar de no existir melaza, pero si glicerol, se nota que se produce biomasa (T9, C/N:18.99) 0.784 g/L como se ha mencionado en el párrafo anterior. Al respecto Xu *et al.* (2012) han reportado elevada producción de biomasa y lípidos en *R. toruloides* utilizando 60 g/L de glicerol en un fermentador de 5 L (pH 6.0, oxígeno disuelto entre 20 a 30% de saturación, 2 vvm de aire y biorreactor tanque agitado), obteniendo 26.5 g/L de biomasa seca y 69.4% de lípidos. Utilizando un fermentador fed-batch con 60 g/L de glucosa se obtuvo 16.7 g/L de biomasa seca y 66.9% de lípidos. Igualmente, Bonturi *et al.* (2017), utilizando frasco agitado (pH 6, 200 rpm y 28 °C), utilizando 90 mL de la mezcla de SCBCH (5.3 g/L xilosa, 0.4 g/L glucosa, 1.4 g/L ácido acético, 0.2 g/L HMF y 1.7 g/L furfural obtenido mediante un proceso hidrotérmico de bagazo) suplementado con 55 g/L de glicerol obtuvieron 6.6 g/L de biomasa celular y 55.5% de lípidos de *R. toruloides* CCT 0783, después de 96 horas, siendo la relación C/N de 100.

La sola presencia de melaza (T11, C/N:29.32) promovió un mejor desarrollo del *R. toruloides*, $\phi_g = 4.487$ g/L y mejor contenido de lípidos de 52.37%. En comparación con el tratamiento T9, que utilizó glicerol, donde se obtuvo 25.34% de lípidos. Una combinación de los componentes melaza y glicerol que no posibilitaron un aumento de ϕ_g (T1, C/N:37.68 con 0.927 g/L, T2, C/N:15.96 con 2.760 g/L y T5, C/N:49.74 con 2.178 g/L). En la zona de los puntos centrales se obtuvo un $\phi_g = 1.059 \pm 0.1226$ g/L, con una relación C/N 38.72 y una

concentración de lípidos (L) de 45.5 ± 6.4 %. Este valor difiere de los obtenidos por los autores Xu *et al.* (2012) y Bonturi *et al.* (2017), debido posiblemente a la composición de los medios de cultivo y a las condiciones del bioproceso en el cual la melaza por sí sola, no aporta todos los nutrientes que adicionalmente utilizaron los investigadores mencionados.

En *R. toruloides*, Vieira *et al.*, (2014) utilizando melaza brasileña (50 a 60 g/L de azúcares reductores totales de melaza con relación C/N de 13.5 a 40) y 4.76 g/L de SA obtuvieron 44% de lípidos, en un biorreactor tanque agitado fed-batch con 1.5 L de volumen de operación inicial, temperatura de 28 °C, pH 5.8, 0.5 vvm, 250 rpm y oxígeno disuelto con 30% de saturación. La diferencia obtenida con la presente investigación puede estar relacionada a la diferencia de calidad de la melaza, que en la presente investigación tesis, utilizó una melaza de origen peruano; que en el tratamiento T11 mostró una relación C/N de 39.32, con un contenido de lípidos de 52.37%. Zhao *et al.*, (2010) obtuvieron 56.5% de lípidos utilizando *R. toruloides*, con una relación C/N de 18 en un medio conteniendo hidrolizado de alcachofa, dichos procesos fueron ajustados a un pH 6, incubado a 30°C durante 36 horas a 200 rpm, en un biorreactor tanque agitado fed-batch. a un volumen inicial de 9 L oxígeno disuelto entre 40 y 50 de saturación.

Kraisintu *et al.*, (2010), utilizando *R. toruloides*, con una relación C/N 140 utilizando glucosa, obtuvieron una biomasa seca de 13.33 g/L con una acumulación lipídica de 71.30% a las 168 h, utilizando frasco agitado a 150 rpm y 28°C. En la presente investigación en el tratamiento T11, con una relación C/N de 29.32 se obtuvo el mejor contenido de lípidos 52.37, lo cual se podría mejorar aumentando la relación C/N, cuidando de no llegar a concentraciones elevadas de azúcares, a fin de no provocar un efecto crabtree.

Otros investigadores han logrado a sobrepasar el 63.4% de producción lipídica como es el caso de Wang *et al.*, (2012) quienes utilizaron almidón de yuca hidrolizado en un medio de laboratorio, en tanto Carota *et al.*, (2020), ha mencionado que se pueden producir hasta un 79% de lípidos en *R. toruloides*, utilizando extracto de cáscara de naranja y 0.6 g/L de sulfato de amonio con una relación C/N de 33.0 a 70.1 a un pH 5.5.

Mayores valores de producción de biomasa como se ha mencionado (T1, T2 y T5) se contrastan con menores valores de producción de lípidos de 29.33% a 29.04%. Esto es coherente con lo reportado por Saenge *et al.*, (2011) quienes afirman que en una baja relación C/N, el flujo de carbono se distribuye para permitir la proliferación celular, por ello, se podría obtener un gran número de células, pero con bajo contenido en lípidos (Kraisintu *et al.*, 2010).

En la Figura 3 se observa la evolución de la cinética de crecimiento de *R. toruloides* en los medios de cultivo de los 18 tratamientos (Tabla 3), así como la curva de ajuste hasta la máxima estacionaria, obtenida con el empleo del modelo de Gompertz, los que no mostraron adecuado ajuste estadístico ($R^2=0.76$ y 0.93), esto posiblemente como se observa a los desajustes producidos en la fase de adaptación, tiempo de proceso y velocidad de agitación de 250 rpm que aunado a las características del medio con presencia de melaza llevaron a la formación de “fouling” en la superficie de los frascos, lo cual puede generar una reducción de la productividad, debido a la concentración de células en un sector dentro del contenedor, lo cual genera disminución del flujo, ante dicha situación, algunos autores recomiendan usar sustancias antiincrustantes, químicamente estables e inertes, tales como las derivados del quitosano, poliacrilatos y derivados de polietilenglicol. (Roux *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2015)

En la Tabla 4, se observan los valores iniciales y final de pH durante los tratamientos experimentales. En el tratamiento T11 se observó un pH inicial de 5.21 y al final del proceso de 5.96, lo cual está muy cercano de los valores reportados por Ageitos *et al.*, (2011) quienes indican valores óptimos de 5.6 a 5.8

en *R. toruloides*. Asimismo, se observan que los valores aumentaron de un promedio de 5.18 ± 0.24 a 5.49 ± 0.34 , los cuales son muy similares a los valores reportados por González-García *et al.* (2017), 5.5 (Li *et al.*, 2007 y Zhao *et al.*, 2011), 5.6 Li *et al.* (2006), Zhao *et al.*, (2008), 6.0. Cuyos valores se encuentran dentro de lo reportado en el tratamiento T11.

En la presente investigación tesis, no se utilizó buffer para regular el pH, y su variación estuvo relacionada a la excreción de metabolitos celulares propios de la dinámica de cada cultivo.

Tabla 4. Variación de los valores inicial y final de pH durante los tratamientos experimentales

Tratamientos	pH inicial	pH final	Variación Porcentual
T1	5.02	5.66	12.7%
T2	5.49	6.08	10.7%
T3	5.16	5.44	5.4%
T4	5.39	5.55	3.0%
T5	4.89	4.72	-3.5%
T6	4.95	5.27	6.5%
T7	4.88	5.23	7.2%
T8	5.18	5.26	1.5%
T9	5.89	5.1	-13.4%
T10	5.06	5.38	6.3%
T11	5.21	5.96	14.4%
T12	5.2	5.75	10.6%
T13	4.89	5.3	8.4%
T14	5.25	5.73	9.1%
T15	5.19	5.65	8.9%
T16	5.19	5.75	10.8%
T17	5.166	5.76	11.5%
T18	5.166	5.24	1.4%

Por otro lado, un análisis por MSR (Tabla 4) de la producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos en *R. toruloides* por efecto de la concentración ARM de melaza de caña, Gli y SA, arrojaron un coeficiente de determinación R^2 menor a 0.56, lo que indica la falta de consistencia para aplicar un modelamiento estadístico predictivo.

A pesar de una alta dispersión en biomasa seca (ϕ_g) conforme se muestra en la Figura 4, un análisis estadístico del modelo es consistente con $p < 0.05$, conforme se muestra en el resultado del análisis de varianza de la Tabla 5. Observándose que todas las variables independientes tienen efecto en sus relaciones lineales y cuadráticas, excepto la relación lineal de Gli y SA, que no mostraron interacción respecto a la biomasa.

Tabla 5. Coeficientes de determinación de la producción de biomasa, lípidos y parámetros cinéticos en *R. toruloides* por efecto de la concentración ARM de melaza de caña, Gli y SA

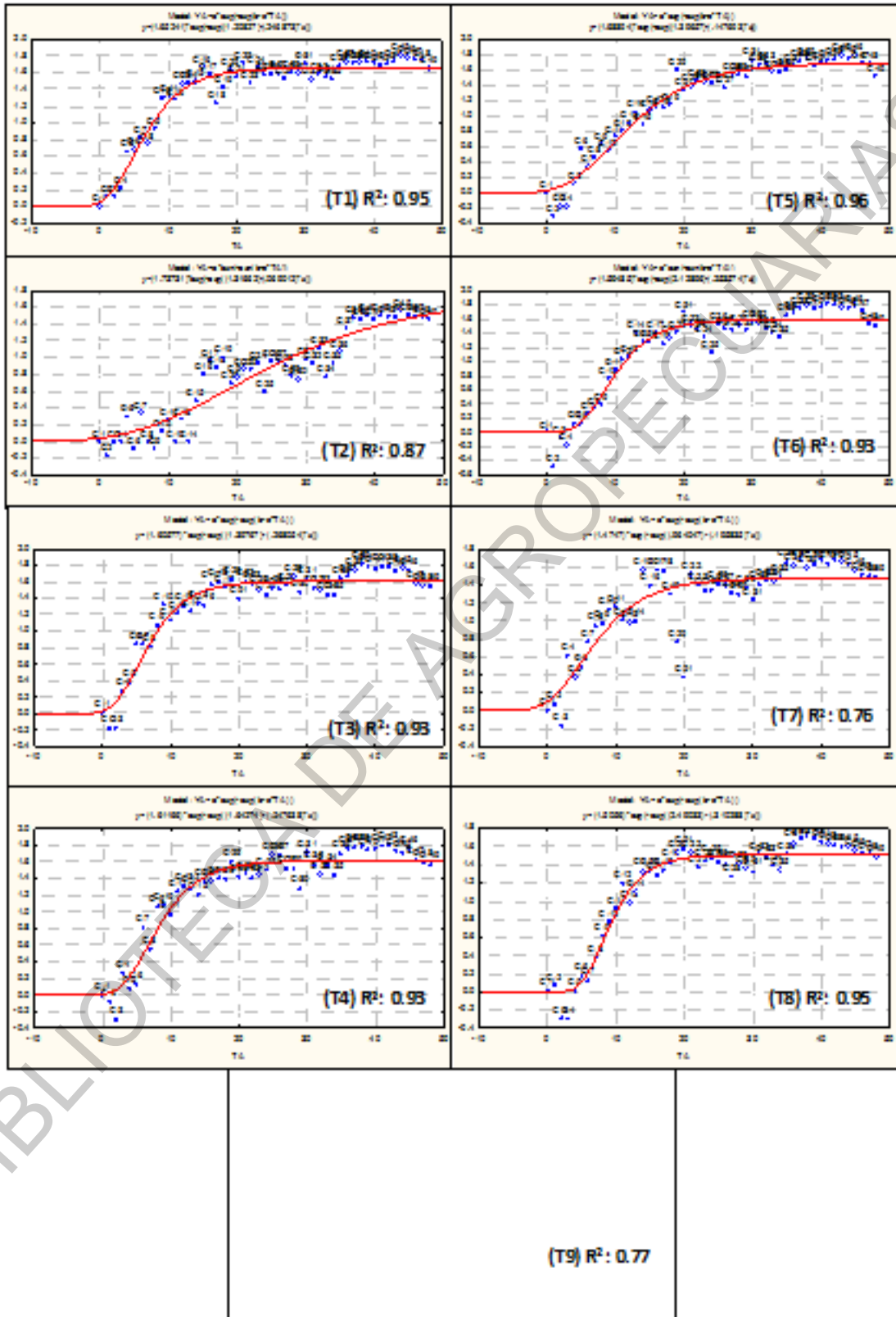
Parámetros	R ²
Biomasa (ϕ)	0.52
Fase de latencia (λ)	0.45
Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max})	0.56
Tiempo de generación (G)	0.58
Producción de biomasa seca (ϕ_g)	0.59
Contenido de lípidos (L)	0.52

Tabla 6. Análisis de varianza de la consistencia del modelo estadístico de la biomasa por efecto de los ARM, glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA).

Fuente de Variación	SS	df	MS	F	p
Modelo	23.4061816	14	1.67187012	166.501819	0.00067257
Residuos	0.03012346	3	0.01004115		
Total	23.4363051	17			

Tabla 7. Estimación de los efectos los ARM, glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA) en la biomasa de *R. toruloides*

	Effect	Std.Err. Pure Err	t(3)	p
Mean/Interc.	1.077966	0.050023	21.5493	0.000219
(1)ARM (L)	0.604720	0.054228	11.1515	0.001545
ARM (Q)	-0.257024	0.056319	-4.5637	0.019730
(2)GLICEROL(L)	-0.781182	0.054238	-14.4028	0.000726
GLICEROL(Q)	1.287500	0.056363	22.8432	0.000184
(3)SULFATO DE AMONIO(L)	-0.198490	0.054305	-3.6551	0.035366
SULFATO DE AMONIO(Q)	1.099545	0.056640	19.4129	0.000299
1L by 2L	0.427923	0.070856	6.0393	0.009104
1L by 3L	-0.741921	0.070856	-10.4708	0.001860
2L by 3L	-0.044444	0.070856	-0.6273	0.574988



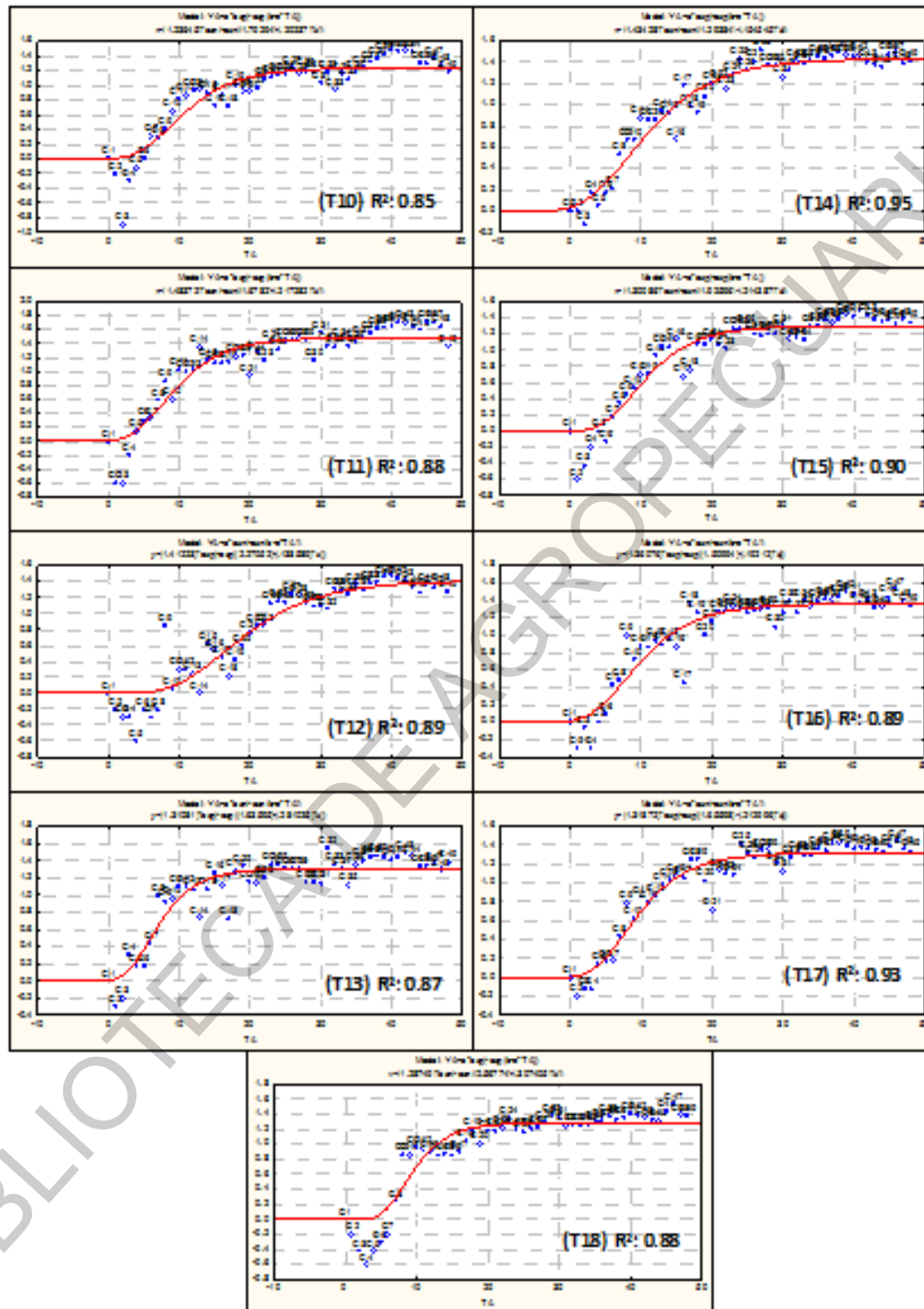


Figura 3. Variación del recuento de células de *R. toruloides* expresadas como log(N/N₀) y modelamiento de la cinética de crecimiento en los 18 tratamientos.

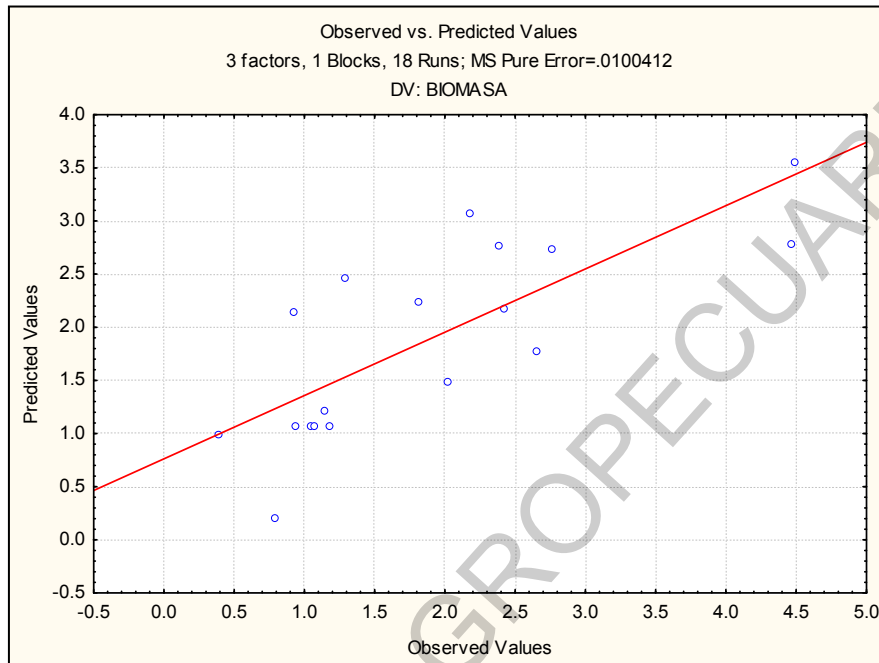


Figura 4. Valores experimentales y predichos de los valores de ϕ obtenidos utilizando MSR.

El modelo estadístico de la biomasa es:

$$\Phi = 3.984733 + 0.051782 * X_1 - 0.000329 * X_1^2 - 0.193424 * X_2 + 0.002911 * X_2^2 - 0.978524 * X_3 + 0.284547 * X_3^2 + 0.000728 * X_1 * X_2 - 0.013503 * X_1 * X_3 - 0.001075 * X_2 * X_3$$

Siendo:

X_1 : Azúcares reductores en la melaza (ARM) (g/L)

X_2 : Glicerol (g/L)

X_3 : Sulfato de amonio (g/L)

Lo cual permite mostrar en un gráfico de contornos la relación de las variables independientes (ARM, Gli y SA) con la biomasa (ϕ) (Figura 5).

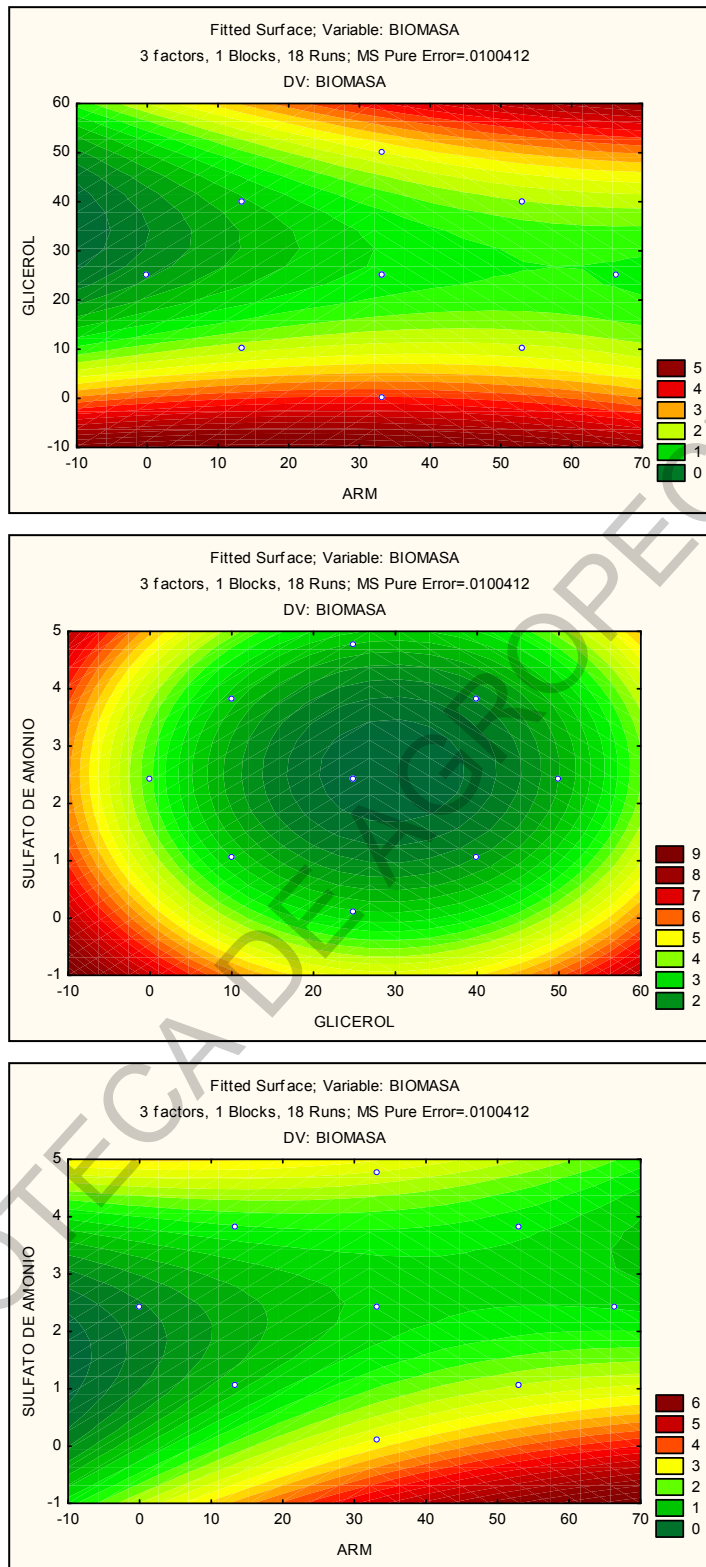


Figura 5. Gráfico de contornos la relación de las variables independientes (ARM, Gli y SA) con la biomasa (ϕ) de *R. toruloides*.

En la Figura 6 se muestra la relación C/N en los 18 medios de cultivo (tratamientos) y la concentración porcentual de lípidos, observándose una alta dispersión. Con una concentración de lípidos en la biomasa seca superior al 50% (52.37% y 52.70%) en los T11 y los puntos centrales (T15, T16, T17 y T18) con relación C/N de 29.32 y 38.72 respectivamente, notándose una tendencia a una disminución al sobrepasar la relación C/N de 49.74. De acuerdo a Coradetti *et al.*, (2018), *R. toruloides* crece en presencia de cantidades elevadas de carbono, frente a nitrógeno limitante, lo que provoca la repartición del flujo metabólico de la levadura para la síntesis de triacilglicéridos que se origina en la membrana del retículo endoplasmático del basidiomiceto. Esto también ha sido sostenido por Christophe *et al.*, (2012), que la limitación de nitrógeno inhibe el crecimiento de la levadura reduciendo significativamente la producción de biomasa y mejorando la producción de lípidos.

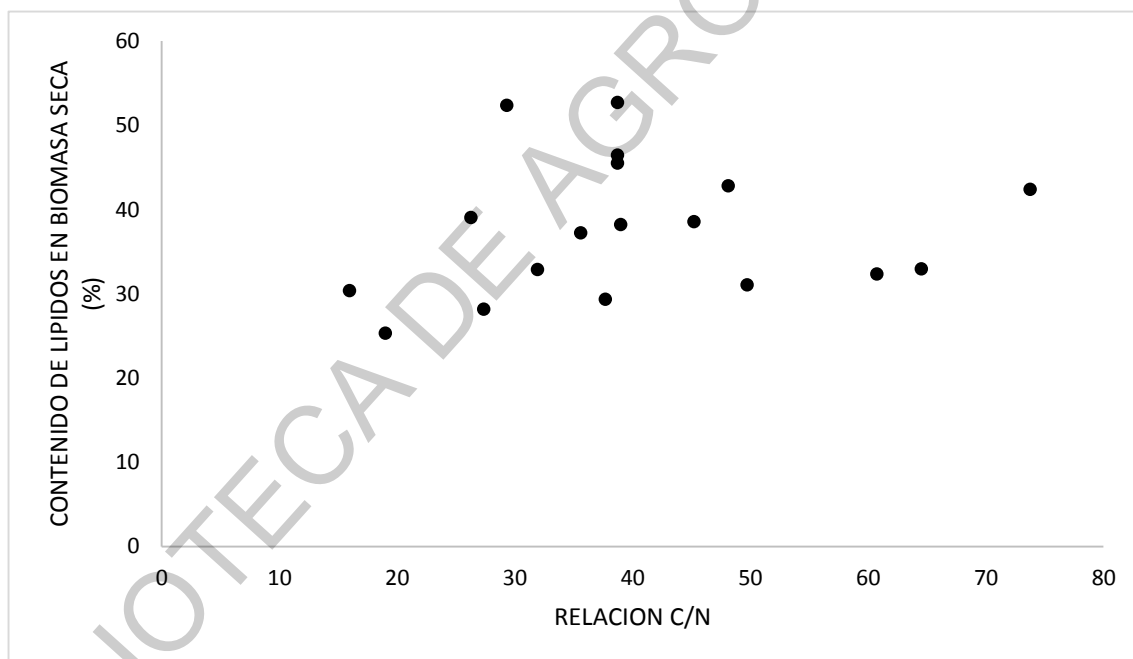


Figura 6. Variación de la relación C/N en los medios de cultivo y la concentración de lípidos en biomasa seca.

4. CONCLUSIONES

La utilización del modelo de Gompertz, indicó en los 18 tratamientos una consistencia estadística variable respecto al ajuste de los datos experimentales, evaluada mediante el coeficiente de correlación (R^2) con valores entre 0.76 a 0.93, observándose que la fase de adaptación de las células de *R. toruloides* al medio de cultivo y una alta dispersión de la cinética de crecimiento de la levadura, limitó el ajuste del modelo.

Cultivos de *Rhodospiridium toruloides* (CCT 0783 NCYC, de la colección de cultivos de la Fundación Andre Tozello, Campinas, SP, Brasil), se evaluaron en 18 tratamientos experimentales en un medio a base de melaza referida a azúcares reductores (ARM), glicerol (Gli) y sulfato de amonio (SA) en concentraciones de 0.0 a 66.49 g/L de ARM, 0.0 y 50.0 g/L de glicerol y 0.1 a 4.76 g/L de sulfato de amonio.

Se determinó el valor adecuado de biomasa seca de 4.483 g.m.s/L (ϕ_g) por MSR utilizando 33.24 g/L de ARM, 0.00 g/L de Gli y 0.1 g/L de SA. Estimados utilizando un modelo estadístico cuadrático con una consistencia estadística de $p < 0.05$.

No existió consistencia estadística para un modelamiento del contenido porcentual de lípidos, pero se obtuvo un valor máximo de 52.37% en el tratamiento T11 utilizando el medio de cultivo base de melaza de 33.24 g/L de ARM con 2.43 g/L de SA, con una relación C/N de 29.32 observando una tendencia a una disminución el contenido de lípidos en las células al sobrepasar una relación C/N de 49.74.

La melaza es un medio idóneo para la producción de lípidos en *R. toruloides* cuya producción puede mejorar investigando diversos oligoelementos.

Es conveniente controlar el pH en un rango de 5.6 a 5.8 en futuros cultivos y el nivel de oxígeno disuelto.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. y Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1219–1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>

AGRARIA.PE. (2018, 22 de febrero). *Palmicultores planean invertir US\$ 12 millones en plantas de aceite*. <https://agraria.pe/noticias/palmicultores-planean-invertir-us-12-millones-en-plantas-de--16025>

AGRARIA.PE. (2019, 22 de noviembre). *Junpalma Perú proyecta que PetroPerú adquirirá 40 mil toneladas de biodiésel de producción nacional el 2020*. <https://agraria.pe/noticias/junpalma-peru-proyecta-que-petroperu-adquirira-40-mil-tonela-20288>

AOAC INTERNATIONAL, (1982). Changes in Official Methods Of Analysis. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 65(2), 450–507. <https://doi.org/10.1093/jaoac/65.2.450>.

Baltazar, R., Carbajal, D., Baca, N. y Salvador, D. (2013). Optimization of the conditions of pectin extraction from lemon rind french (*Citrus medica*) using response surface methodology. *Agroindustrial Science*. <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.science.2013.02.01>

Bonturi, N., Crucello, A., Viana, A. J. C. y Miranda, E. A. (2017). Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by

a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, 57,16-25.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.007>

Bremner, J. (1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55(1), 11-33. <https://doi.org/10.1017/S0021859600021572>

Carota, E., Petruccioli, M., D'Annibale, A., Gallo, A. M. y Crognale, S. (2020). Orange peel waste-based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(10), 4617–4628.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10579-y>

Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A. y Larroche, C. (2012). Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Archives of Biology and Technology*, (55), 29-46. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100004>

Coradetti, S. T., Pinel, D., Geiselman, G. M., Ito, M., Mondo, S. J., Reilly, M. C., Cheng, Y. F., Bauer, S., Grigoriev, I. V., Gladden, J. M., Simmons, B. A., Brem, R. B., Arkin, A. P. y Skerker, J. M. (2018). Functional genomics of lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *eLife*, 7, e32110.
<https://doi.org/10.7554/eLife.32110>

Corpas-Rodríguez, N., Gálvez-Cantero, L., Morell-Nápoles, G., Córdova López, J. A., Ramos-Sánchez, L. B., & Julián-Ricardo, M. C. (2020, 5 mayo). Aspectos claves en

la producción de aceite microbiano.

https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/367905?fbclid=IwAR0lGSbmfSybUw_u6-_a66-5F1ALiitvPPM3rU6VB__MHkJpLCAJFDCzqBpg

Del Castillo Algarate, E. F. (2012). *Efecto de la temperatura sobre la capacidad fermentativa de Saccharomyces cerevisiae aislada de levadura residual de destilería*. [tesis de grado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional UNITRU. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/2083>

Durango, L. P. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. A nivel de laboratorio [Tesis de Grado, Universidad EAFIT]*. Repositorio Institucional Universidad EAFIT. <http://hdl.handle.net/10784/399>

Faife-Pérez, E., Otero-Rambla, M. A. y Alvarez-Delgado, A. (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. Parte I. Levaduras y bacterias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(1), 22-32. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2231/223123848004>

Fajardo, E. y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá]. Repositorio Institucional de la Universidad Javeriana <http://hdl.handle.net/10554/8279>

- Gao, R., Li, Z., Zhou, X., Cheng, S. y Zheng, L. (2017). Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. *Biotechnol Biofuels* 10, 247. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0942-6>
- Kim, Se-Kwon (2015). Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology || Marine Biomaterials as Antifouling Agent. , 10.1007/978-3-642-53971-8(Chapter 52), 1181–1192. doi:10.1007/978-3-642-53971-8_52
- Roux, I., Krieg, H. M., Yeates, C. A., & Breytenbach, J. C. (2005, 15 febrero). Use of chitosan as an antifouling agent in a membrane bioreactor. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0376738804006428?via%3Dihub>
- González-García, Y., Rábago-Panduro, L.M., French, T., Camacho-Córdova, D.I., Gutiérrez-González, P. y Córdova, J. (2017). High lipids accumulation in *Rhodospiridium toruloides* by applying single and multiple nutrients limitation in a simple chemically defined medium. *Annals of Microbiology*, 67, 519-527. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1282-2>
- Goodrum, J., Geller, D.P. y Adams, T.T. (2003). Rheological characterization of animal fats and their mixtures with #2 fuel oil. *Biomass & Bioenergy*, (24), 249-256. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00136-8)
- Gutiérrez, L. F., Sánchez, O. J. y Cardona, C. A. (2009). Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic

residues of oil palm industry. *Bioresource technology*, 100(3), 1227–1237.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.001>

Kraisintu, P., Yongmanitchai, W. y Limtong, S. (2010). Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal. Natural Sciences*, 44, 436-445.
<https://doi.org/10.1002/bit.25864>

Lang, X., Dalai, A. K., Bakhshi, N. N., Reaney, M. J. y Hertz, P. B. (2001). Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource technology*, 80(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00051-7)

Li, Y., Liu, B., Zhao, Z. y Bai, F. (2006). Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22, 650-656. [https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(06\)60050-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(06)60050-2)

Li, Y., Zhao, Z. y Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>

Ling, J., Nip, S. y Shim, H. (2013). Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource technology*, 146, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.023>

Mendez, C., Quiroz, J., Soriano, B., Rojas-Padilla, C., y Vasquez-Villalobos, V. (2021).
Lipid yields from oleaginous yeasts isolated from the north Peruvian Andes by

culture media non-limiting nitrogen. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(2), 607-615. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i2.2670>

Miñano, H. A. y Villalobos, V. V. (2012). Control difuso del oxígeno disuelto, pH y temperatura de un biorreactor columna de burbujas en la producción de biomasa de *Candida utilis*. *Scientia Agropecuaria*, 3(2), 139-148. doi:<http://dx.doi.org/10.17268/10.17268/sci.agropecu.2012.02.05>

REN21, (2016). “Renewables 2016 Global Status Report”. *Renewable Energy Policy Network for the 21st Century*, 1-272. https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/REN21_GSR2016_FullReport_en_11.pdf

REN21, (2019). “Renewables 2019 Global Status Report”. *Renewable Energy Policy Network for the 21st Century*, 1-336. https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2019_full_report_en.pdf

REN21, (2020). “Renewables 2020 Global Status Report”. *Renewable Energy Policy Network for the 21st Century*, 1-203. https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2020_full_report_en.pdf

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. y Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46, 210-218. Editorial. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.009>

- Tejada, C., Tejada, L., Villabona, Á. y Monroy, L. (2013). Obtencion de biodiesel a partir de diferentes tipos de grasa residual de origen animal. *Luna Azul*, (36) <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3217/321728584002>
- Tello Peramas, L. D. (1999). *Efecto de la aplicación directa e indirecta de azufre en los cultivos de cebolla y papa bajo condiciones de campo e invernadero*. [tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1775>
- Vicente, G., Martinez, M. y Aracil, J. (2004). Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource echnology*, 92, 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.08.014>
- Vieira, J. P., Ienczak, J. L., Rossell, C. E., Pradella, J. G. y Franco, T. T. (2014). Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology letters*, 36(12), 2433–2442. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1624-0>
- Walkley, A. y Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37(1), 29-38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Wang, Q., Guo, F. J., Rong, Y. J. y Chi, Z. M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. *Renewable Energy*, (46), 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.03.002>
- Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W. y Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*

and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.003>

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B. y Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* (vol. 110). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110(5):405 – 412. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700224>

Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y. y Zhao, Z. K. (2010). Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(6), 581–585. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0704-y>

Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H. y Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(5), 627–632. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0808-4>

Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H. y Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*, 3,1112. <https://doi.org/10.1038/ncomms2112>

ANEXOS

BIBLIOTECA DE AGROPECUARIAS

ANEXO 1. Composición fisicoquímica de la melaza

Parámetros	Valores determinados
Densidad	1.41 kg/L
°Brix	84
pH	5
Azucares reductores totales (ARM)	48.8 % ^(*)
C/N	51.88 ^(**)

^(*) El análisis de ARM, se realizó mediante el método Lane y Eyon (Del Castillo, 2012).

^(**) El Análisis C/N de melaza se obtuvo mediante la metodología Walkley y Black y método Kjeldahl respectivamente. (Walkley y Black, 1934; Bremner, 1960).

ANEXO 2. Determinación de azúcares reductores totales (Del Castillo, 2012)

Método

El presente Adaptación del método de Lane y Eyon

Procedimiento

- Pesar 10 g de melaza, y se aforar con agua destilada en una fiola de 200 mL.

- Pipetear 25 mL de esta solución a un matraz de 250 mL, luego se agregar 5 mL de HCl 6.34 mol/L. Introducir el matraz en baño de agua María a 60°C y agitar suavemente durante 4 minutos. Dejar reposar por 3 minutos.

Diluir la solución hasta aproximadamente 125 mL, agregar luego unas gotas de fenoltaleina al 1% w/v y neutralizar mediante NaOH mol/L, hasta lograr una coloración rojiza, esta coloración se elimina adicionando gotas de HCl 0.5 mol/L.

Agregar 4 mL de solución EDTA al 4%, enrazando con agua destilada. La solución posee 0.5 g de melaza por 100 mL. Pipetear 10 mL de Fehling A y 10 mL de Fehling B en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, colocando en el 20 mL de solución de melaza hidrolizada, luego se calentar hasta ebullición y se adicionar 4 gotas de azul de metileno. Titular hasta la ausencia de color azul y la aparición del color ladrillo. Obtener un punto final en aproximadamente 1 min, contando a partir del momento de la ebullición. Registrar el volumen gastado como T1. Realizar una segunda titulación pipeteando 10 mL de Fehling A y 10 mL de Fehling B en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Luego agregar el volumen de la solución de melaza hidrolizada obtenida de la primera titulación, realizando incrementos de 2 mL y aforar con agua hasta obtener un volumen de 73 mL. Después de 2 minutos de ebullición agregar 4 gotas de azul de metileno al 1% w/v y completar la titulación agregando la solución de melaza hidrolizada. Registrar el volumen gastado como T2.

La valoración final se realiza añadiendo sobre el matraz en ebullición, 10 mL de Fehling A y B, así como, el volumen de la solución de melaza obtenida de la segunda titulación, mediante incrementos de 0.5 mL y suficiente agua hasta obtener un volumen de 74.5 mL. Luego titular de la misma manera en que realizó la segunda titulación registrando el volumen gastado como T3.

Cálculos:

$$\% \text{Azúcares Reductores Totales} = 1000/C * T$$

Donde:

C=Concentración de la solución sometida a ensayo de melaza (g/100 mL)

T=T3= valoración (mL de solución de melaza utilizada)

Cuando:

C= 0.5 g/100 mL

$$\% \text{Azúcares Reductores Totales} = 200/T$$

ANEXO 3. Determinación del recuento de levadura (Del Castillo, 2012)

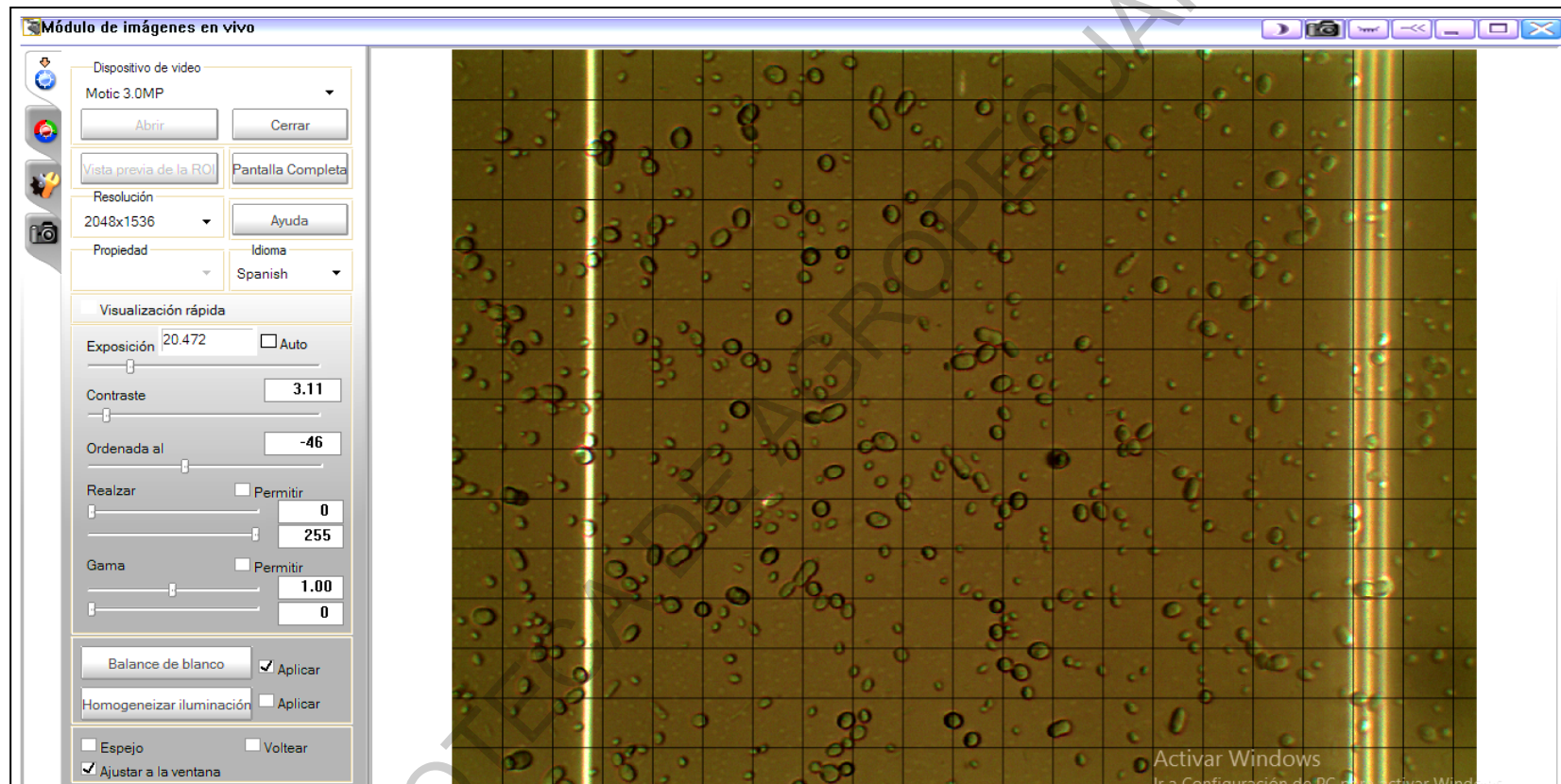
Método

Método del recuento directo al microscopio, mediante el uso de cámara de Neubauer.

Procedimiento

1. Limpiar cuidadosamente la cámara de Neubauer. La cámara y el cubre objeto se deben lavar con agua destilada y con una solución de alcohol. Luego se deben secar con un pedazo de gasa.
2. Colocar el cubreobjeto sobre la cámara de conteaje.
3. Agitar la muestra hasta obtener una solución homogénea. Preparar la dilución a utilizarse (1 mL de muestra y 9 mL de solución salina fisiológica estéril).
4. Agitar bien la disolución preparada y llenar la pipeta Pasteur.
5. Llevar cuidadosamente la parte inferior de la pipeta junto a la unión del cubreobjeto y la cámara de conteaje donde se coloca una gota pequeña de la solución la que debe bajar lentamente dentro de las cámaras de conteaje, hasta que ésta por capilaridad esté totalmente llena. Evitar la formación de burbujas o que el flujo del líquido quede fuera de la cámara, ya que esto podría ocasionar errores.
6. Dejar la cámara en reposo durante 1 minuto, para que haya una distribución uniforme de células dentro de la cámara.
7. Colocar la cámara de Neubauer debajo del microscopio Motic BA130 y observar con el lente de menor aumento 10x la distribución de las células, buscando obtener uniformidad para la lectura.
8. Enfocar la cuadrícula de glóbulos blancos y con el objetivo de 40x, proceder a realizar el conteo celular en los cuatro cuadrados grandes angulares. El recuento celular incluye las células que cubren o tocan por dentro o por fuera las líneas limitantes superior e izquierda en el cuadrado grande de recuento y no se consideran las correspondientes a los límites inferior y derecho.

ANEXO 4. Conteo mediante Microscopio Motic



ANEXO 5. Análisis C/N de melaza mediante la metodología Walkley y Black y método KJELDAHL respectivamente (Walkley y Black, 1934, Bremner,1960).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS AGUAS Y FOLIARI



INFORME DE ENSAYO

1908015

Cliente	Kevin Steve Díaz Gutiérrez	Fecha de Muestreo	15/08/2019
Dirección	Laredo	Fecha de Ingreso	15/08/2019
Procedencia muestra	La Libertad - Laredo - Agroindustrial Laredo	Fecha de Informe	05/09/2019
Matriz	Melaza		

ID		Relación C/N
Lab	Campo	
1908015.0	Melaza	51.88

ANEXO 6. Cálculo de C/N representativo en cada tratamiento

T	MELAZA (g)	GLICEROL (g)	SULFATO (g)	%C (MELAZA)	% N (MELAZA)	%C GLICEROL	%N SULFATO	C/N
T1	27.62	10.13	1.04	12.36	0.21	3.96	0.22	37.68
T2	27.62	10.13	3.82	12.36	0.21	3.96	0.81	15.96
T3	27.62	39.87	1.04	12.36	0.21	15.60	0.22	64.54
T4	27.62	39.87	3.82	12.36	0.21	15.60	0.81	27.34
T5	108.63	10.13	1.04	48.60	0.84	3.96	0.22	49.74
T6	108.63	10.13	3.82	48.60	0.84	3.96	0.81	31.93
T7	108.63	39.87	1.04	48.60	0.84	15.60	0.22	60.75
T8	108.63	39.87	3.82	48.60	0.84	15.60	0.81	39.00
T9	0.00	25.00	2.43	0.00	0.00	9.78	0.52	18.99
T10	136.25	25.00	2.43	60.96	1.05	9.78	0.52	45.23
T11	68.11	0.00	2.43	30.48	0.52	0.00	0.52	29.32
T12	68.11	50.00	2.43	30.48	0.52	19.56	0.52	48.13
T13	68.11	25.00	0.10	30.48	0.52	9.78	0.02	73.78
T14	68.11	25.00	4.76	30.48	0.52	9.78	1.01	26.25
T15	68.11	25.00	2.43	30.48	0.52	9.78	0.52	38.72
T16	68.11	25.00	2.43	30.48	0.52	9.78	0.52	38.72
T17	68.11	25.00	2.43	30.48	0.52	9.78	0.52	38.72
T18	68.11	25.00	2.43	30.48	0.52	9.78	0.52	38.72

En cada uno de los tratamientos se realizó un cálculo global respecto al contenido de C y N (Mendez *et. al.*, 2021), siguiendo la siguiente ecuación:

$$C/N = (\text{melaza (g/L)} * 44.7447 / 100 + \text{glicerol (g/L)} * 36.0321 / 92.0938) / (\text{sulfato de amonio (g/L)} * 28.0134 / 132.14 + \text{melaza (g/L)} * 0.77/100)$$

ANEXO 7. Agitador orbital BioMarker BS-E24-1004





FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
DECLARACIÓN JURADA

Los AUTORES suscritos en el presente documento DECLARAMOS BAJO JURAMENTO que somos los responsables legales de la calidad y originalidad del contenido del Proyecto de Investigación Científica, así como, del Informe de la Investigación Científica realizado.

TÍTULO:

NOMBRE DE LA TESIS
EFFECTO DE LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR, GLICEROL Y SULFATO DE AMONIO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONTENIDO DE LÍPIDOS Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Rhodosporidium toruloides*

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

INFORME FINAL DE INVESTIGACION CIENTIFICA

PROY. DE TRABAJO DE INVESTIGACION (PREGRADO)

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)

PROYECTO DE TESIS PREGRADO

TESIS PREGRADO

PROYECTO DE TESIS MAESTRIA

TESIS MAESTRIA

PROYECTO DE TESIS DOCTORADO

TESIS DOCTORADO

Equipo Investigador Integrado por:

Nº	Apellidos y Nombres	Facultad	Departamento Académico	Categoría Docente Asesor	Código Docente Asesor Número Matrícula del Estudiante	Autor Coautor asesor
01	Díaz Gutiérrez Kevin Steve	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	---	1512400911	Autor
02	Julca González Manuel Alejandro	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	---	1512400411	Autor
03	Vásquez Villalobos Victor Javier	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	Asesor	4680	Asesor

Trujillo, 13 de setiembre de 2021

70543053

.....
Díaz Gutiérrez Kevin Steve

.....
DNI DEL TESISISTA

71405430

.....
Julca González Manuel Alejandro

.....
DNI DEL TESISISTA

17863291

.....
Vásquez Villalobos Victor Javier

.....
DNI DEL ASESOR

.....
FIRMA

.....
DNI

Este formato debe ser llenado, firmado, adjuntado al final del documento del PIC, del Informe de Tesis, Trabajo de Investigación respectivamente.

Av. Juan Pablo II S/N – Trujillo – Perú.

e-mail: agroindustrial@unitru.edu.pe
www.unitru.edu.pe



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACION EN REPOSITORIO DIGITAL RENATI-SUNEDU

Trujillo, 13 de setiembre de 2021

Los autores suscritos del INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA

Titulado:

EFFECTO DE LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR, GLICEROL Y SULFATO DE AMONIO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONTENIDO DE LÍPIDOS Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Rhodospiridium toruloides*

AUTORIZAMOS SU PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL, REPOSITORIO RENATI-SUNEDU, ALICIA-CONCYTEC, CON EL SIGUIENTE TIPO DE ACCESO:

- A. Acceso Abierto: (datos del autor y resumen del trabajo)
 B. Acceso Restringido
 C. No autorizo su Publicación

Si eligió la opción restringido o NO autoriza su publicación sírvase justificar

- ESTUDIANTES DE PREGRADO: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TESIS
 ESTUDIANTES DE POSTGRADO: TESIS MAESTRIA TESIS DOCTORADO
 DOCENTES: INFORME DE INVESTIGACION OTROS

El equipo investigador Integrado por:

Nº	Apellidos y Nombres	Facultad	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, EMÉRITO, estudiante, OTROS)	Código Docente Número Matrícula del Estudiante	Autor Coautor asesor
01	Díaz Gutiérrez Kevin Steve	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	1512400911	Autor
02	Julca González Manuel Alejandro	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	1512400411	Autor
03	Vásquez Villalobos Víctor Javier	Ciencias Agropecuarias	Ciencias Agroindustriales	4680	Asesor

Díaz Gutiérrez Kevin Steve

70543053
DNI DEL TESISISTA

Julca González Manuel Alejandro

71405430
DNI DEL TESISISTA

Vásquez Villalobos Víctor Javier

17863291
DNI DEL ASESOR

Este formato debe ser llenado, firmado y adjuntado en el Informe de Tesis y/o Trabajo de Investigación respectivamente. Este formato en el caso de Informe de investigación científica docente debe ser llenado, firmado, escaneado y adjuntado en el sistema de www.picfedu.unitru.edu.pe

Av. Juan Pablo II S/N – Trujillo – Perú.

e-mail: agroindustrial@unitru.edu.pe
www.unitru.edu.pe