



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS

**EFFECTO DEL FLUJO DE AEREACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
BIOSURFACTANTE A NIVEL REACTOR UTILIZANDO UN
MICROORGANISMO AEROBIO**

QUE PRESENTA:

ALFREDO CARRASCO MONTES DE OCA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PATRICIA OLGUÍN LORA

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA





FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



DEDICATORIAS

Este trabajo está destinado a mi madre ya que con su inmensa ayuda y su infinito amor estuvo pendiente en cada paso de mi vida.

A mi padre por dejarme concluir mis estudios.

A mi hermano al animarme en la realización de este trabajo, por su insistencia en terminarlo.

A mi esposa Fabiola por estar ahí, siempre conmigo, por esos momentos que hemos pasado juntos, las lecciones de vida que hemos aprendido y por la familia que hemos formado al lado de nuestro hijo Benjamín.

Alfredo Carrasco Montes de Oca



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme a llegar a esta etapa de mi vida y por guiarme en mi camino.

A mi directora de tesis la Dra. Patricia Olguín Lora por brindarme su apoyo confianza paciencia, tiempo y dedicación en la dirección de esta investigación.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por darme una oportunidad para realizar mi tesis en sus instalaciones.

A mis sinodales por entregarme sus valiosas horas de su tiempo, y sus conocimientos para así poder concluir este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a sus catedráticos por compartir sus conocimientos conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser un integrante más de esta gran familia.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Este trabajo fue realizado dentro de las actividades del proyecto D.60012 “Estudio de biomoléculas modificadoras de las propiedades reológicas en aceites crudos pesados; su producción y caracterización”, adscrito a la gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional, en las Instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la dirección de la Dra. Patricia Olguín Lora.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
1.-RESÚMEN	1
2.-INTRODUCCIÓN	3
2.1.-Surfactantes o tensoactivos.....	4
2.2.- Surfactantes Químicos	4
2.3.- Biosurfactantes o Agentes Biológicos.....	5
2.3.1.-Producción de biosurfactantes por microorganismos.....	5
2.3.2.- Clasificación de los Biosurfactantes	7
2.3.3.- Ventajas de los de Biosurfactantes sobre los surfactantes químicos	7
2.3.4.-Aplicación de los biosurfactantes.....	8
2.4.-Factores que afectan la producción de los biosurfactantes	10
2.4.1.-Fuente de Carbono.....	10
2.4.2.-Fuente de Nitrógeno.....	10
2.4.3.-Fuente de Oxígeno.....	11
2.4.4.-Fuentes de macro y micronutrientes.....	11
2.6.- Parámetros para establecer la efectividad de un Biosurfactante	12
2.7.-Tensión superficial	13
2.8.-Tensión interfacial	13
2.9.- Concentración micelar crítica (CMC)	13
2.10.-Reactores biológicos (Bioreactores)	14
3.-ANTECEDENTES	15
4.-JUSTIFICACIÓN	18
5.-OBJETIVOS	19



5.1.-Objetivo general	19
5.1.1.-Objetivos particulares	19
5.2.-Hipótesis	19
6.-METODOLOGÍA.....	20
6.1.-Materiales y métodos	20
6.2.-Microorganismo.....	22
6.3.-Medio de cultivo	22
6.3.1.-Preparación del medio de cultivo.....	23
6.3.2.-Preparación de solución de elementos traza	23
6.4.-Reactivación de la cepa IMP-BL.....	24
6.5.-Conservación de la cepa IMP-BL	25
6.6.-Evaluación microscópica y macroscópica de la cepa IMP-BL.....	27
6.7.-Cinética de crecimiento y producción de Biosurfactante a nivel matraz.....	27
6.8.-Producción de biosurfactante a nivel reactor	28
6.9.-Esterilización del reactor	29
6.9.1.-Inoculación del reactor para la producción del biosurfactante.....	29
6.9.2.-Muestreo en reactor	29
6.10.-Extracción y determinación de la producción de biosurfactante en reactor por medio de liofilización	30
6.11.-Técnicas analíticas.....	31
6.11.1.-Observación macroscópica	31
6.11.2.-Observación microscópica.....	31
6.12.-Preparación de las muestras para determinación de proteínas	31
6.12.1.-Cuantificación de proteínas	32
6.12.2.-Curva patrón de proteínas.....	33
6.13.- Preparación de las muestras para determinación de azúcares.....	33
6.13.1 Azúcares totales	34
6.13.2.-Curva patrón de azúcares totales	34
6.14.-Tensión superficial	34
6.15.- Tensión interfacial	35



6.16.-Efecto del biosurfactante sobre aceites modelo, medido como tensión interfacial (TIF)	36
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1.-Caracterización macroscópica de la cepa IMP-BL.....	38
7.1.2.- Caracterización microscópica de la cepa IMP-BL.....	39
7.1.3.- Tinción de Gram.....	40
7.4.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz	41
7.4.1.-Concentración micelar crítica (CMC) del producto obtenido a nivel matraz.	46
7.5.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante a nivel reactor.	48
7.5.1.- Concentración micelar crítica (CMC) del producto obtenido a nivel reactor con la mejor aereación	60
7.6.- Rendimientos	62
7.8.-Comportamiento del reactor con los mejores parámetros.....	63
7.9.-Efecto del Biosurfactante sobre aceites modelo, medido como tensión interfacial.....	64
8. CONCLUSIONES.....	66
9.-BIBLIOGRAFIA	67
10.-HEMEROGRAFIA	71
11.-ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Representación esquemática de las partes que constituyen a un surfactante.	4
Figura 2.-Biosurfactante producido a nivel matraz.....	5
Figura 3.-Estrategia experimental.....	21
Figura 4.-Conservación de la cepa IMP-BL en tubos inclinados.....	26
Figura 5.-Siembra en estría simple tipo cuadrante.....	26
Figura 6.-Cinética de crecimiento de la cepa IMP-BL en matraz.....	28
Figura 7.-Reactor applikon de 3L para el cultivo de la cepa IMP-BL.....	28
Figura 8.-Liofilizadora para la extracción de biosurfactante.....	30
Figura 9.-Muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo para la cuantificación de proteínas.....	32
Figura 10.-Muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo para la cuantificación de azúcares.....	33
Figura 11.-Tensiómetro Marca Kruss.....	35
Figura 12.-Medición de tensión superficial.....	36
Figura 13.-Colonias de la cepa IMP-BL crecidas en placa.....	38
Figura 14.-Observación microscópica de la cepa IMP-BL.....	39
Figura 15.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante en matraz, de la cepa IMP-BL.....	42
Figura 16.-Producción de biosurfactante (tensión superficial) y crecimiento microbiano (densidad óptica) por la cepa IMP-BL a nivel matraz.....	43
Figura 17.-Cinética de consumo de azucares totales por la cepa IMP-BL a nivel matraz.....	45
Figura 18.-Concentración micelar crítica del biosurfactante obtenido a nivel matraz por la cepa IMP-BL.....	47



Figura 19.- Comportamiento de la producción de biosurfactante y crecimiento microbiano en cinéticas a nivel reactor por la cepa IMP-BL.....	54
Figura 20.-Comportamiento de tensión superficial y densidad óptica a nivel reactor por la cepa IMP-BL.....	55
Figura 21.-Consumo de sustrato en cinéticas a nivel reactor con la cepa IMP-BL.....	56
Figura 22.-Biosurfactante crudo liofilizado a nivel reactor	60
Figura 23.-Concentración micelar crítica obtenida en reactor con flujo de aireación de 0.47 vvm.....	61
Figura 24.-Rendimientos de cinéticas que presentaron disminución de tensión superficial en reactor y matraz.....	63
Figura 25.-Parámetros cinéticos del reactor con mejor rendimiento	64
Figura 26.--Efecto del biosurfactante en aceites modelo medido como disminución de tensión interfacial a nivel matraz y reactor.....	65
Figura 27.-Curva patrón de azúcares	72
Figura 28.-Curva patrón de proteínas.....	72



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1.-Algunas clases de biosurfactantes producidos por microorganismos.	6
Tabla. 2.-Aplicación de biosurfactantes en la industria petrolera	9
Tabla. 3.-Aplicaciones de los biosurfactantes en diferentes industrias.	9
Tabla. 4.-Resultados en matraz y reactor a diferentes condiciones de cultivo para microorganismos Bacillus licheniformis y Bacillus subtilis (Continua)	16
Tabla. 5.- Resultados en matraz y reactor a diferentes condiciones de cultivo para microorganismos y Bacillus subtilis	17
Tabla. 6.-Composición del medio de cultivo para la producción de biosurfactante por la cepa IMP-BL.	22
Tabla. 7.-Solución de elementos traza.	24
Tabla. 8.-Morfología colonial de la cepa IMP-BL	39
Tabla. 9.-Microorganismos productores de biosurfactantes.	46
Tabla. 10.-CMC de diferentes microorganismos.	48
Tabla. 11.-Resumen de velocidad de consumo de sustrato.	57
Tabla. 12.-Resumen de parámetros de cada una de las cinéticas.	59

1.-RESÚMEN

Los biosurfactantes son compuestos biológicos anfifílicos (de comportamiento químico dual, solubles en agua y en grasas), producidos por microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos.

Estos compuestos tienen un gran potencial de aplicación como, emulsificantes dispersantes, agentes humectantes y de recubrimiento. Esto ha beneficiado a diferentes industrias, entre ellas: la farmacéutica, cosmética, alimentaria y la del petróleo.

El principal objetivo de este trabajo fue la producción de biosurfactante a nivel matraz y su escalamiento a nivel reactor, utilizando diferentes flujos de aereación en un reactor de 3L a temperatura de 40 °C y una agitación de 150 rpm.

Se utilizó la cepa **IMP-BL**, (la cual se le da este nombre debido a que está bajo restricción del IMP) que es una bacteria aerobia, que crece a una temperatura de 40 °C, en un medio mineral utilizando como fuente de carbono glucosa (dextrosa). Se determinó el crecimiento microbiano medido indirectamente por la producción de proteínas y densidad óptica y la producción del biosurfactante por medio de la disminución de tensión superficial. Además se evaluó el consumo de sustrato por medio de azúcares reductores totales.

Se produjo el biosurfactante a nivel matraz, utilizando el mejor parámetro optimizado en trabajos previos, posteriormente se escaló la producción de biosurfactante en un reactor de 3L, donde se evaluó el efecto de la aereación a diferentes flujos (0,500, 600, 750, 850 ml / min). En todos los flujos de aereación se determinó proteínas, tensión superficial y azúcares reductores totales.

Se observó que a nivel matraz la tensión superficial disminuyó de 71 mN/m a 26 mN/m a las 14 h la concentración máxima de proteína (crecimiento microbiano) fue de 109 mg/L y el consumo de sustrato (glucosa) fue de 7g/L (26 horas), por lo que se considera que la cepa IMP-BL es una buena productora de biosurfactante.



En la producción de biosurfactante en reactor de 3L a diferentes flujos de aereación, se obtuvo que el mejor rendimiento de biosurfactante fue con la aereación de 750 mL/min. En esta aereación la tensión superficial disminuyó de 72 a 28 mN/m en 6 h, el máximo valor de proteína fue de 122 mg/L a las 15 h y el consumo de azúcares fue de 5.53 g/L.

Se evaluó el rendimiento del biosurfactante obtenido a nivel reactor con los diferentes flujos de aereación. Con el biosurfactante obtenido en reactor a 750 mL/min se le determinó la concentración micelar crítica (CMC), fue de 870 mg/L.

También se evaluó el efecto del biosurfactante producido en reactor a 750 mL/min sobre la disminución de la tensión interfacial y se comparó con el biosurfactante producido a nivel matraz. Los aceites modelo fueron: hexano, hexadecano, diésel, queroseno y heptanos. Se observó que la mayor disminución de la tensión interfacial con el biosurfactante producido a nivel matraz fue con el hexadecano con un valor de 1 mN/m y con el biosurfactante producido a nivel reactor y el heptano con un valor de 3 mN/m.

Con los resultados obtenidos se puede decir que la cepa IMP-BL es una buena productora de biosurfactante, el cual disminuye tanto tensión superficial como interfacial por lo que se puede utilizar en diferentes procesos de la industria y en particular de la industria petrolera.



2.-INTRODUCCIÓN

Los surfactantes son productos químicos industriales. Constituyen un componente importante en la vida cotidiana, algunos de estos, provienen de productos petroquímicos u oleoquímicos. (*Banat y Col., 2012*)

El uso mundial de surfactantes ha crecido enormemente en las últimas décadas, aunque las cifras exactas son difíciles de determinar en el mercado. Sin embargo, existen estimaciones como una producción de 9 millones de toneladas en 1995 a 13 millones de toneladas en 2008. (*Banat y Col., 2010*) Aplicados en diferentes industrias como la química, textil, alimentaria, cosmética y la petrolera, así como en el cuidado personal, la salud y la agricultura.

La gran mayoría de los surfactantes son a menudo tóxicos para el medio ambiente y su uso puede conducir a problemas ecológicos significativos, ya que estos surfactantes terminan en el ambiente después de su uso.

Debido a la necesidad de proteger los ecosistemas, existe un gran interés por los surfactantes o biosurfactantes de origen microbiano como posibles alternativas a los producidos químicamente. (*Benincasa. 2002*)

2.1.-Surfactantes o tensoactivos

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que tienen extremos tanto hidrofílicos (polar), como hidrofóbicos (apolar), presentan una gran diversidad en estructuras químicas. Son moléculas que se acumulan en las interfases gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite -agua) o líquido sólido (agua /superficie de sólidos), provocando un descenso en la tensión superficial e interfacial del medio. (Van Hamme y Col. 2006)

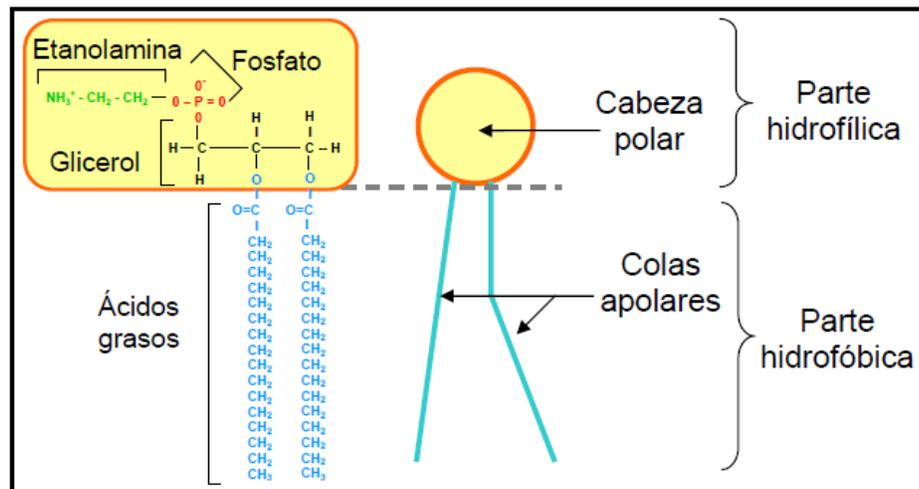


Figura 1.-Representación esquemática de las partes que constituyen a un surfactante donde se muestra la cabeza polar y las colas hidrofóbicas, estructura correspondiente al compuesto fosfolipídico

2.2.- Surfactantes Químicos

Son derivados del petróleo o sintetizados químicamente, son en general tóxicos al medio ambiente y no son biodegradables. Son compuestos anfifílicos, que pueden reducir la tensión superficial e interfacial de un líquido. (Mulligan y col., 1984)

2.3.- Biosurfactantes o Agentes Biológicos

Los biosurfactantes o agentes biológicos son producidos por bacterias, hongos o levaduras durante su crecimiento en una gran variedad de sustratos, que generan productos con características bioquímicas y estructurales diversas.

Dicho compuesto puede permanecer adherido a la superficie celular del microorganismo, o bien, ser expulsado al medio de cultivo. Los biosurfactantes se clasifican de acuerdo a su naturaleza química, peso molecular, carga iónica, entre otros (Shavandi, 1997).



Figura 2.-Biosurfactante producido a nivel matraz

2.3.1.-Producción de biosurfactantes por microorganismos

Los biosurfactantes son producidos por una gran variedad de microorganismos que emplean diferentes fuentes de carbono y condiciones de cultivo. Algunos de los microorganismos que han sido estudiados y se encuentran reportados como productores de biosurfactantes son: *Bacillus subtilis*, (Amani y Col 2010) *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (Anyanwn y Col, 2011), *Pseudomonas aphidis* (Rau y Col., 2005), *Cándida antártica* (adamaczack y Col, 2010).

La tabla 1 Muestra diferentes clases de biosurfactantes producidos por microorganismos.



Tabla. 1.-Algunas clases de Biosurfactantes producidos por microorganismos..

Tipo	Surfactante	Microorganismos
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i>
	Trehalosa	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> spp <i>Nocardia</i> sp
	Lípidos de manosil-eritritol	<i>Candida antártica</i>
	Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i> <i>Candida apícola</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida bogoriensis</i>
Lipopéptidos	Surfactina Viscosina Serrawetina Lichenisina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
fosfolípidos	Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp
Ácidos grasos	Ácidos grasos/Lípidos naturales	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Capnocytophaga</i> sp

FUENTE: *Modificado de Bodour y Maier, 2003; Mulligan, 2005; Nitschke y Costa, 2007*



2.3.2.- Clasificación de los Biosurfactantes

Los biosurfactantes se clasifican de acuerdo a su naturaleza química y su peso molecular. Tienen una parte hidrofílica como aminoácidos, péptidos aniónicos catiónicos, y polisacáridos; otra parte hidrofóbica, como: ácidos grasos, saturados e insaturados (*Salager, 1992*).

2.3.3.- Ventajas de los de Biosurfactantes sobre los surfactantes químicos

Los biosurfactantes presentan varias ventajas respecto a los surfactantes químicos entre ellas:

- **Biodegradabilidad:** Los biosurfactantes son más fáciles de biodegradar.
- **Toxicidad:** La toxicidad de los biosurfactantes es baja o nula.
- **Biocompatibilidad:** No son tóxicos para los organismos incluidos el ser humano, por lo que son biocompatibles en cosméticos y fármacos o como aditivos de alimentos.
- **Producción a partir de fuentes baratas:** Para su producción se utilizan fuentes de carbono en los cultivos microbianos, relativamente económicas como residuos de otras industrias.
- **Especificidad:** Son específicos en su actividad, por ejemplo en la eliminación de contaminantes específicos, en emulsiones industriales, aplicaciones en cosméticos específicos farmacéuticos y alimentos.
- **Control ambiental:** Los biosurfactantes pueden ser usados eficientemente en control de derrames de petróleo, biodegradación de efluentes industriales y en bioremediación de suelos contaminados.



2.3.4.-Aplicación de los biosurfactantes

Las aplicaciones potenciales de los biosurfactantes incluyen la emulsificación, la separación de fases, la humectación, la formación de espumas la actividad superficial las cuales pueden ser utilizadas en la industria alimentaria, petroquímica, cosmética y farmacéutica. (*Banat y Col 2000*)

En el sector ambiental los biosurfactantes se aplican en la biorremediación y en el tratamiento de aguas residuales para remover compuestos tóxicos y peligrosos. (*Mulligan Catherine, 1984*)

En la dispersión de derrames petroleros tanto a nivel del suelo como en agua, en la remoción y movilización el petróleo pegado en el interior de los tanques y también en la recuperación mejorada del petróleo(*Guha y Col, 1996*). La Tabla 2 muestra algunas aplicaciones de biosurfactantes en la industria petrolera y la Tabla 3 muestra la utilización de biosurfactantes en otras industrias.



Tabla. 2.-Aplicación de biosurfactantes en la industria petrolera

Industria	Aplicación	Actividad de los biosurfactantes
Extracción de aceite	Cambio de permeabilidad de la roca de yacimiento	Humectantes y de recubrimiento
	Reducción de la viscosidad del aceite	Emulsionantes
	Perforación en la dispersión de lodo	Dispersante
	Control en el depósito de parafina/asfaltenos	Solubilizante
	Desplazamiento del aceite	Reductores de la tensión interfacial
Transporte de aceite	Reducción de la viscosidad del petróleo	Emulsionantes
	Estabilización de la emulsión aceite	De recubrimiento
	Control en el depósito de parafina/asfaltenos	Solubilizante
	De-emulsificación de emulsiones de aceite	Desemulsificante
Limpieza de tanques/ contenedores de aceite	Emulsificación de lodos aceitosos	Emulsificantes
	Dispersión de hidrocarburos	Dispersantes

Tabla. 3.-Aplicaciones de los biosurfactantes en diferentes industrias

Industria	Función del Biosurfactante	Actividad en agentes
Minera	Agentes secuestrantes, espumantes y flotantes de metales	Secuestrantes
Ambiental	Bioremediación, tratamiento de lodos de agua residuales en remanentes aceitosos	Dispersantes
Alimenticia	Emulsionante, solubilizante, espesante	Lubricantes
Farmacéutica	Antibacteriales, antifúngicos, antivirales, adhesivos, vacunas	Antivirales
Agrícola	Biocontrol de parásitos y plagas	De Biocontrol
Cosmética	Productos de salud, belleza.	Antimicrobianos



2.4.-Factores que afectan la producción de los biosurfactantes

El tipo, calidad y cantidad de biosurfactante producidos son determinados por la naturaleza de la fuente de carbono, la concentración de la fuente de Nitrógeno, Fósforo, Magnesio, Hierro, y Manganeso en el medio y las condiciones de cultivo, tales como pH, temperatura agitación y aereación.

(Guerra Santos y Col, 1986)

Actualmente los esfuerzos para producir biosurfactantes se basan en métodos de optimización convencional donde se varía un solo parámetro en cualquier momento y los demás se mantienen constantes; por lo que es necesario realizar estudios al respecto.

2.4.1.-Fuente de Carbono

La fuente de carbono influye en las rutas de síntesis de los biosurfactantes. Se utilizan fuentes de Carbono solubles en agua, como glucosa, glicerol, manitol, etanol, fructosa, galactosa: (pentosas xilosa, arabinosa), ribosas: (disacáridos sacarosa, lactosa, maltosa, etc.), polisacáridos (almidones, celulosas hemicelulosas), aceite de soya, melaza (de caña de azúcar o remolacha) *(Nitschke y Col., 2005)*.

La fuente de carbono utilizada para la producción de biosurfactante puede afectar en la estructura del compuesto producido *(Habba E. y Col., 2000)*.

2.4.2.-Fuente de Nitrógeno

La fuente de nitrógeno es esencial para el crecimiento de microorganismos, se utiliza principalmente para la síntesis de proteínas y enzimas. Varias fuentes de nitrógeno, como urea, peptona, sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sodio, extracto de carne y extracto de malta se han utilizado para la producción de biosurfactantes. Diversos estudios al respecto han demostrado ejemplos en los que la naturaleza de la fuente de nitrógeno ejerce un papel definitivo sobre la producción de biosurfactantes en el medio *(Sanpietro Robert y Col., 1991)*.



2.4.3.-Fuente de Oxígeno

Este nutriente es muy importante para la producción de biosurfactantes en bioreactor utilizando microorganismos aerobios. La fuente común de oxígeno en una fermentación es el aire, que por lo general se burbujea en el medio de cultivo desde el fondo del bioreactor.

La transferencia de oxígeno desde las burbujas del aire hasta el microorganismo, es una de las principales limitantes de la productividad en una fermentación, por lo que el bioreactor debe ser diseñado para satisfacer la máxima demanda de oxígeno. La transferencia de oxígeno usualmente se facilita por la agitación, que se requiere también para mezclar los nutrientes y mantener la fermentación homogénea (*Biotecnología* 2012).

2.4.4.-Fuentes de macro y micronutrientes

Todo tipo de microorganismos y bacterias necesitan captar una serie de elementos químicos que se pueden clasificar (según las cantidades requeridas) en macronutrientes como Carbono(C), Hidrógeno (H), Oxígeno(O), Fósforo (P), Azufre(S), Potasio(P) y Magnesio(Mg) y micronutrientes como Hierro(Fe), Zinc(Zn), Manganeseo(Mn), Cobre(Co), (*Makkar, 2002*).

En la naturaleza estos elementos se encuentran combinados, formando partes de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Algunos de los nutrientes serán incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares. Otros solo servirán para la producción de energía y no se incorporan directamente como material celular. Finalmente otros pueden ejercer ambos papeles (Matin, 1978). De esta manera, la naturaleza física del medio afecta la producción de biosurfactante en diferentes maneras.

La elección de materiales económicos es importante para mantener la rentabilidad del proceso, ya que es capaz de reducir hasta en un 50 % el costo de la producción final del producto (*Bagheri y Col ., 2009*).



2.5.-Factores ambientales

La producción de biosurfactantes, puede verse afectada por varios factores como: temperatura, pH, salinidad, agitación, oxígeno disuelto que incrementan o inhiben la producción de biosurfactante (*Bagheri y Col ., 2009*).

- **Temperatura:** Diferentes microorganismos tienen su actividad óptima a diferentes temperaturas, por ejemplo (*Robert y Col, 1989*); encontraron que la temperatura óptima para la producción de Biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa 44T*, es de 37°C. Para *Bacillus subtilis* es de 30 a 45°C.
- **pH:** La influencia del pH en la producción de biosurfactante, varía dependiendo del microorganismo utilizado y del medio de cultivo. Dado que la acidez o alcalinidad favorecen la eficiencia de la producción. (*Zinjarde y Col, 2002*), estudiaron la influencia del pH inicial en la producción de un biosurfactante por *Yarrowia lipolytica*. La mejor producción de biosurfactante se produce cuando el pH era de 8, que es el pH natural del agua de mar.
- **Aereación agitación:** El aire se suministra como fuente de oxígeno, por lo general se burbujea en el medio desde el fondo del bioreactor, al tener una aireación o agitación demasiado alta puede ocasionar la formación de espuma provocando que la producción de biosurfactante disminuya o aumente (*Guilmanov Vladimir., 2009*).

2.6.- Parámetros para establecer la efectividad de un Biosurfactante

La efectividad de un biosurfactante se puede establecer en base a distintos parámetros, todos ellos relacionados con su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos, disminuir la tensión superficial (TS) y/o tensión interfacial (TI) y la concentración micelar crítica (CMC).



2.7.-Tensión superficial

La tensión superficial de un líquido es la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área y está dado por las fuerzas cohesivas de las moléculas de este líquido. Las unidades con las que se mide la tensión superficial son mN/m , lo que quiere decir que es la fuerza (en mN) necesaria para romper 1 m. de película del líquido (*Desai, 1997*).

Depende principalmente de la naturaleza del líquido y de la temperatura puede verse afectada por la presencia de compuestos anfipáticos en solución. Los biosurfactantes tienen la capacidad de absorberse en las interfases (líquido-aire, líquido-líquido y sólido-líquido) dando lugar a la formación de monocapas y con ello la disminución de la tensión superficial de las disoluciones que los contienen.

2.8.-Tensión interfacial

Es una propiedad de la interfaz entre dos fases inmiscibles. Cuando ambas fases son líquidas se denomina tensión interfacial. Cuando una de las fases es el aire se denomina tensión superficial. La tensión interfacial se produce porque una molécula cerca de la interfaz tiene interacciones moleculares diferentes de una partícula equivalente dentro del fluido estándar. Las partículas tensoactivas se sitúan preferentemente en la interfaz y por lo tanto disminuyen la tensión interfacial y se reporta en mN/m .

2.9.- Concentración micelar crítica (CMC)

La CMC se refiere a la concentración de biosurfactante a la que se alcanza la mínima tensión superficial establecida. La CMC indica la concentración a la que se forman unos agregados moleculares organizados llamados micelas (*Yushuo., 2008⁴³*). Cuanto menor sea la CMC, más eficiente es el surfactante en cuestión (*López Laura., 2009*).



2.10.-Reactores biológicos (Bioreactores)

Un bioreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso biológico que involucra microorganismos o sustancias bioquímicamente activas producto de dichos bacilos. Los microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios. Los bioreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros, hasta metros cúbicos, fabricados en acero inoxidable o vidrio.

Un bioreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) para el microorganismo que se cultiva. En función de la alimentación, el bioreactor puede ser operado en lote (batch), en continuo o en lote alimentado (fed – batch) o semicontinuo.



3.-ANTECEDENTES

En los últimos años se han desarrollado diversos estudios y análisis para el mejoramiento de la síntesis de biosurfactantes, estos son empleados en diferentes industrias, como la petrolera.

Los biosurfactantes son un grupo de moléculas identificadas por sus capacidades únicas para interactuar con hidrocarburos. La emulsificación, dispersión, la formación de espuma, la mojabilidad y el recubrimiento son algunas de las numerosas actividades que los biosurfactantes pueden tener.

Los estudios han demostrado que para la optimización del proceso de producción de biosurfactantes, ya sea a nivel matraz o reactor, es importante evaluar algunos parámetros de cultivo, como aireación, agitación, fuente de carbono, nitrógeno y el medio de cultivo, ya que para cada microorganismo es diferente el efecto que pueden tener estos parámetros. A pesar de que existen muchos trabajos acerca de la producción de biosurfactantes con microorganismos, pocos son los reportados en donde evalúan la aireación y agitación. En la Tabla 4 y tabla 5 se muestran trabajos realizados con diferentes *Bacillus*, entre ellos *Bacillus licheniformis*, similar a la cepa IMP-BL, tanto a nivel matraz como en reactor a diferentes condiciones.



Tabla. 4.-Resultados en matraz y reactor a diferentes condiciones de cultivo para microorganismos *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Continua)

Microorganismo	Tipo de biosurfactante	Fuente de Carbono	Tensión Superficial (mN/m)	Temperatura °C	Estabilidad pH	Condiciones operación de sistema	Bibliografía
<i>Bacillus licheniformis</i>	Liquenisina	Sacarosa	27.5	25-40	6-10	En Matraz a 250 rpm y 40 °C	McInerney Y Col., 1985
	Liqueniformin	Crudo	38	45-65	7-11	En Matraz, 4 días	Biria y Col.,2010
	Lipopéptidos	Aceite de oliva	46	37	-	En Matraz a 250 rpm	Dehghan y Col., 2010
	Lipopeptidos	Crudo	30	35	7-10	En Matraz a 200 rpm	Haghighat Y Col.,2008
	Lipopeptidos	Glucosa	35	30	-	En Matraz 4 días	Thaniyarvan Y Col.2003
		Glucosa	-	50	6-7	En Reactor a 1.5 ml/min	Lin y Col., 1993
	Lipopeptidos	Glucosa	-	30	-	En Matraz a 200 rpm	Youssef y Col.,2007
	Surfactina	Caseína	-	35	-	-	Amari y Col., 2010



Tabla. 5.- Resultados en matraz y reactor a diferentes condiciones de cultivo para microorganismos y Bacillus subtilis

Microorganismo	Tipo de biosurfactante	Fuente de Carbono	Tensión Superficial (mN/m)	Temperatura (°C)	Estabilidad pH	Condiciones de operación del sistema	Bibliografía
Bacillus Subtilis	Surfactina	Sacarosa	27	40	6.5	Matraz 500 ml	Akavahan y Col.,2005
	Surfactina	Sacarosa	26	37	6.5	Matraz 250 ml	Pansiripat y Col., 2010
	Lipopeptido	Glucosa	27.3	30	7.2	Matraz 250 ml y 240 rpm	Anyawu y Col., 2011
	Surfactina	Aceite crudo	25.7	25	7.0	Matraz 250 ml y 250 rpm	Gudiña, 2010



4.-JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, se ha observado un creciente interés por la producción de biosurfactantes por sus aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica. En la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos y en la recuperación de hidrocarburos (extracción), esto último en la industria petrolera.

La gran aplicación de los agentes biológicos, hace necesario buscar nuevas alternativas para mejorar las condiciones de producción de los mismos, que tengan buenos rendimientos y que sean aplicables a la industria del petróleo, con una buena eficiencia, menos costos, y sobre todo, un menor impacto al medio ambiente (menos tóxicos), para hacerlos competitivos frente a los surfactantes químicos que son producidos a gran escala.

El uso de biosurfactantes también encuentra su campo de aplicación en el transporte de petróleo en ductos, en esta área, un reto importante es disminuir la viscosidad del aceite, donde los biosurfactantes pueden modificarla, así como cambiar también la tensión interfacial y la tensión superficial, haciendo que el transporte y almacenaje del mismo se lleve a cabo de una forma más sencilla.

Los agentes biológicos poseen muchas ventajas sobre los surfactantes químicos, sin embargo el costo de producción de los biosurfactantes debe ser competitivo, es por esto necesario realizar estudios a nivel laboratorio para optimizar la producción a nivel reactor.



5.-OBJETIVOS

5.1.-Objetivo general

- Efecto de la aereación para la producción de biosurfactante a nivel matraz y su escalamiento a nivel reactor utilizando diferentes flujos de aereación.

5.1.1.-Objetivos particulares

- Evaluar la producción de biosurfactante y el crecimiento microbiano utilizando un microorganismo aerobio a nivel matraz.
- Producción de biosurfactante a nivel reactor con diferentes flujos de aereación.
- Determinar el efecto del biosurfactante producido a nivel matraz y reactor sobre diferentes aceites modelo (hexano, hexadecano, diesel, queroseno, y heptano).

5.2.-Hipótesis

Con la modificación de las condiciones de aereación en un reactor completamente agitado para el cultivo de la cepa IMP-BL, se obtendrá una reducción de la tensión superficial en menor tiempo.



6.-METODOLOGÍA

6.1.-Materiales y métodos

Para el desarrollo de éste trabajo se requirió de una estrategia experimental que requirió de una serie de pasos específicos para poder efectuarse, representados en la Figura 3.

Para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-BL, fue necesaria su reactivación en medio mineral aproximadamente 24 h, posteriormente se realizaron pases sucesivos del cultivo en medio fresco, para tener una cepa estable en cuanto a disminución de la tensión superficial (producción de biosurfactante). Los pasos posteriores consistieron en la realización de cinéticas de crecimiento a nivel matraz y reactor para la producción de biosurfactante.

En el caso de la producción de biosurfactante a nivel reactor fueron realizadas cinéticas de crecimiento a diferentes condiciones de aireación para evaluar el efecto de esta variable sobre la producción de biosurfactante.

Por último, de las cinéticas en matraz y la mejor cinética en reactor se tomaron muestras para tener el producto liofilizado y poder evaluar tanto la CMC, como el rendimiento del producto obtenido como extracto crudo. Además con estos productos se evaluó el efecto del agente biológico sobre aceites modelo (hexano, hexadecano, diesel, queroseno, y peptano) por medio de la tensión interfacial.

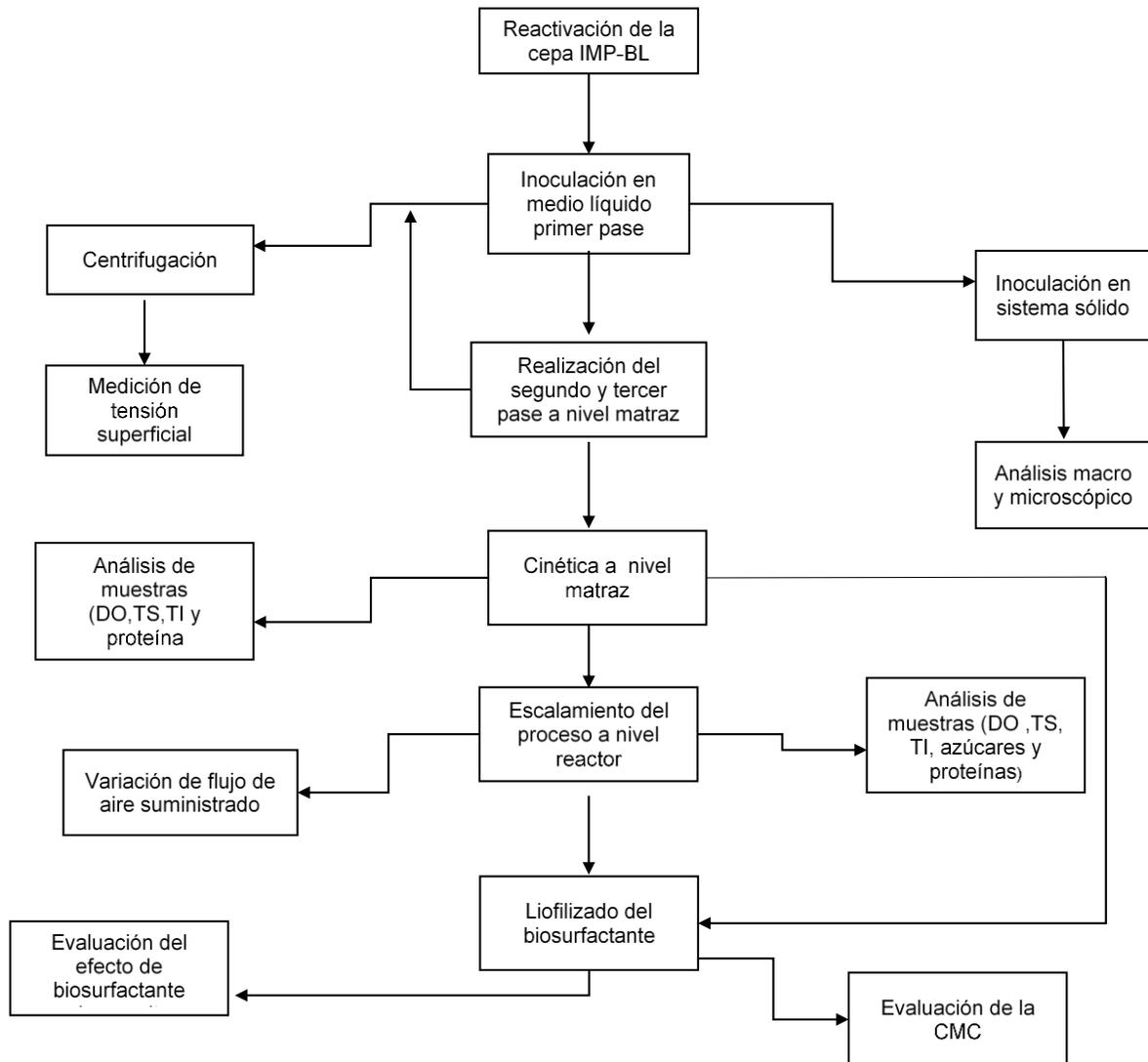


Figura 3.-Estrategia experimental

Pase: Es la transferencia de microorganismos de un cultivo viable a un medio fresco para el nuevo crecimiento de microorganismos y se tenga un cultivo estable en cuanto a producción de biosurfactante.



6.2.-Microorganismo

Para el desarrollo experimental de este trabajo se utilizó la cepa aerobia IMP-BL, esta cepa es una bacteria que crece a 40 °C, 150 rpm y pH de 6.

6.3.-Medio de cultivo

Para generar el medio de cultivo se tiene que utilizar los siguientes compuestos descritos en la tabla 6, para la reactivación de la cepa, para las cinéticas de producción de biosurfactante a nivel matraz y reactor.

Tabla. 6.-Composición del medio de cultivo para la producción de biosurfactante por la cepa IMP-BL

Compuesto	Cantidad g/l
Dextrosa	10g
NaCl	10g
MgSO ₄	0.25g
KH ₂ PO ₄	5.3g
K ₂ HPO ₄	16g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
CaCl ₂	0.1g
FeSO ₄	0.001g
Agua destilada	1 lt
Elementos traza	15 ml

Elementos traza: Compuesto químico necesario en cantidades muy pequeñas para el desarrollo de un microorganismo.



6.3.1.-Preparación del medio de cultivo

- Se pesaron todos los reactivos analíticos.
- Fuente de carbono: Dextrosa, se pesó y se disolvió en 300 ml. con agua destilada, la solución se agitó hasta la total homogenización. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 mín.
- Solución de sales minerales: Los compuestos $((NH_4)_2SO_4$ (0.125g), $NaCl$ (0.5g)) se disolvieron en 500 ml. de agua destilada se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.
- Solución de CaCl: El CaCl (0.015g), se disolvió en 150 ml de agua destilada, se esterilizó en la autoclave a 120°C durante 15 mín.
- Solución de $FeSO_4$: El $FeSO_4$ (0.001g), se disolvió en 50 ml de agua destilada y se esterilizó con un filtro de 0.2 micras. No se somete a calentamiento.
- Todo este procedimiento se debe realizar por separado para evitar la precipitación de los reactivos.

Posteriormente todos las soluciones se mezclan tanto el medio de cultivo como los elementos traza, en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar para obtener la composición descrita en la Tabla 7.

6.3.2.-Preparación de solución de elementos traza

Para la solución de elementos traza (Tabla 7), se pesaron cada uno de los reactivos y se disolvieron en 1 lt de agua destilada. Una vez diluidos los reactivos se sometieron a esterilización utilizando filtros de 0.2 micras, por último la solución traza se guardó en un frasco de medio de cultivo color ámbar para evitar degradación de los reactivos.

**Tabla. 7.-Solución de elementos traza**

Reactivos	Cantidad (g/l)
EDTA	1g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	3g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.1g
$Al K(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.01g
H_3BO_3	0.01g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.01g
Agua destilada	1 L

6.4.-Reactivación de la cepa IMP-BL

La reactivación de la cepa IMP-BL se realizó en medio líquido, debido a que la cepa se encontraba en glicerol a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. En matraces de 250 ml que contenían 80 ml de medio mineral, se adicionó el contenido del vial criogénico con la cepa (1 ml). Los matraces se incubaron en un baño de agitación a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm, durante 24 h (1ra. resiembra).

Al final del periodo de incubación se tomó una muestra de 1 ml y se determinó densidad óptica con el espectrofotómetro. Se tomó una muestra de 10 ml y se determinó tensión superficial con el tensiómetro.

Con el propósito de tener un microorganismo estable en cuanto a la producción de biosurfactante, se realizaron dos resiembras más. De la primera resiembra se inocularon 2 matraces con 1 ml de inóculo y 100 ml de medio mineral.

Estos matraces se incubaron con las mismas condiciones de la primera resiembra y se realizaron las mismas determinaciones, posteriormente se llevó a cabo una tercera resiembra a partir de la 2da. Al final del periodo de incubación.,



Se determinó tensión superficial, densidad óptica y el microorganismo se observó al microscopio para verificar su forma, agrupación y Gram.

6.5.-Conservación de la cepa IMP-BL

Con el propósito de conservar la cepa pura para experimentos posteriores se realizaron los siguientes métodos.

A) En viales criogénicos: De 1.5 ml, se adicionaron 0.7 ml del cultivo de la cepa IMP-BL y 0.7 ml de glicerol (líquido crioprotector), la mezcla se homogenizó en vortex durante 1 minuto y los viales se conservaron en refrigeración a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B) Conservación de la cepa en tubos inclinados:

Otra manera de conservar la cepa pura es el método de conservación de tubos inclinados. Para ello se realizan los siguientes pasos:

- Calentar 200 ml de Agar nutritivo en un matraz Erlenmeyer hasta observar su homogenización.
- Colocar 8 ml de Agar en tubos de ensaye.
- Esterilizar el Agar nutritivo en la autoclave durante 15 mín. a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Dejar reposar los tubos de forma inclinada para su secado.
- Colocarlos dentro de la incubadora durante 24 horas para observar si existe algún crecimiento bacteriano desconocido y realizar prueba de esterilidad.
- Si no existe algún crecimiento microbiano con un asa previamente esterilizada se toma una pequeña cantidad la cepa IMP-BL contenida en cajas petri y se inocula por el método de **siembra en estría simple tipo cuadrante**
- Se incuban durante 24 h a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Posteriormente los tubos con crecimiento se conservan en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La Figura 3, muestra los tubos con agar donde se conservó la cepa IMP- BL.

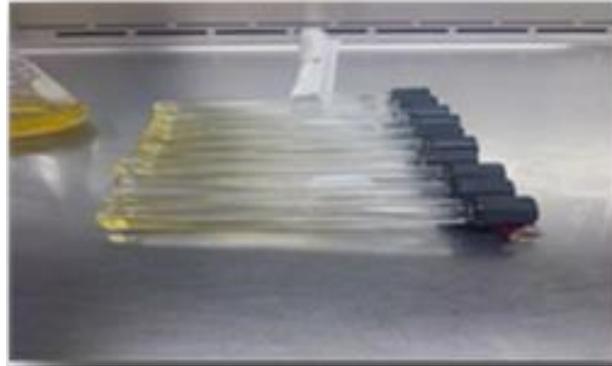


Figura 4.-Conservación de la cepa IMP-BL en tubos inclinados

La técnica de siembra en estría simple es usada para aislar cepas puras en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies. La técnica consiste en, mediante un asa de siembra previamente esterilizada, rayar la superficie de cultivo de una placa Petri de forma que en cada pasada sea menor el número de células depositado, las últimas pasadas deberá depositar un número tan bajo de células que, una vez incubadas, se formen colonias puras

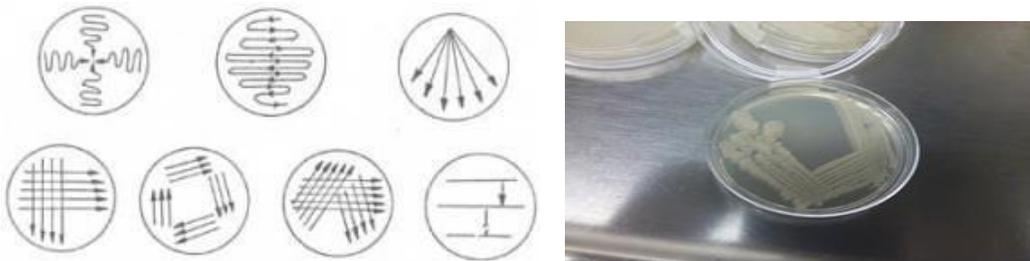


Figura 5.-Siembra en estría simple tipo cuadrante



6.6.-Evaluación microscópica y macroscópica de la cepa IMP-BL

Para analizar micro y macroscópicamente la cepa IMP-BL, se prepararon cajas Petri con Agar nutritivo. Se realizó la siembra en placa, por estría. Las placas fueron incubadas a 40°C por 24 h., las colonias obtenidas se observaron macroscópicamente en cuanto a forma, color, tamaño, elevación, entre otras características. También se realizó la caracterización microscópica con Tinción de Gram (*Madigan y Col., 2004*) y se observó en microscopio de contraste, en donde se observó que no existía contaminación alguna con otro tipo de microorganismo.

Agar nutritivo: Medio de cultivo sólidos, utilizado para crecimiento microbiano, compuesto de peptona, agar, cloruro de sodio, extracto de carne y/o levadura.

6.7.-Cinética de crecimiento y producción de Biosurfactante a nivel matraz

Para evaluar el crecimiento y la producción del biosurfactante de la cepa IMP-BL, se llevó a cabo una cinética. Se prepararon 24 matraces de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo (Figura 6). Los matraces fueron inoculados con 1 ml de la cepa proveniente de la 3ra resiembra. Los matraces se inocularon a 40 °C a 150 rpm. El muestreo se realizó retirando 2 matraces cada tiempo definido de muestreo, en intervalos de 1 h hasta llegar a 9 h. La producción de biosurfactante se determinó mediante la disminución de la tensión superficial, la cuantificación de azúcares totales fue por el método de Dubois (1956), la cuantificación de proteínas por el método de Brandford (1976), la densidad óptica con el espectrofotómetro UV/VIS.



Figura 6.-Cinética de crecimiento de la cepa IMP-BL en matraz

6.8.-Producción de biosurfactante a nivel reactor

Con las condiciones de producción del biosurfactante a nivel matraz, se acondicionó un reactor completamente agitado de 3 litros. Esto para escalar la producción de biosurfactante variando la aereación y manteniendo fija la temperatura de 40°C y la agitación de 150 rpm. La Figura 7, muestra el reactor completamente agitado utilizado en el laboratorio.

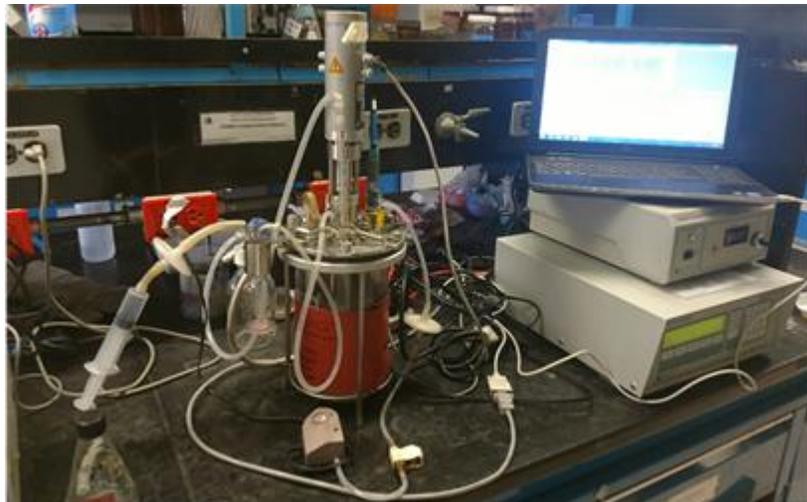


Figura 7.-Reactor aplikon de 3L para el cultivo de la cepa IMP-BL



6.9.-Esterilización del reactor

Al reactor se le realizó un lavado con jabón libre de fosfatos y con agua destilada, para eliminar interferencias en los cálculos posteriores. Se dejó secar, posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 min. (No se someten a proceso de calentamiento los sensores de temperatura y pH).

6.9.1.-Inoculación del reactor para la producción del biosurfactante

Una vez esterilizado el medio de cultivo y el reactor, en una campana de flujo laminar, se adicionó, 1.6 litros de medio de cultivo al reactor. El medio se inoculó con 32 ml de inóculo con una edad de 24 h y una concentración de proteína de 30 mg/l. Se colocaron los sensores de temperatura, pH y oxígeno. El reactor se retiró de la campana y se realizó la conexión del Biocontrolador y el controlador de agitación, chaqueta de calentamiento, así como a la bomba de aireación para comenzar la cinética de producción del biosurfactante. Las condiciones de operación fueron: agitación a 150 rpm, temperatura de 40 °C. y los diferentes flujos de aireación utilizados fueron; 0, 600, 700, 750 y 800 ml/min.(0, 0.38 0.44, 0.47, y 0.5) volumen de aire/volumen de líquido por minuto o (vvm) respectivamente.

6.9.2.-Muestreo en reactor

Para evaluar la producción de biosurfactante y el crecimiento microbiano se tomaron 15 ml de muestra en intervalos de 1 h hasta llegar a 24 h. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 mín. Al sobrenadante se le determinó tensión superficial para corroborar la producción de biosurfactante y azúcares totales para evaluación del consumo de sustrato; al precipitado se le determinó la concentración de proteína para analizar el microorganismo. También a una muestra de 1 ml del cultivo se le determinó densidad óptica para el monitoreo de crecimiento microbiano.



6.10.-Extracción y determinación de la producción de biosurfactante en reactor por medio de liofilización

Para determinar el rendimiento del producto obtenido en los experimentos realizados a nivel reactor, se realizó una extracción del agente biológico producido, mediante un proceso físico de liofilización, que consiste en deshidratar el producto biológico sometiendo a congelación, eliminando el hielo posteriormente mediante un ligero calentamiento al vacío que lo transforma en vapor (sublimación) y el remanente que se obtuvo durante este proceso fue el extracto crudo.

Se tomó una muestra de 100 ml de biosurfactante producido de cada uno de los experimentos a nivel reactor en los tiempos donde se tuvo la mayor disminución de la tensión superficial. Las muestras fueron vertidas en tubos de plástico de 50 ml. Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante (donde se encuentra el biosurfactante) de la biomasa. El sobrenadante se adicionó en tubos de liofilizado y se colocaron inclinados en el congelador, con el fin de que existiera mayor superficie de contacto. Una vez que las muestras estuvieron congeladas, se ajustaron en la liofilizadora para eliminar el exceso de agua y obtener el biosurfactante en polvo, parcialmente purificado. La figura 8, muestra la liofilizadora utilizada en este proceso.



Figura 8.-Liofilizadora para la extracción de biosurfactante



6.11.-Técnicas analíticas

Dichas técnicas se utilizaron para la determinación del microorganismo, como las que se describen a continuación:

6.11.1.-Observación macroscópica

A las colonias crecidas en placa se les realizó una observación macroscópica y se describieron sus características morfológicas como son: Forma de la colonia, borde, color y textura, mostradas en la tabla 8.

6.11.2.-Observación microscópica

De las colonias crecidas se tomó una muestra y se realizó un frotis en porta objeto. Se realizó la tinción de Gram (Madigan y Col., 2004). Se observó si se trataban de cocos o bacilos Gram (\pm), en el microscopio de contraste de fases, utilizando el objetivo de inmersión 100X.

6.12.-Preparación de las muestras para determinación de proteínas

De las muestras, se centrifugó 1 ml de muestra del cultivo durante 10 mín. a 10,000 rpm, se retiró el sobrenadante y a la biomasa que se quedó en el fondo del tubo se le adicionó solución salina al 0.85% hasta completar el volumen de la muestra original. Se resuspendió en vortex (primer lavado), se realizaron tres lavados. De la última resuspensión se tomaron 0.6 mL de muestra para realizar la hidrólisis y se colocaron en un tubo de ensayo, se agregaron 2.4 ml de solución salina al 0.85% y 3 ml de la solución de NaOH 0.1 N. Se agitaron las muestras en vortex y se colocaron en baño durante una hora a una temperatura de 85°C. Al terminar el tiempo de la hidrólisis se tomaron 0.5 ml de muestra hidrolizada y se colocaron en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 ml del reactivo de Coomassie.



Se agitaron los tubos en vortex y se leyeron en un espectrofotómetro UV/VIS (marca Thermo Scientific, modelo: Biomat) a una longitud de onda de 620 nm. Con la curva patrón de absorbancia vs concentración de proteína, se determinó la concentración de proteína en cada ejemplar. La Figura 9 prueba la coloración azul de las muestras para determinación de proteína.



Figura 9.-Muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo para la cuantificación de proteínas

6.12.1.-Cuantificación de proteínas

Se utilizó el procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas por el método Bradford (1976). Este método consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino (BSA)). La cuantificación se hace midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm, y graficando la absorbancia vs la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con esta curva de calibración, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm.



6.12.2.-Curva patrón de proteínas

Se realizó una curva patrón a partir de albúmina de huevo en concentraciones de 5 a 50 mg/L. En tubos de ensaye se agregaron 0.5 ml de cada solución de las diferentes concentraciones preparadas, se adicionaron 0.5 ml de la solución Azul de Coomassie y se midió en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 490 nm. **Ver Anexo figura 27, pág. 69**

6.13.- Preparación de las muestras para determinación de azúcares

En tubos de ensayo se colocaron 0.5 ml de muestra previamente centrifugada, se adicionó 0.5 ml de fenol y 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado, los tubos se mezclaron en vortex y se dejaron reposar 15 mín. Se midió la absorbancia **A** y con la curva patrón de absorbancia vs concentración de glucosa, se determinó la concentración de azúcares en cada muestra. La Figura 10 muestra el color ámbar de las muestras para determinación de azúcares totales.



Figura 10.-Muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo para la cuantificación de azúcares.



6.13.1 Azúcares totales

La determinación de azúcares totales en solución acuosa se llevó a cabo por el método de fenol-sulfúrico. Este método se basa en una valoración colorimétrica de hidratos de carbono que utiliza una solución de glucosa o sacarosa como patrón (10 a 200 μg / ml). La absorbancia se lee a 490 nm en un espectrofotómetro UV/Vis marca Thermo Scientific.

6.13.2.-Curva patrón de azúcares totales

La curva patrón se preparó a partir de glucosa en concentraciones de 20 a 100 mg/l de glucosa. En tubos de ensayo se colocaron 0.5 ml de diferentes soluciones de glucosa a diferentes concentraciones, se adicionó 0.5 ml de fenol y 2.5 ml H_2SO_4 concentrado. Las soluciones de los tubos se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar 15 min, posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Se construyó la curva patrón de absorbancia vs. Concentración de glucosa. **Ver Anexo figura 28 pag.69**

6.14.-Tensión superficial

La tensión superficial es un fenómeno dado por las fuerzas cohesivas de las moléculas de un líquido en su superficie. Las unidades con las que se mide la tensión superficial son mN/m, lo que quiere decir que es la fuerza (en Nm) necesaria para romper 1 m de película del líquido.

La determinación de la tensión superficial se realizó por el método de placa, con un tensiómetro automático:

- Se colocó el recipiente con la muestra.
- Se introdujo la placa en la parte superior del tensiómetro.
- Se ajustó automáticamente hasta el tope y posteriormente se inició la medición la cual aparece representada en la base de datos del programa.

- Por último para comprobar que estaba calibrado el equipo, se toma una muestra de agua destilada (3ml), tomando como referencia que la tensión del agua es de alrededor de 72 mN/m. una vez calibrado se realizaron las determinaciones correspondientes de tensión superficial de las muestras, por triplicado. La Figura 11 muestra el tensiómetro utilizado.



Figura 11.-Tensiómetro Marca Kruss

6.15.- Tensión interfacial (TIF)

La TIF involucra fuerzas cohesivas, principalmente fuerzas de adhesión entre la fase líquida de una sustancia y la fase sólida, líquida o gaseosa de otra sustancia. La interacción ocurre en las superficies de las sustancias involucradas. La TIF se mide en trabajo por unidad de área o fuerza por longitud mojada.



6.16.-Efecto del biosurfactante sobre aceites modelo, medido como tensión interfacial TIF.

Las muestras de biosurfactante en las mejores cinéticas en matraz y reactor fueron utilizadas para evaluar el efecto de estas sobre aceites modelo. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm a 4°C durante 10 mín. El sobrenadante fue separado de la pastilla celular y fue utilizado para la medición de la TIF junto con los aceites modelo: hexano, hexadecano, diésel, queroseno y heptano.

Para la medición de la TIF se utilizó el método del anillo push y el tensiómetro. Que se basa en la medición la TIF entre dos líquidos uno de alta densidad (biosurfactante) y otro de baja densidad (aceites modelo). Un anillo se coloca sobre la interfaz del líquido y se mide la fuerza requerida para separar el anillo de la superficie.

En un vaso de precipitados se colocan 20 ml de sobrenadante (biosurfactante) y 20 ml del aceite modelo, se introduce el anillo push y se mide la TIF. La Figura 12 muestra la medición de la TIF en dos mezclas de biosurfactante y aceite modelo.

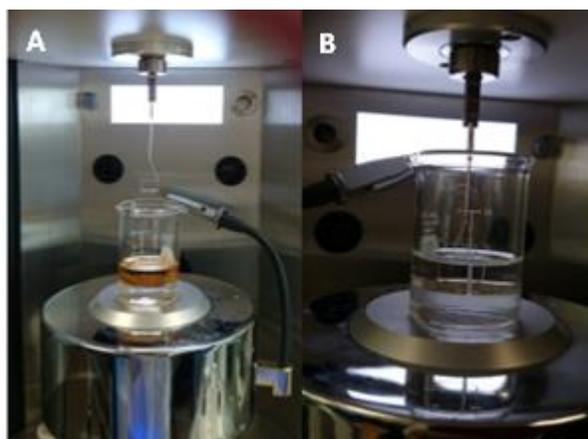


Figura 12.-Medición de tensión superficial. A) Mezcla de biosurfactante y Queroseno B) Mezcla de biosurfactante y Hexano



6.17.-Concentración micelar crítica

Se denomina (CMC) a la concentración mínima de surfactante a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución (*Yushuo, 2008*).

Estas micelas se producen cuando la parte hidrofóbica del surfactante, al ser incapaz de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, producen un aumento de la energía libre del sistema. Una manera de aliviar este aumento, es aislar la región hidrofóbica interaccionando con otras superficies, asociándose a otros compuestos hidrofóbicos o formando vesículas (micelas) en las que la región lipofílica se sitúa en el centro y la hidrofílica hacia fuera, formando los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Cuanto menor sea la CMC, más eficiente es el surfactante (*Laura Raiger y Col., 2009*).

Se preparó una solución patrón del biosurfactante obtenido a una concentración conocida. A partir de esta se realizaron distintas diluciones para tener diferentes aglomeraciones, a las cuales se determinó tensión superficial como se describió anteriormente. Cuando se encontró una medición constante en el valor de la tensión superficial, se asumió que ya no había cambio sobre ella por efecto de la aglomeración del biosurfactante. Se construyó la curva de Tensión superficial vs. Concentración de biosurfactante y en la menor tensión, se determinó la CMC en g/l.



7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo.

7.1.-Caracterización macroscópica de la cepa IMP-BL

La caracterización macroscópica de la cepa IMP-BL se realizó a partir del conjunto de microorganismos crecidos en medio sólido en caja Petri. La Figura 13 describe las colonias observadas.

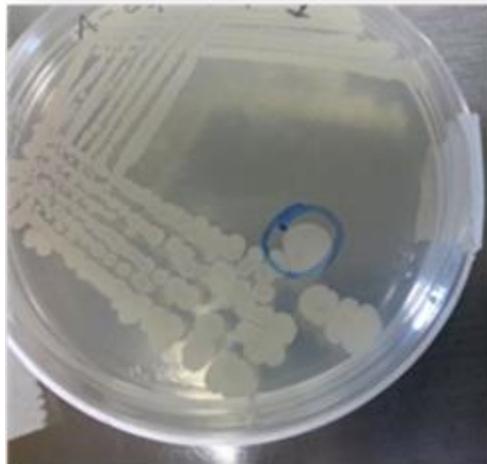


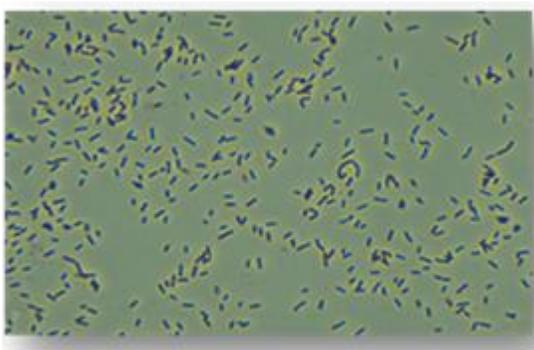
Figura 13.-Colonias de la cepa IMP-BL crecidas en placa

**Tabla. 8.-Morfología colonial de la cepa IMP-BL**

Morfología colonial	IMP-BL
Tamaño	5-10 mm
Forma	Irregular
Borde	Lobulado
Elevación	Plana
Color	Crema
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Cremosa
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejada	Brillante

7.1.2.- Caracterización microscópica de la cepa IMP-BL

Se realizó un frotis de una de las colonias crecidas y se preparó una tinción Gram. Se observó al microscopio con el objetivo de inmersión, se observó la presencia de bacilos cortos Gram positivos, aislados, como se observa en la Figura 14, lo cual coincide con lo reportado por (Ghani y Col, 2013). Ambos aislaron y caracterizaron diferentes cepas de *Bacillus* para la producción de enzimas y biosurfactante con importancia industrial.

**Figura 14.-Observación microscópica de la cepa IMP-BL**



Algunas de las características del microorganismo empleado son: es un aerobio facultativo, este posibilita su desarrollo tanto en condiciones aerobias como anaerobias y su diversidad de propiedades fisiológicas se refleja en los amplios rangos de temperatura, pH y concentración de sal para su crecimiento óptimo (*Ghani y Col, 2013*). Microorganismos similares se han aislado a partir de ambientes impactados con contaminantes orgánicos de pozos petroleros y han sido reportados como productores de biosurfactantes (*Salamanca, y Col., 2003*).

7.1.3.- Tinción de Gram

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884.

Hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, confiriendo propiedades determinantes para cada microorganismo.

Bacterias Gram⁺: Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano no cuentan con membrana celular externa. Las **bacterias G⁺** retienen el cristal-violeta después de la decoloración y aparecen de color azul intenso (purpura).

Bacterias Gram⁻: La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, cuyo componente estructural único son los lipopolisacáridos. Las bacterias G⁻ no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo con safranina.



7.4.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz

Con el objeto de determinar el tiempo de la mayor producción de biosurfactante, y el crecimiento microbiano, se realizó una cinética en matraz.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos de la producción de biosurfactante medido como tensión superficial y del crecimiento microbiano medido como proteína.

Se observa que de las 0 a las 6 horas la tensión no disminuyó permaneció en un valor promedio de 71 mN/m y a partir de las 9 horas comenzó la disminución de la tensión superficial, hasta un valor de 26 mN/m a las 14 h. Después de este punto la tensión casi permaneció constante hasta las 48 horas con un valor promedio de 26 mN/m que fue el punto mínimo de la tensión superficial. En total la tensión disminuyó 46.2 unidades.

Con respecto al crecimiento microbiano (proteína). Este empieza a partir de las 3 h y aumenta de forma exponencial hasta las 24 h, se obtuvo un máximo de producción de proteína de 109 mg/l a las 36 h.

Después de las 36 h crecimiento casi se estaciona, posteriormente hubo una disminución del mismo, probablemente porque el sustrato empezaba a agotarse.

Se muestra que la producción de biosurfactante (disminución de la tensión superficial), está ligado al crecimiento microbiano (proteína), tal como ha sido reportado por (*Goldenberg Cooper.*, 1987) (*Banat y Col.* 2000). Sin embargo se muestra en la Figura 15, el valor máximo de disminución de tensión no coincide con el valor máximo de desarrollo microbiano, esto puede ser debido a que todavía hay una cierta concentración de sustrato, el microorganismo lo utiliza para crecimiento y no propiamente para la producción de biosurfactante.

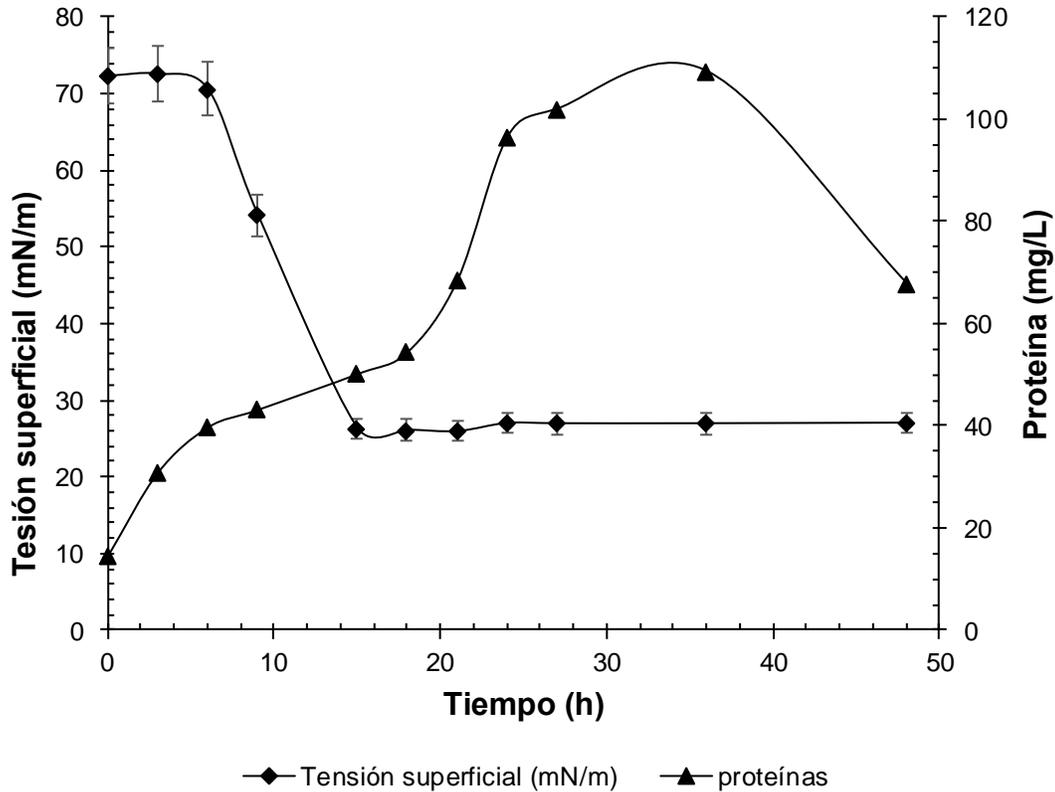


Figura 15.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante en matraz, de la cepa IMP-BL

En la Figura 16 muestra la producción de biosurfactante (tensión superficial) y el crecimiento microbiano (densidad óptica), se observa que la densidad no coincide con la producción de biosurfactante. Los máximos valores de densidad óptica se tienen entre las 18 y 24 horas, que es el rango donde mayor producción de biosurfactante se obtuvo. Los valores máximos de densidad óptica (1.56 nm) a las 21 h, no coinciden con la máxima producción de proteína, por lo que podemos asumir que los elementos detectados como turbiedad corresponden mayormente al biosurfactante producido.

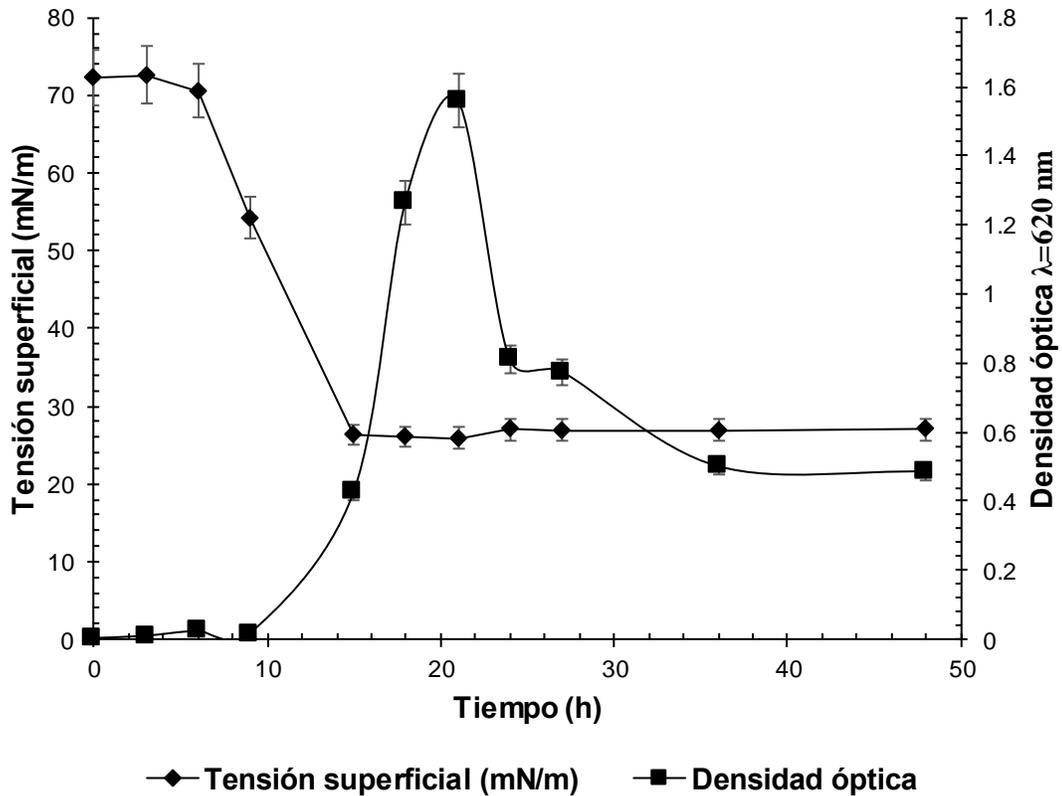


Figura 16.-Producción de biosurfactante (tensión superficial) y crecimiento microbiano (densidad óptica) por la cepa IMP-BL a nivel matraz

(*Javaheri y Col., 1985*), reportaron una disminución de la tensión superficial con una cepa de *Bacillus licheniformis*, en valores que van desde 27 a 30 mN/m en un tiempo de 24 a 30 h. Por otra parte (*Joshi y Col., 2013*), reportan la disminución de la tensión superficial a 28 mN/m en un tiempo de 24 a 36 h. Ambos trabajos realizados con *Bacillus licheniformis*, a diferentes condiciones de aireación y fuente de carbono respectivamente. De acuerdo a esto se puede asumir que la cepa IMP-BL es una cepa con buena actividad surfactante.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



En lo que respecta al consumo de sustrato (Figura 17), muestra que el sustrato es consumido gradualmente y que es utilizado tanto para la producción de biosurfactante como para el crecimiento microbiano.

Se observa un consumo de 3.5 g/l a las 15 h y aproximadamente 7g/l a las 26 h y casi permanece constante hasta el final de la cinética (48h). En la literatura se ha reportado para varias especies de *Bacillus*, donde su crecimiento fue en medio mineral complementado con glucosa obtuvieron una reducción de la tensión superficial de 70 a 28 mN/m. (Javaheri D., 1985)

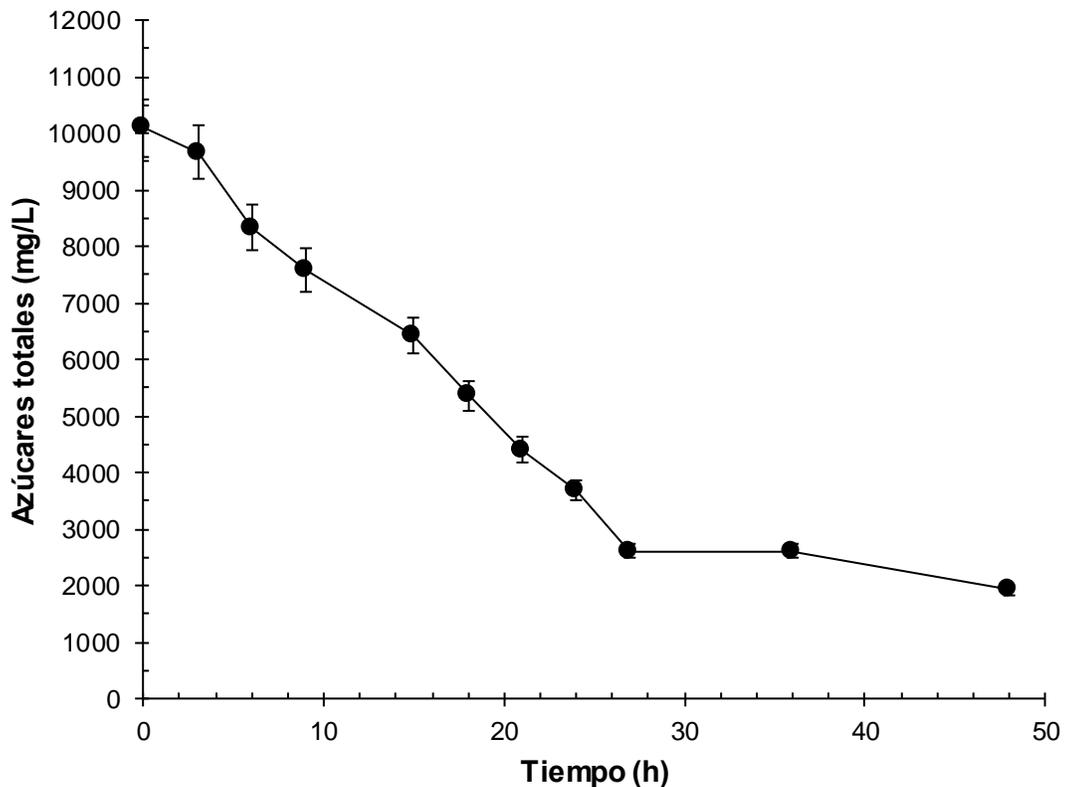


Figura 17.-Cinética de consumo de azúcares totales por la cepa IMP-BL a nivel matraz

La Tabla 9 se observan diferentes microorganismos productores de biosurfactante con diferentes sustratos y las tensiones superficiales a las que han llegado en diferentes tiempos de producción. Se observa que con sustratos solubles (sacarosa, glucosa), la disminución de la tensión superficial es alrededor de 28 y 40 mN/m, valores similares obtenidos en este trabajo por la cepa IMP-BL (26 mN/m).

En cuanto a los tiempos de producción de biosurfactante en la Tabla 9 se muestra que con los sustratos solubles el tiempo de producción de biosurfactante se encuentra en un rango de 48 a 144 h, que son considerados tiempos largos para una fermentación, en nuestro caso la máxima producción de biosurfactante se obtuvo entre 15 y 18 horas. Aunque aquí, no solo se lograría ver la máxima disminución de la tensión superficial, sino el rendimiento del producto obtenido, para lo cual se tendrían que hacer cinéticas donde se sacrificará un matraz por tiempo para evaluar el rendimiento del producto (que será caso de otro estudio).

**Tabla. 9.-Microorganismos productores de biosurfactantes**

Microorganismo	Fuente de carbono	Tensión superficial (mN/m)	Tiempo (h)	Referencia
Bacillus Subtilis	Glucosa	28	48	Makkar y Col 1998 Rodríguez y Col .2006
	Glucosa	39.5	72	
Candida glabrata	Glucosa	28.3	144	Gusmao y Col 2010
Pseudomona aeuroginosa	Aceite de soya	26	98	Lima 2009
Pseudomona aeuroginosa	Glucosa-Aceite de palma	30	48	Pansiripat 2010
Serratia marcescens	Sacarosa	40	72	Anyanwu 2010
Serratia marcescens	Glucosa	31	48	Roldan 2011

Fuente: Propia del autor.

7.4.1.-Concentración micelar crítica (CMC) del producto obtenido a nivel matraz.

La CMC es la concentración mínima que requiere un biosurfactante para llevar a cabo el mayor efecto en la disminución de la tensión superficial. La CMC se determinó a partir del producto previamente liofilizado producido a nivel matraz.



Se realizó una solución patrón del producto liofilizado a una concentración de 5,000 mg/l, de esta solución se realizaron diferentes diluciones y a cada solución se le determinó la tensión superficial.

La Figura 18 muestra el comportamiento de la tensión superficial a diferentes concentraciones de biosurfactante. De acuerdo con el incremento de la concentración de biosurfactante se obtiene la disminución de la tensión superficial, permaneciendo casi constante a partir de 1,750 mg/l, se puede decir que la concentración micelar crítica promedio corresponde a 1,750 mg/l de biosurfactante. Cabe señalar que este concentrado corresponde al extracto crudo, es decir el biosurfactante sin purificar.

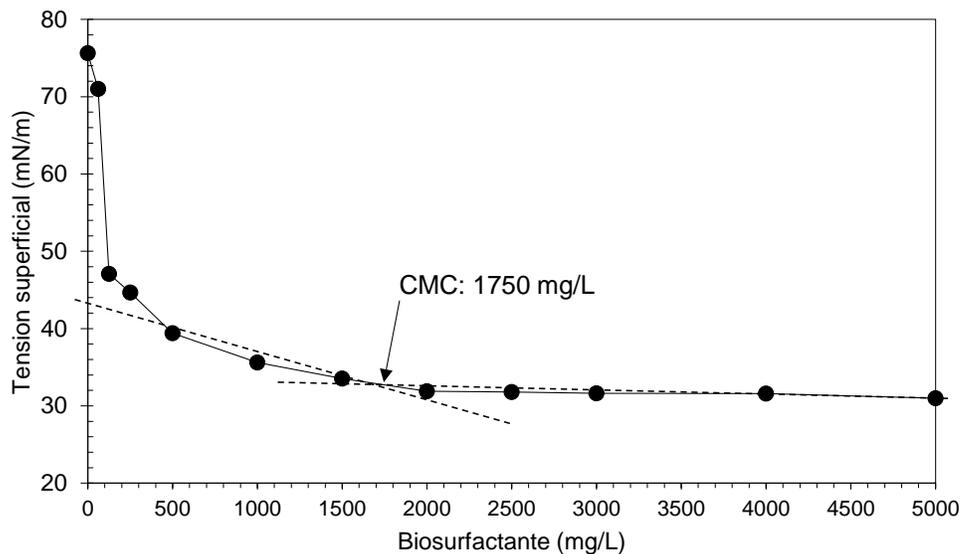


Figura 18.-Concentración micelar crítica del biosurfactante obtenido a nivel matraz por la cepa IMP-BL

Se han reportado diferentes valores de CMC, similar a la cepa utilizada en este trabajo. La Tabla 10 muestra diferentes CMC para otros microorganismos. Se observa que el producto obtenido, parcialmente purificado, se encuentra dentro de los rangos reportados para otras especies.

**Tabla. 10.-CMC de diferentes microorganismos**

CMC (mg/l)	Tensión superficial (mN/m)	Microorganismo	Referencia
197	30	Trichosporon asahii	Chandran y col., 2010
250	41.8	Lactobacillus paracasei	Gudiña y col., 2010
2900	36	Lactobacillus	Rodrigues y col., 2006
200	29	Lactobacillus	Pornsunthorntawee y col., 2010
860	52	Pseudomona aeuroginosa	Suryanti y col., 2009
300	29	Pseudomona aeuroginosa	Zanget y col., 2009

Fuente: propia del autor

7.5.-Cinética de crecimiento y producción de biosurfactante a nivel reactor.

Con el propósito de proponer el método más rentable para la producción del biosurfactante para su comercialización es necesaria la realización de un proceso de escalamiento, por lo tanto está sujeto a cambios que tienen que ver con la configuración del equipo, comportamiento de la cepa en el proceso de escalamiento, volumen de operación, temperatura, pH, oxígeno disuelto y demás parámetros involucrados en el proceso.

De acuerdo a esto, la producción de biosurfactante por la cepa IMP-BL se realizó a nivel reactor evaluando el efecto de la aireación en la producción de biosurfactante.



Se llevaron a cabo cinco pruebas a nivel reactor, utilizando las mejores condiciones obtenidas a nivel matraz de agitación y temperatura (40 °C, y 150 rpm respectivamente). Estas condiciones se mantuvieron fijas en las cinco experimentaciones realizadas a nivel reactor, la variable que fue modificada fue la aireación, ya que el microorganismo es un aerobio facultativo se propuso un rango de aireación que comprobaran su efecto en la producción de biosurfactante.

No se cuenta con muchos reportes acerca del escalamiento en la producción de biosurfactante con *Bacillus licheniformis*, similar a la esta cepa IMP-BL, por lo que las aireaciones empleadas fueron propuestas de acuerdo al rango que se reporta para producciones altas de biosurfactante para cepas similares a la empleada por (Santos, Ponezi y Col 2004), sin aereación, .38vvm, 0.44 vvm, 0.47vvm, y 0.5vvm). En desarrollo se evaluó el crecimiento microbiano y la producción del biosurfactante, así como el consumo de azúcares totales. Además se obtuvieron los rendimientos de las cinéticas cuya tensión superficial tuvo un notable descenso, evaluándose posteriormente la concentración micelar crítica del producto obtenido.

Durante la operación del reactor se monitoreó el comportamiento del oxígeno disuelto, del pH y la temperatura. Sin embargo, solo se presenta el comportamiento de estos parámetros de la cinética de reactor que se consideró mejor en cuanto al decrecimiento de tensión superficial, estabilidad y rendimiento de biosurfactante, así como concentración micelar crítica (extracto crudo).

Las Figuras 19a-19e muestran el comportamiento de la producción de biosurfactante (disminución de la tensión superficial) y el crecimiento microbiano (proteína) en las cinco cinéticas en reactor, realizadas a las diferentes aeraciones propuestas: sin aireación (Figura 19a), 0.38vvm (Figura 19b), 0.44vvm (Figura 19c), 0.47vvm (Figura 19d) y 0.5vvm (Figura 19e). Las cinéticas fueron monitoreadas hasta las 48 h, sin embargo en todas se observó que tanto la proteína como la tensión superficial permaneció igual que los puntos medidos a las 24 h, razón por la cual las figuras muestran el comportamiento hasta las 24 h.



La Figura 19a describe la cinética en reactor sin aireación, la tensión superficial disminuyó muy poco, ya que el valor más bajo obtenido fue de 65 mN/m a las 3 h posterior a este tiempo, la tensión volvió a aumentar. El crecimiento microbiano fue escaso en comparación con las cinéticas realizadas bajo condiciones de aireación, se alcanzó una concentración de proteína de 20 mg/l a partir de las 15 h. la cual se mantuvo constante lo que indica que la cepa IMP-BL necesita aireación para poder producir biosurfactante.

La Figura 20a se reporta el comportamiento de la tensión superficial y la densidad óptica en donde la cinética de reactor se realizó sin aireación cuyos resultados obtenidos fueron casi sin disminución de la tensión superficial el valor mínimo se mostró hasta las 24 h en donde sólo hubo una disminución de 6.64 unidades. Cuanto a la densidad óptica se observó constante esto indicó que no hubo producción de biomasa ni de biosurfactante. Concluimos que para que exista producción de biosurfactante debe haber aireación.

En lo que respecta a la Figura 21a se muestra el consumo de sustrato por la cepa IMP-BL en la cinética sin aireación se observa que en 12 h solo se consumieron 1862 mg/l de dextrosa posteriormente a este tiempo la concentración se mantuvo constante. De acuerdo a esto se reafirma que para un crecimiento microbiano óptimo se necesita oxígeno.

Refiriéndose Figura 19b se muestra la cinética en reactor con una aireación de 0.38vvm, con la cual se observó una disminución de tensión superficial de 36.0 mN/m hasta las 7 h, posteriormente aumentó de manera paulatina hasta obtener un valor constante a las 24 h de 55 mN/m. El crecimiento microbiano comenzó a aumentar hasta las 7 h con un valor significativo de 29 mg/L, este aumento continuo hasta llegar a un valor constante de las 15 h hasta las 24 h llegando así a una concentración de proteína de 108 mg/l observándose una fase estacionaria de crecimiento, al igual de la producción de biosurfactante.

La Figura 20b muestra la cinética en reactor realizada con una aireación de 0.38 vvm, en donde el comportamiento de la densidad óptica fue similar al de la proteína de la Figura 19b, salvo en el caso donde se obtuvo la mejor producción de biosurfactante que fue a las 7 h.



Referente al gasto de sustrato (Figura 21b) también se observó un decrecimiento máximo a las 7 h. con un valor de 5,643 mg/l de glucosa, es decir se consumieron 4,666 mg/L de glucosa en este tiempo, posteriormente el consumo se mantuvo constante. Aquí coincide que la mayor disminución de la tensión superficial y el mayor aumento de DO (oxígeno disuelto) fueron a las 7 horas, no así el crecimiento microbiano, lo que puede atribuirse a que con los productos de degradación de la glucosa la cepa IMP-BL mantuvo su crecimiento medido como proteína.

En la Figura 19c se observa la cinética en reactor con aireación de 0.44 vvm donde la reducción de la tensión superficial fue hasta un valor de 29 mN/m en 6 h, fue un tiempo menor comparado con la cinética de la Figura 20b. El crecimiento microbiano aumento a partir de las 7 h con un valor de 17 mg/L obteniendo un valor máximo considerable de proteína a las 24 h de 131.0 mg/L.

La figura 20c muestra la cinética en reactor realizada con una aereación de 0.44vvm, el comportamiento de la densidad óptica en esta cinética fue similar al de proteína (Figura 18c), tuvo los mismos saltos a partir de las 15h (0.95 DO) y se estacionó a las 24 horas.

Referente al consumo de sustrato (Figura 21c) se observa el máximo consumo a las 7 horas con un valor de 7,539 mg/l de glucosa es decir, se consumieron 3,330 mg/l de glucosa en este tiempo, posteriormente se continuó consumiendo sustrato hasta las 24 horas, lo que explica el gran salto del crecimiento microbiano de las 7 a las 15h, ya que en este tiempo se consumió el doble de cantidad de glucosa que a lo largo de las 7h con un valor de 6466 mg/l.

La Figura 19d, corresponde a la aireación de 0.47 vvm, se observa una reducción de tensión superficial a un valor de 28.0 mN/m en 6h aumentando solo una unidad a las 7 h, posteriormente regresa a una tensión superficial de 69.5 mN/m a partir de las 15 h y manteniéndose así hasta las 24 h. Con respecto al crecimiento microbiano empieza a partir de las 7 h con un valor 23 mg/l subiendo paulatinamente hasta 122 mg/L a las 15 h y comportándose de manera constante hasta las 24 h de monitoreo.



La Figura 20d muestra la cinética en reactor realizada con una aireación de 0.47 vvm. El comportamiento de la densidad óptica en esta cinética, fue similar al de proteína (Figura 19d) ya que tuvo los mismos aumentos a partir de las 15 h (1.08 DO) y se estacionó a las 24 h.

Alusivo al consumo de sustrato (Figura 21d), se observa el máximo consumo a las 7 horas con un valor de 5,531 mg/l de glucosa, es decir, se consumieron 4548.0 mg/l de glucosa en este tiempo. Posteriormente se continuó consumiendo sustrato hasta las 24 h, en donde se obtuvo un consumo casi total de sustrato con un valor de 57.013 mg/l

En la última cinética de reactor mostrada en la Figura 19e se modificó la aireación a 0.5 vvm. Se obtuvo una disminución de tensión superficial de 28 mN/m en tan solo 6 h. Sin embargo este valor de tensión superficial aumentó ligeramente a partir de las 7 h, hasta las 24 h con un valor de 60.5 mN/m, obteniendo así una disminución de 44.4 unidades en 6 h. El crecimiento microbiano aumentó de manera considerable a partir de las 7 h con un valor de 25 mg/L, posteriormente se elevó un poco desde las 15 h y hasta las 24 h manteniéndose constante con un valor de 40 mg/l de proteína. El desarrollo microbiano fue limitado comparado con la aireación de 0.47 vvm a las 7 h donde el crecimiento fue paulatino.

La Figura 20e describe la cinética en reactor realizada con una aereación de 0.5 vvm, el comportamiento de la densidad óptica en esta cinética (figura 19e), fue similar al de la proteína ya que aumentó hasta las 7 h (0.215 de DO) y se estacionó a partir de las 15 h (1.02 de DO).

En la Figura 21e, se observa que el consumo hasta las 7 horas fue moderado, con un valor de 8,660 mg/L de glucosa, es decir se, consumieron 1,155 mg/L de glucosa. Posteriormente se continuó consumiendo sustrato hasta las 24 horas, aquí se observó un consumo de 5,310 mg/L de glucosa, y aunque fue 4 veces mayor el consumo que en las primeras 7 horas, esto no se vió reflejado en el crecimiento microbiano, ni en los valores de densidad óptica.



En general se observa que el crecimiento microbiano y la disminución de la tensión superficial son directamente proporcionales en las cuatro cinéticas con aireación de 0.38vvm, 0.44 vvm, 0.47vvm, 0.5vvm respectivamente. Además se demostró que la aireación sí tuvo efecto significativo sobre el crecimiento microbiano y la producción de biosurfactante (disminución de la tensión superficial) y la producción de biosurfactante se obtuvo en un menor tiempo (6 h y 7 h). Así mismo se hace notar el hecho de que la velocidad de consumo de sustrato fue mayor en la cinética de 0.47 vvm, como se observó en las gráficas correspondientes a consumo de sustrato (Figura 21a-e) y de acuerdo a lo reportado en la Tabla 11.

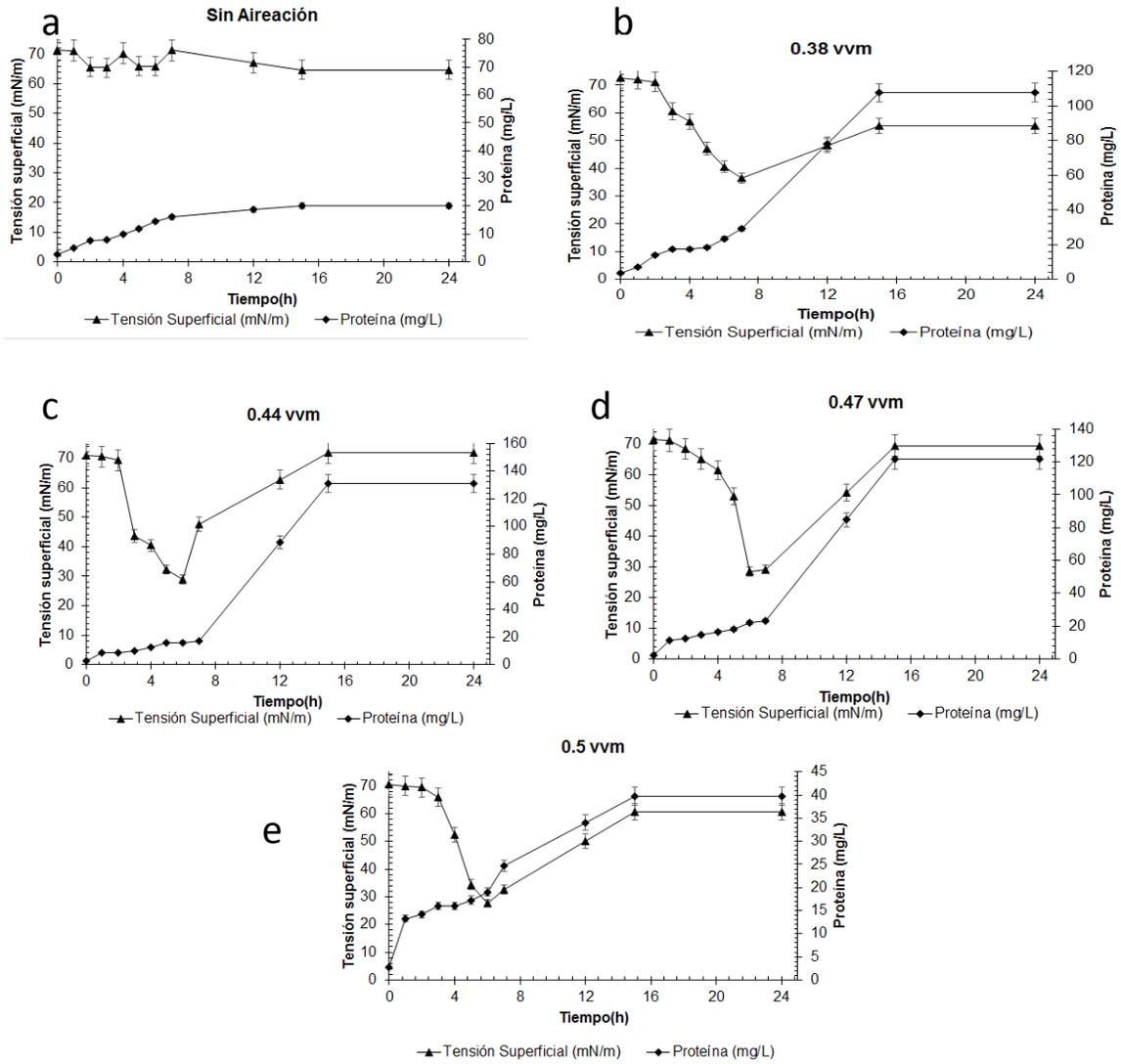


Figura 19.- Comportamiento de la producción de biosurfactante y crecimiento microbiano en cinéticas a nivel reactor por la cepa IMP-BL

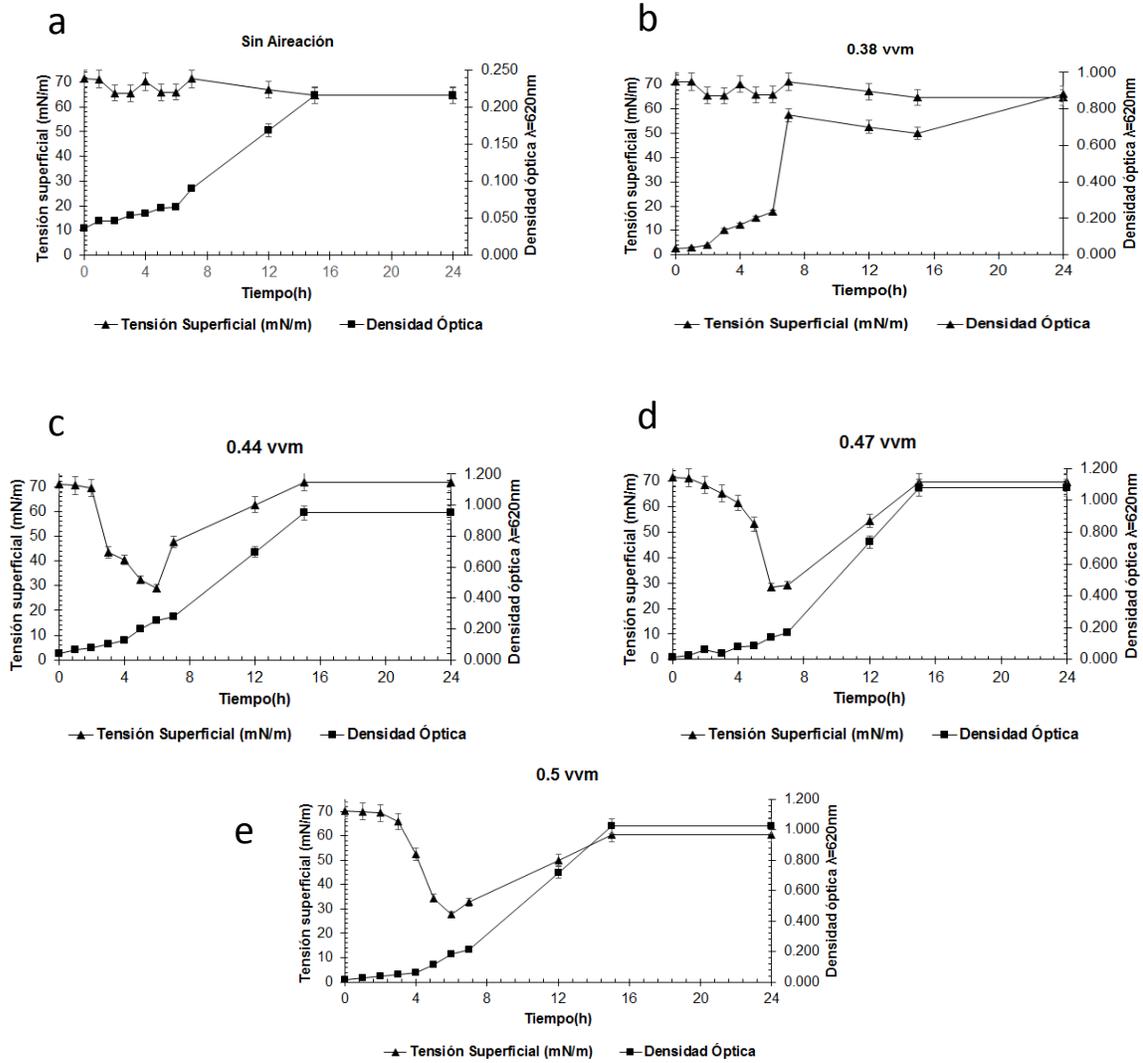


Figura 20.-Comportamiento de tensión superficial y densidad óptica a nivel reactor por la cepa IMP-BL

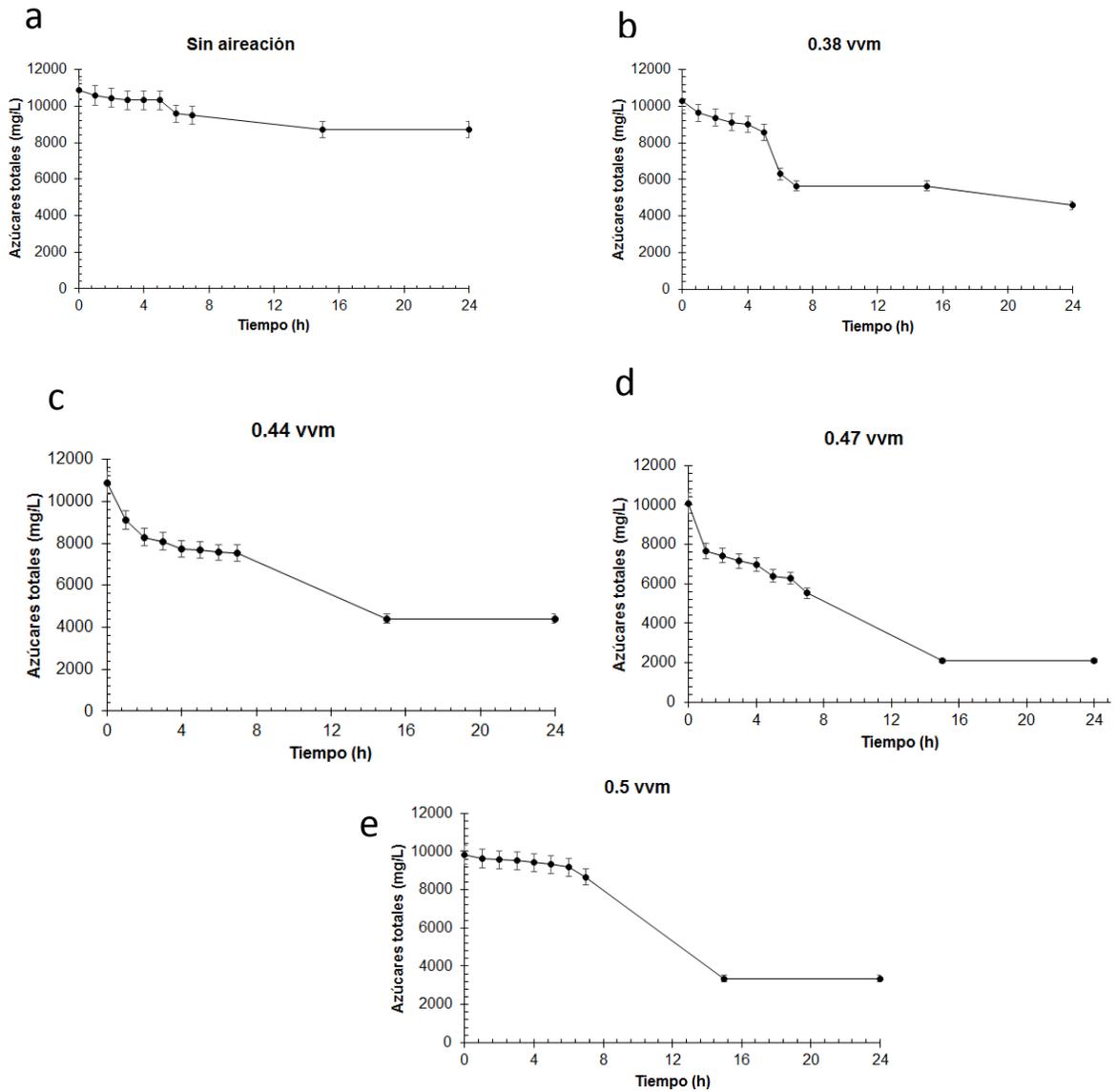


Figura 21.-Consumo de sustrato en cinéticas a nivel reactor con la cepa IMP-BL

**Tabla. 11.-Resumen de velocidad de consumo de sustrato**

Cinética	Velocidad de consumo de sustrato (mg/l)
Sin aeración	123.97
0.38 vvm	416.07
0.44 vvm	246.3
0.47 vvm	455.0
0.50 vvm	335.68

En la tabla 11 muestra cada una de las cinéticas y su velocidad de consumo durante su experimentación, medida en mg/l.

Haciendo referencia en la cinética sin aireación, se observó que la velocidad de consumo de sustrato con un valor de 123.97 mg/l., fue muy limitada debido a la carencia de oxígeno. Por lo que no hubo un consumo significativo de sustrato.

En cuanto a la cinética realizada con una aireación de 0.38 vvm, la velocidad de consumo de sustrato fue un poco más elevada de 416.07 mg/l. pero se mantuvo en una fase casi estacionaria a partir de las 6 h hasta las 15 h aunque hubo una continuidad en el consumo, no hubo un gasto constante de sustrato.

En la cinética con aireación de 0.44 vvm, la velocidad de consumo fue de 246.3 mg/L un poco mayor comparada con la primera donde no existió aireación y en el cual se observa que hubo un consumo mayor a partir de las 8 h hasta las 15 h manteniéndose constante hasta las 24 h, no hubo un gasto total, si no parcial de sustrato.

De acuerdo a la cinética realizada con 0.47 vvm se observó que la velocidad de consumo fue de la mayor registrada se obtuvo un valor de 455 mg/l en la cual se observó un consumo constante y casi total, desde la 1h hasta el término y consumo de sustrato a las 24 h.



En esta última cinética con aireación de 0.5 vvm no se observa un consumo de sustrato favorable, ya que se mantuvo constante desde el principio de la cinética manteniéndose así hasta casi 6 horas.

Se han reportado varios trabajos para producción de biosurfactantes con diferentes microorganismos. (Lima y col., 2009), trabajaron con la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando una aireación de 0.5 vvm, una agitación de 550 rpm y como fuente de carbono aceite de soya, obtuvieron una tensión superficial de 26 mN/m a las 48 h.

(Cardoso y col., 2010) trabajaron con la cepa *Yarrowia lipolytica*, utilizando una aireación de 1vvm y glucosa como fuente de carbono, obteniendo una tensión superficial de 40 mN/m en un tiempo de 48 h.

(Roldan y col., 2011) trabajaron con *Serratia marcescens*, utilizando una aireación de 0.15 vvm y una agitación de 100 rpm, con glucosa como fuente de carbono. Obteniendo una disminución de la tensión superficial de 31 mN/m a las 48 h.

(Hossein y col., 2010), trabajaron con la cepa *Bacillus subtilis* a una aireación de 1.5 vvm y sacarosa como fuente de carbono, ellos obtuvieron una tensión superficial de 30 mN/m.

En algunos casos los labores que anteriormente se han reportado trabajaron con aereaciones similares a las empleadas en esta obra, a pesar de ello en nuestro caso se obtuvieron tensiones más bajas y menor tiempo de fermentación. Por lo que podemos decir que los resultados obtenidos en nuestro trabajo en algunos casos son comparables y/o mejores con los reportados, además que la cepa IMP-BL es buena productora de biosurfactante y que las condiciones de operación estudiadas sí mejoraron el desarrollo de biosurfactante con este microorganismo, pues reducen el tiempo de duplicación comparado con el rendimiento de biosurfactante a nivel matraz.



La Tabla 12 muestra un resumen de las cinéticas a nivel reactor realizadas. Las cinéticas de 0.44 vvm a 0.5 vvm son las que mayor disminución se tensión superficial tuvieron en 6 horas, por lo que no hay una diferencia significativa entre ellas. La cinética a nivel matraz tuvo una reducción de tensión superficial parecida a las tres aereaciones utilizadas en reactor, sin embargo el tiempo en que se logró esta tensión fue el triple que la que se alcanzó con reactor.

Tabla. 12.-Resumen de parámetros de cada una de las cinéticas

Cinética	Aireación		Tensión superficial (mN/m)	Unidades reducidas TS (mN/m)	Tiempo de reducción máxima de TS (h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)
	ml/min	vvm					
a	0	0	65	7	3	0.157	4.41
b	600	0.38	36.4	35.6	7	0.158	4.38
c	700	0.44	28.9	43.1	6	0.208	3.34
d	750	0.47	28.4	43.6	6	0.171	4.05
e	800	0.5	27.6	44.4	6	0.080	8.64
	Rpm						
Matraz	150		26	46	18	0.064	10.78



7.5.1.- Concentración micelar crítica (CMC) del producto obtenido a nivel reactor con la mejor aireación

El biosurfactante obtenido de las cinéticas en reactor reportaron una disminución en la tensión superficial de acuerdo a las diferentes aireaciones probadas, fue centrifugado para separar la biomasa. El sobrenadante con el biosurfactante disuelto se liofilizó como se explicó en la sección de materiales y métodos en la producción de biosurfactante a nivel matraz. Un ejemplo del producto obtenido en forma de polvo se muestra en la Figura 22.



Figura 22.-Biosurfactante crudo liofilizado a nivel reactor

El color de los liofilizados obtenidos mostró condiciones similares, siendo caracterizados como polvos finos de consistencia uniforme color blanquecino.

El objetivo de la liofilización del biosurfactante es su conservación, bajo condiciones ambientales. Lo más importante del método es que no altera la estructura fisicoquímica del producto y admite su conservación sin cadena de frío, ya que su bajo porcentaje de humedad permite obtener un producto con elevada estabilidad microbiológica.

Así mismo, el hecho de no requerir refrigeración facilita su distribución y almacenamiento. (Montoya Villafañe, 2008). Con el producto obtenido a nivel reactor se preparó una solución concentrada en el caso del producto obtenido del reactor de 0.47 vvm de aireación, a partir de esta concentración se realizaron diferentes diluciones a las cuales se les determinó la tensión superficial, obteniéndose el perfil que se muestra en la Figura 23.



En ésta Figura se observa que a medida que aumenta la concentración de biosurfactante la tensión superficial disminuye, obteniendo una CMC de 870 mg/L, es menor a la obtenida en matraz. Solo en la operación de este reactor a un flujo de aireación de 0.47 vvm, se obtuvo una CMC baja, en las otras cinéticas de reactor aunque se evaluó la CMC éstas fueron altas, por lo que solo se presenta la mejor.

Los valores altos de concentración micelar crítica obtenida en los otros reactores, se deben a que el producto se obtuvo como extracto crudo, donde todavía hay restos de medio de cultivo. Por lo que es necesario realizar estudios en cuanto al proceso de liofilización, para no alterar el producto y se obtengan las mismas tensiones superficiales producidas como sobrenadante a nivel reactor.

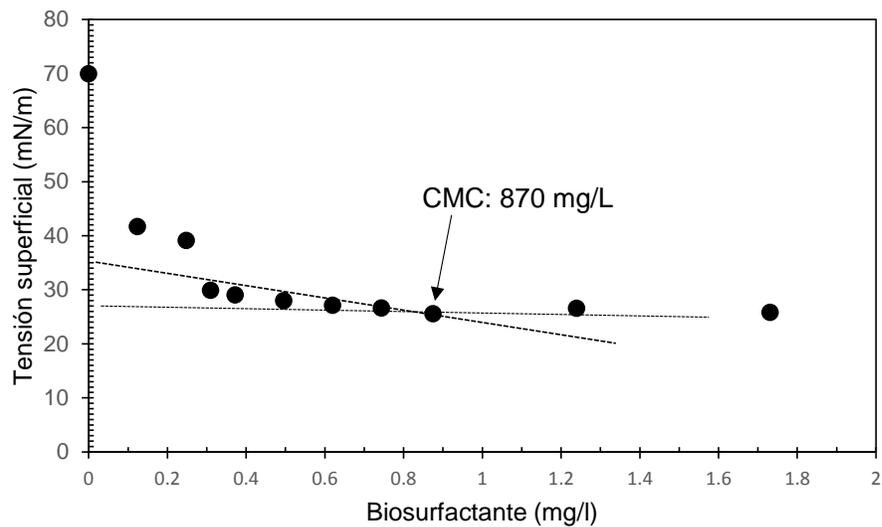


Figura 23.-Concentración micelar crítica obtenida en reactor con flujo de aireación de 0.47 vvm



7.6.- Rendimientos

La Figura 24 muestra los rendimientos obtenidos en tres cinéticas realizadas a nivel reactor y la cinética realizada a nivel matraz.

De acuerdo a los rendimientos obtenidos tanto de las cinéticas donde se observó un claro efecto sobre la tensión superficial, así como la cinética a nivel matraz. Se observa que aunque son valores similares, el mejor rendimiento a nivel reactor se obtuvo en la cinética a 0.47 vvm tal como se muestra en la Figura 23, concluyendo así, que la tensión superficial de éste reactor no fue la más baja, sí se conserva durante un tiempo mayor que las mediciones referentes a los reactores operados a 0.44 y 0.5 vvm.

Sin embargo también se puede observar que en el caso de matraz el rendimiento es mayor respecto al obtenido a nivel reactor, por lo cual se sugiere investigar los efectos que tendría el escalamiento del proceso a otras condiciones de operación o incluso ante una configuración geométrica distinta.

Cabe señalar que los rendimientos mostrados corresponden a la adquisición de extracto crudo. Se recomendó identificar la cantidad real de biosurfactante presente en la muestra obtenida, debido a que el sobrenadante adquirido estaba acompañado son restos moleculares propios del metabolismo bacteriano y de medio de cultivo (*Yañez Ocampo y Col 2013*).

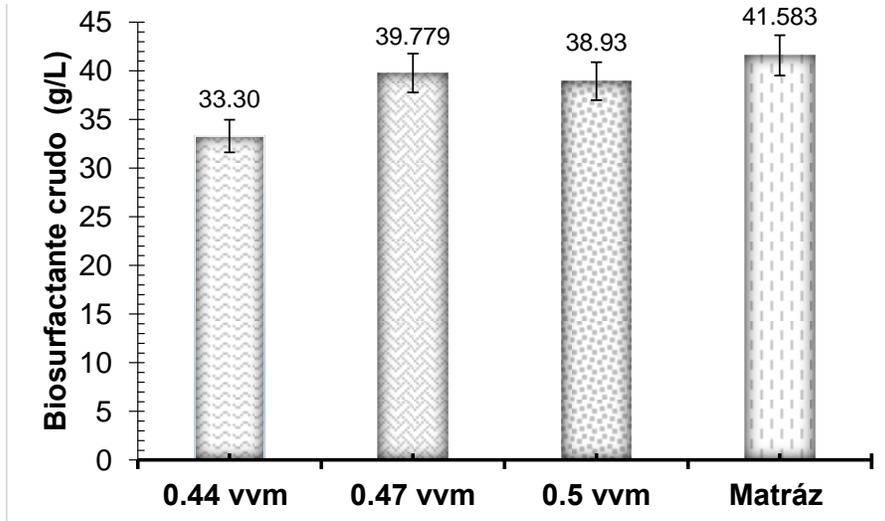


Figura 24.-Rendimientos de cinéticas que presentaron disminución de tensión superficial en reactor y matraz

7.8.-Comportamiento del reactor con los mejores parámetros.

Considerando el mejor rendimiento (0.47vvm) en la recuperación de biosurfactante, así como mayor estabilidad en cuanto a los valores correspondientes a la medición de la tensión superficial y a la determinación de CMC, en la Figura 25, se examinó el comportamiento de los parámetros monitoreados a nivel reactor (pH, temperatura, oxígeno disuelto) durante la cinética de crecimiento de la cepa IMP-BL en reactor tipo tanque agitado.

Como se explicó anteriormente la disminución de la tensión superficial fue de 28.4 mN/m a las 6 h. En esta Figura se observa la lenta disminución del pH, manejando un rango de pH 7 al inicio de la cinética y finalizando con un pH ligeramente ácido de 6. En lo referente a la temperatura, ésta se mantuvo constante y por lo que no varió de 40°C.

Se observa el consumo de oxígeno disuelto desde el inicio de la cinética y su valor es casi cero a partir de la mayor disminución de la tensión superficial (6 h). En este punto se tendrían que realizar estudios donde se mantuviera la concentración de oxígeno inicial para ver el efecto en cuanto a la disminución de la TS y el crecimiento microbiano.

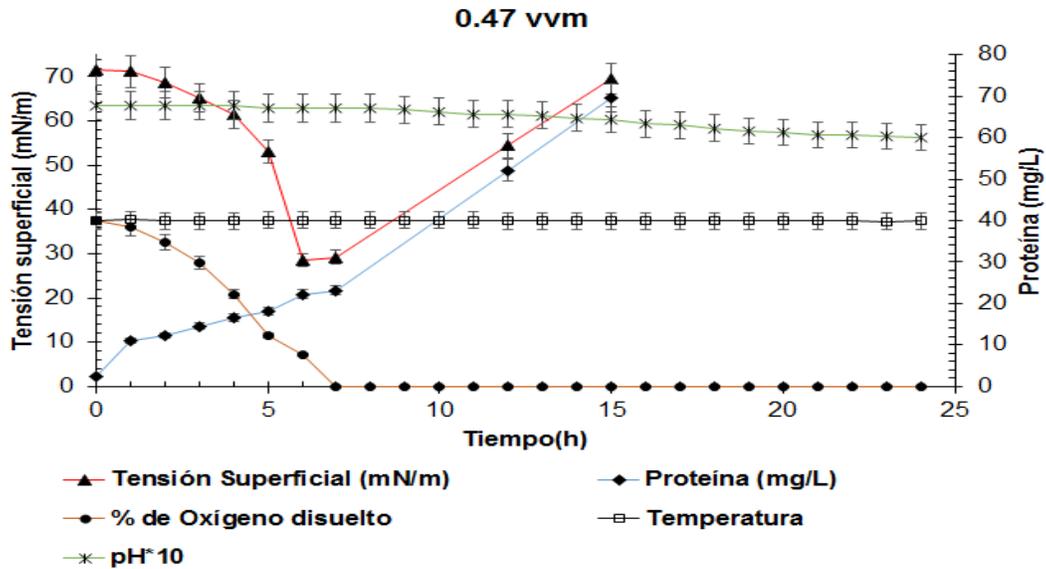


Figura 25.-Parámetros cinéticos del reactor con mejor rendimiento

7.9.-Efecto del Biosurfactante sobre aceites modelo, medido como tensión interfacial.

El efecto del biosurfactante obtenido a nivel matraz y en reactor a las mejores condiciones de operación, fue evaluado en cuanto a la reducción de la tensión interfacial entre el agua y diferentes aceites modelo: Hexano, hexadecano, diésel, queroseno y heptano. La figura 26 muestra los resultados obtenidos.

La tensión interfacial agua y los aceites modelo se encuentra en un rango de 14 a 32 mN/m, siendo el valor más bajo para la mezcla agua/queroseno y el valor más grande para la mezcla agua/Hexano.

En el caso del biosurfactante obtenido a nivel matraz, los valores de tensión interfacial se encuentran en un rango de 1 a 6, siendo el valor más pequeño para la mezcla biosurfactante/hexadecano y valor más grande para la mezcla biosurfactante/queroseno.



Con el biosurfactante obtenido de reactor se obtuvieron valores entre 3 a 19 mN/m, siendo el valor más bajo para el heptano y el más alto para el hexano.

En general la menor disminución de tensión interfacial con los aceites modelo, se obtuvo con el biosurfactante producido a nivel matraz. Con el queroseno la menor disminución de La TI fue con el biosurfactante producido a nivel reactor.

En este caso es necesario realizar mayores estudios para eficientar la extracción del biosurfactante y el rendimiento del mismo, así como la conservación de la tensión superficial, ya que como se comentó anteriormente, el proceso de extracción del biosurfactante hace que pierda la TS evaluada en el sobrenadante.

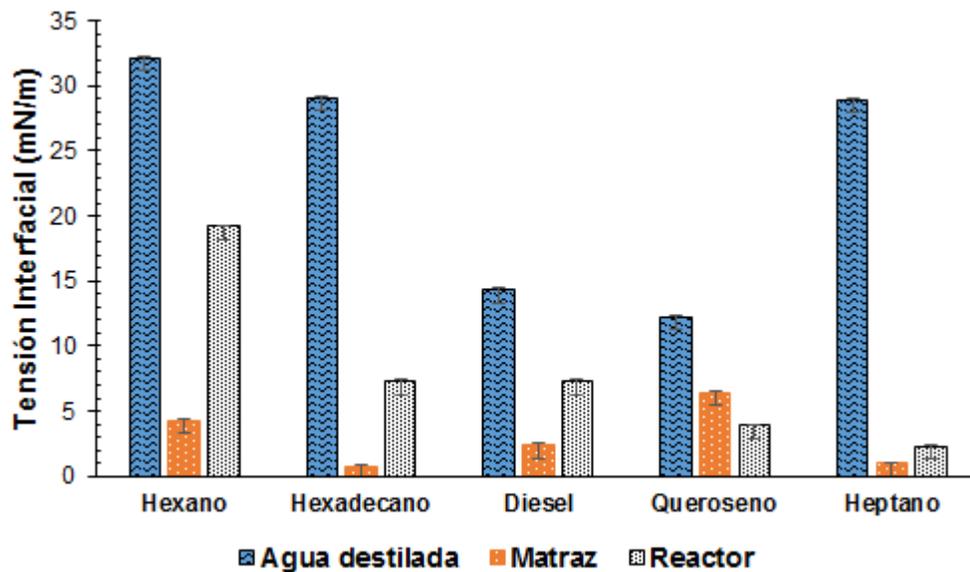


Figura 26.-Efecto del biosurfactante en aceites modelo medido como disminución de tensión interfacial a nivel matraz y reactor.



8. CONCLUSIONES

- La cepa IMP-BL es buena productora de biosurfactante.
- La producción de biosurfactante a nivel matraz se realizó de forma exitosa, teniendo una tensión superficial de 26mN/m a las 18 h y obteniéndose el rendimiento más alto en la producción de extracto crudo, con un valor de 41.583 g/L.
- Se observó que la estabilidad del biosurfactante sin liofilizar producido a nivel matraz, es mejor que el biosurfactante liofilizado, esto de acuerdo a la CMC determinadas.
- La producción del biosurfactante a nivel matraz es más estable que a nivel reactor, de acuerdo a los resultados obtenidos de CMC.
- Se logró el objetivo planteado debido a que mejor condición de aireación obtenida fue de 0.47 vvm para la producción de biosurfactante a nivel reactor a una temperatura de 40 °C, y una agitación constante de 150rpm. Teniéndose una tensión superficial de 28.4 mN/m, un rendimiento de 39.779 g/L en la obtención de biosurfactante.
- El biosurfactante obtenido tanto a nivel matraz como a nivel reactor, presentó un efecto importante en la disminución de la tensión interfacial de aceites modelo.
- El bioproducto obtenido a partir de la cepa IMP-BL tiene buen potencial para ser utilizado en la recuperación de hidrocarburos.
- La dextrosa es una buena fuente de carbono favorece para la producción de biosurfactante a partir de la cepa IMP-BL. Sin embargo, la CMC es muy baja por lo que se tienen que realizar más estudios para aumentar la CMC.



9.-BIBLIOGRAFIA

1. Adamczak M., Bednarski W. (2000). Influence of medium composition and aeration on the synthesis of Biosurfactans produced by *Candida Antarctica*. Institute of Food Biotechnology 1:10-718
2. Amani H., Sarrafzadeh H., Haghghi M., Reza M. (2010). Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, Petroleum Science and Engineering. Vol:75:209-214.
3. Anyanwu C., Obi S., Okolo B. (2010) Production of surface active by *Serratia marcescens* NSK-1 Isolated from petroleum contaminated. Our nature. Vol.:8: 1-11.
4. Bagheri T., S. M. (2009). An Efficient Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, Isolated from Oil Excavation Area in South of Iran. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. pag 1-11.
5. Banat IM., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., Smyth T. J., Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(2): 427-444.
6. Banat, I. R. (2000). potential commercial applications of microbial surfactants. appl. Microbiol. Biotechnol.
7. Banat, IM., (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants Biotechnology Letters.
8. Benincasa M., Contiero J., Manresa M. A., Moraes I. O. (2002). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. Journal of Food Engineering. 54: 283-288. biosurfactant production by *pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnology progress. 21, 1562-1566.
9. Cardoso F. G., Fonseca A.P.F., Nele M., Zarur C.M.A. (2010). Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1-8.



10. Chandran P. Das N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *trichosporon adahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(12): 6942-6953
11. Cooper y Goldenberg (1987) Surface-active Agents from two bacillus species .deparment of chemical engieneering, Mc Gill University,, Montreal Quebec,H3A 2A7 Canadá.
12. Desai, J. B. (1997). Microbial production of surfatants and their comercial potential, *Microbiol. Microbiol.Mol.Biol.rev.*61, 47-67.
13. Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Rahmat Zohra, R., Naveed Siddiqui, N., & Ul Qader, S. A. (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 691-697.
14. Gudiña, E. J. (2010). Isolation an funtional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surface Biointerfaces*, 298-304
15. Guerra Santos, L. (1986). Dependence of *Pseudomonas Aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and enviroment factors. *En Applied Microbiology*. 443-448
16. Guha S., J. P. (1996). Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Enviro.Sci.technol.*30 (2).
17. Guilmanov V., B. A. (2002). *Oxige rate andn transfer rate and sophorose lipid production by Candida bambicola. Biotechnology and Bioingeneering.* 77.
18. Habba E., Espuny M. J., Busquets M., Manresa A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal Applied Microbiology*, 88: 379-387.



19. Hossein y col., (2010). Scale Up Application of Biosurfactant from bacillus subtilis in enhanced Oil Recovery. 510-523
20. Javaheri D., J. E. (1985). Anaerobic production of a biosurfactant by Bacillus licheniformis JF-2. En E. M. 50.
21. Joshi, S. J., Geeta, S., Yadav, S., & Desai, A. J. (2013). Optimization of Bench-Scale Production of Biosurfactant by Bacillus licheniformis R2. Elsevier, 232-236.
22. Laura J. Raiger Lustman, N. I. (2009) Los biosurfactantes y la industria petrolera. Química viva, pag.3-16.
23. Lima y col.(2009) Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa Grown in Residual Soybean Oil. Applied Biochemistry and Biotechnology.
24. Madigan, M. T., & Martinko J., P. J. (2004). Brock biology of microorganisms.
25. Makkar, R. (2002). An Update on the use unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications. Applied Microbiology and biotechnology, 428.434.
26. Matin, A (1978): Organic nutrition of chemolithotropic bacteria .Ann. rev microbiol.32:433-468.
27. Montoya Villafañe, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2da edición. Medellín: Universidad de Antioquía.
28. Mulligan C.N ., G. B. (1984). Factor influencing the economics of biosurfactant. In:Kosaric N.(ed). biosurfactant: production, properties and application. New York: Marcel Dekker Inc.
29. Mulligan C.N., Cooper D.G., Neufeld R.J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. Journal of fermentation technology, 62(4): 311-314.



30. Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., Haddad, R., Goncalves, L.A.G., Eberlin, M.N., Contiero, J. (2005). oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactor: Effect of oil-to-glucosa ratio. *Biochemical Engineering Journal* Vol: 49: 185-191.
31. Pansiripat S., Pornsunthornawee O., Rujiravanit R., Kitiyanan B., Somboonthanate P., Chavadej S. (2010). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactor: Effect of oil-to-glucosa ratio. *Biochemical Engineering Journal* Vol: 49: 185-191.
 - a. *Pseudozyma aphidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (5): 607–613.
32. Rau, U., L. A. Nguyen et al. 2005. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids
33. Roldán T, Martínez., Peñasco I., Castorena G. Reyes J., Mayol M., Olguín P. (2011). Evaluation of Effect of nutrient ratio on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a box- Behnken desing. *Colloids and B: Biointerfaces* Vol.86:384-389.
34. Salager, Jean-Louis, (1992). el mundo de los surfactantes. facultad de Ingeniería Química.
35. Salamanca, G., Luna, V., & Gutierrez, J. (2003). Valoración de la degradación de un inhibidor de hidratación de arcillas, empleado en la perforación de pozos de petróleo, por *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri*. *Memorias IV Congreso Internacional de Microbiología Ambiental.* , 15-18.
36. Sanpietro Robert Marta ., M. E., & Manresa M.A., G. J. (1991). Optimización y producción de tensoactivos por *pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Conferencias Superiores de Investigaciones Científicas* 42, 1-7.
37. Santos, B. F., Ponezi, A. N., & Fileti, A. M. (2014). Strategy of Using Waste for Biosurfactant Production Through Fermentation by *Bacillus Subtilis*. *The Italian Association of Chemical Engineering* , 727-732.



38. Shavandi Mahmoud., M. (1997). Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain Ta6. En *colloids and surfaces B: biointerfaces* (págs. 477-482).
39. Suryanti V.; Hastuti S.; Wahyuningsih T.D.; Mundasir, Muliawati D. I. (2009) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* using soybean oil as substrate. *Journal Chemistry*. Vol: 9 (1):107-112.
40. Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2006, *Biotechnol. Adv.*, 24, 604.
41. Yañez-Ocampo, G., y Wong-Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales.
42. Yuzhuo, L. (2008). Microelectronic applications of chemical mechanical planarization.
43. Zinjarde S.S., Pant A. (2002). Emulsifier from tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*. 42: 67-73.

10.-Hemerografía:

44. *Biociencia*. (2012). <https://www.blogger.com/profile/0260110460143484723>.



11.-ANEXOS

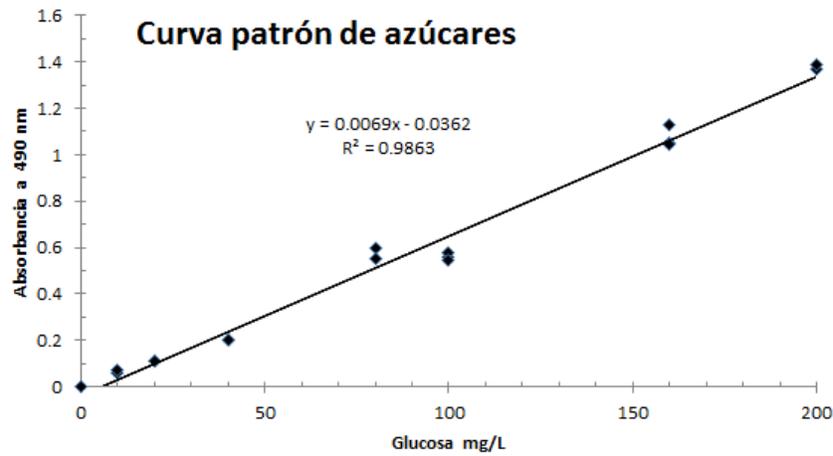


Figura 27.-Curva patrón de azúcares

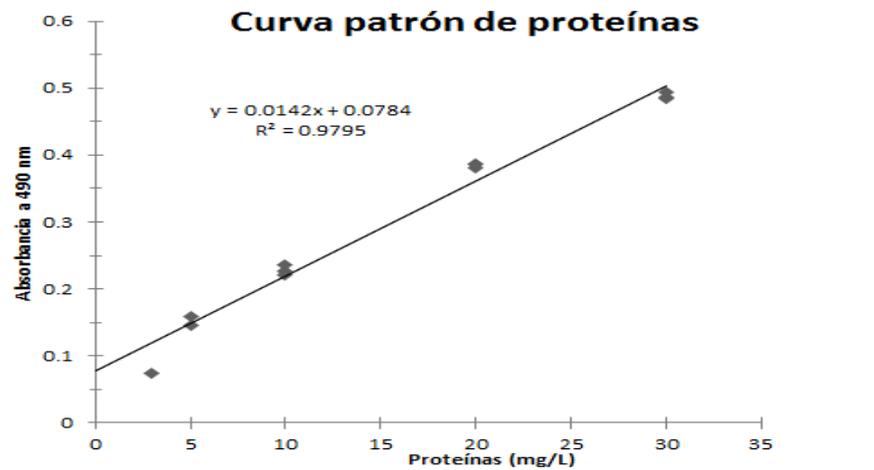


Figura 28.-Curva patrón de proteínas