

**“APROVECHAMIENTO DE ACEITE GASTADO DE COCINA  
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE A NIVEL  
REACTOR”**

**Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias e Ingeniería  
Ambientales.**

**Presenta:**

**I.Q Landa Faz Anbu**

**Asesora externa: Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo - IMP**

**Asesora interna: Dra. Violeta Múgica Álvarez – UAM-A**

**México, D.F**

Este trabajo fue realizado dentro de las actividades de la Línea de Investigación Recuperación Mejorada de Hidrocarburos Vía Microbiana, que pertenece a la Gerencia de Ingeniería de Recuperación Adicional de Hidrocarburos, en las instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la dirección de la Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo y co-dirección de la Dra. Violeta Múgica Álvarez.

## Nomenclatura

AE	Actividad emulsificante
BS	Biosurfactante
ANV	Aceite nuevo de cocina
AGC	Aceite gastado de cocina
CMC	Concentración micelar crítica
DMC	Dilución micelar crítica
DO	Densidad óptica
TIF	Tensión interfacial
TS	Tensión superficial
vvm	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo
%E24	Porcentaje de actividad emulsificante a las 24 h
C / N	Relación Carbono / Nitrógeno
Ug	Velocidad superficial de gas (cm/s) en reactores airlift
$\mu$	Velocidad de crecimiento
$t_d$	tiempo de duplicación

## **Agradecimientos**

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mi grado de estudio.

Al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) en especial al Área de Biotecnología por permitirme utilizar las instalaciones para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Azcapotzalco por abrirme nuevamente las puertas del conocimiento.

A la Doctora Teresa Roldán por compartirme sus conocimientos y brindarme su confianza, apoyo, amistad y estar siempre al pendiente en el momento que yo la necesitaré, sin importar el día y la hora.

A la Doctora Patricia Olguín por su apoyo en el transcurso de mi estancia ya que pese a no ser mi asesora siempre me brindo su ayuda cuando la necesite.

A la Doctora Gladys Castorena, ya que no solamente me brindó su apoyo de forma práctica, sino que también con sus conocimientos y experiencia enriqueció la escritura del presente trabajo.

A la Doctora Violeta Múgica por despertar aún más mi interés en la temática ambiental con su entusiasmo y apoyo incondicional para desarrollar mis proyectos, alentándome a seguir adelante confiando siempre en mí.

A la Doctora Mónica Salazar por ser una excelente persona conmigo tanto en lo personal como lo académico y compartir su conocimiento para mejorar la escritura de este trabajo.

Al grupo de maestros que forman parte del posgrado, por transmitirme sus experiencias y fomentarme a seguir adelante.

A los UAMigos, los microamigos y anexados por estar conmigo aún en momentos de canto e histeria.

A mis padres que siempre me han apoyado y han fomentado mi formación científica desde que era una pequeña proporcionándome lo necesario para tener mi laboratorio de “Dexter” hasta ahorita y también por acompañarme en todo momento, estando conmigo cuando he querido rendirme.

A mi amor (Walter) que ha estado siempre a mi lado, alentándome a seguir y apoyándome siempre así implicará ir al fin del mundo.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	xiv
<b>Abstract</b> .....	xvii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Biosurfactantes .....	2
1.2. Ventajas de los biosurfactantes .....	2
1.3 Factores que afectan la producción de biosurfactantes .....	3
1.3.2 Otros requerimientos nutricionales para la producción de biosurfactante ...	4
1.3.3 Condiciones de crecimiento .....	5
1.4 Producción de BS a nivel reactor .....	6
1.4.1 Reactores airlift .....	6
<b>2. Antecedentes</b> .....	9
<b>3. Justificación</b> .....	14
<b>4. Hipótesis</b> .....	15
<b>5. Objetivos</b> .....	15
5.1 Objetivo General .....	15
5.2 Objetivos específicos .....	15
<b>6. Estrategia experimental</b> .....	17
7.1 Microorganismo.....	18
7.2 Reactivación del microorganismo .....	18
7.3 Caracterización macroscópica y microscópica .....	18
7.4 Evaluación preliminar del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite nuevo de cocina .....	19
7.5 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite nuevo de cocina.....	21
7.6 Técnicas analíticas .....	21
7.6.1 Procesamiento de la muestra.....	21
7.6.2 Dispersión de aceite.....	22
7.6.3 Tensión superficial .....	22
7.6.4 Actividad emulsificante (E24%).....	23
7.6.5 Tensión interfacial .....	23

7.7 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con un aceite gastado de cocina como fuente de carbono .....	24
7.8 Evaluación de diferentes parámetros para la producción de BS.....	24
7.9 Validación del medio de cultivo .....	26
7.9.1 Concentración micelar crítica (CMC).....	27
7.10 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina como fuente de carbono .....	27
7.11 Evaluación de la producción de biosurfactante en reactor airlift .....	28
7.12 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift .....	30
7.13 Cuantificación del sustrato residual.....	31
7.14 Estabilidad del biosurfactante .....	32
7.14.1 Estabilidad al pH .....	32
7.14.2 Estabilidad a la salinidad.....	32
7.14.3 Estabilidad a la temperatura.....	33
7.15 Purificación parcial del biosurfactante y rendimiento .....	33
<b>8. Resultados y discusión.....</b>	<b>34</b>
8.1 Caracterización de la cepa IMP-P.....	34
8.2 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante .....	37
8.3 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz con aceite nuevo de cocina .....	38
8.4 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina.....	42
8.5 Efecto de diferentes parámetros sobre la producción de biosurfactante utilizando aceite gastado de cocina como sustrato .....	44
8.5.1 Validación del diseño de experimentos.....	50
8.6 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz con aceite gastado de cocina .....	53
8.7 Efecto de la aireación sobre la producción de BS en un reactor airlift .....	57
8.8 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato .....	60
8.9 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift con aceite gastado de cocina como sustrato .....	64

8.11 Evaluación de la estabilidad del BS .....	69
8.12 Purificación parcial del biosurfactante .....	73
8.13 Rendimiento del proceso .....	76
8.14 Análisis económico de la producción de biosurfactante en reactor airlift a escala laboratorio.....	77
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>80</b>
<b>10. Perspectivas a futuro .....</b>	<b>82</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>83</b>



## Índice de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Microorganismos productores de biosurfactante en diferentes sustratos como fuente de carbono. ....	10
<b>Tabla 2.2.</b> Microorganismos productores de biosurfactantes utilizando sustratos residuales.....	11
<b>Tabla 2.3.</b> Producción de BS a nivel reactor.....	12
<b>Tabla 7.1</b> Medio de cultivo para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.....	20
<b>Tabla 7.2</b> Composición de la solución de elementos traza .....	20
<b>Tabla 7.3.</b> Diseño experimental Taguchi L9 para evaluar el efecto de diferentes parámetros en la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.....	25
<b>Tabla 7.4.</b> Tratamientos adicionales para evaluar el efecto de diferentes parámetros en la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.....	26
<b>Tabla 7.5.</b> Características y condiciones operacionales del reactor airlift.....	29
<b>Tabla 8.1.</b> Caracterización macroscópica de la cepa IMP-P cultivada en agar nutritivo a 30° C.....	35
<b>Tabla 8.2.</b> Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.....	37
<b>Tabla 8.3.</b> Evaluación de la actividad emulsificante y tensión interfacial que produce el biosurfactante generado con la cepa IMP-P.....	41
<b>Tabla 8.4.</b> Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, utilizando un sustrato residual (aceite gastado de cocina).....	43
<b>Tabla 8.5.</b> Resultados del diseño de experimentos Taguchi L9.....	44
<b>Tabla 8.6.</b> Evaluación de la actividad tensoactiva en lo tratamientos para la optimización y validación del medio y condiciones de cultivo de la cepa IMP-P.....	51
<b>Tabla 8.7.</b> Evaluación de la tensión superficial en diferentes tratamientos para la optimización del medio de cultivo de la cepa IMP-P .....	56
<b>Tabla 8.8.</b> Efecto de la aireación sobre la tensión superficial del biosurfactante obtenido en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato .....	58
<b>Tabla 8.9.</b> Efecto de la aireación sobre la dispersión de aceite del biosurfactante obtenido en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato.....	59

<b>Tabla 8.10.</b> Evaluación de la cantidad de producto crudo producido en reactor airlift a diferentes Ug's y utilizando aceite nuevo de cocina como sustrato. ....	59
<b>Tabla 8.11.</b> Cuantificación de producto crudo con 3 y 4 Ug's y aceite de soya como fuente de carbono. ....	63
<b>Tabla 8.12.</b> Evaluación del sobrenadante y producto crudo con biosurfactante provenientes del reactor airlift con AGC como sustrato y 4 Ug.....	67
<b>Tabla 8.13.</b> Parámetros tensoactivos de surfactantes producidos por microorganismos y de origen químico.....	75
<b>Tabla 8.14.</b> Análisis económico para la producción de BS utilizando sales grado reactivo .....	79
<b>Tabla 8.15.</b> Análisis económico para la producción de BS utilizando sales grado industrial.....	79

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> Diagrama general de un reactor airlift de circulación externa.....	7
<b>Figura 1.2</b> Diagrama general de un reactor airlift de circulación interna.....	8
<b>Figura 6.1</b> Estrategia experimental para evaluar la producción de biosurfactante con un microorganismo.....	17
<b>Figura 7.1</b> Diagrama del reactor airlift.....	28
<b>Figura 7.2</b> Reactor airlift con sistema de control y recolección de espuma.....	30
<b>Figura 8.1</b> Evaluación macroscópica de la cepa IMP-P cultivada en medio sólido con caldo nutritivo a 30 °C .....	34
<b>Figura 8.2</b> Observación microscópica de la cepa IMP-P, con tinción de Gram y a 100x cultivada en caldo nutritivo a 30° C.....	36
<b>Figura 8.3</b> Observación microscópica de la cepa IMP-P cultivada en medio mineral con ANC como sustrato. A) Tinción de Gram y B) En fresco con microscopio de contraste de fases, ambos con el objetivo de 100x.....	36
<b>Figura 8.4</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la determinación de proteína y tensión superficial, cultivada con ANC como fuente de carbono. ....	39
<b>Figura 8.5</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, mediante la determinación de proteína y dispersión de aceite, cultivada con ANC como fuente de carbono. ....	40
<b>Figura 8.6</b> Observación microscópica de la cepa IMP-P cultivada en aceite gastado de cocina a 30° C. Observación en fresco con microscopio de contraste de fases, con el objetivo de 100x. ....	43
<b>Figura 8.7</b> Efecto de las variables independientes sobre la tensión superficial: A) 48 h y B) 72 h, y sobre la dispersión de aceite: C) 48 h y D) 72 h. AGC: aceite gastado de cocina. ....	48
<b>Figura 8.8</b> Análisis de superficie de respuesta del efecto de la concentración de inóculo y la concentración de aceite a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite.....	49

<b>Figura 8.9</b> Análisis de superficie de respuesta del efecto de la agitación y concentración de inóculo a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite. ....	49
<b>Figura 8.10</b> Análisis de superficie de respuesta del efecto de la concentración de aceite y la agitación a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite.....	50
<b>Figura 8.11</b> Evaluación de la tensión superficial con el producto crudo (biosurfactante) obtenido con el tratamiento 6 a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial. ....	52
<b>Figura 8.12</b> Evaluación de la tensión superficial con el producto crudo (biosurfactante) obtenido con el tratamiento 8 a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial.....	53
<b>Figura 8.13</b> Reacciones de oxidación del AGC .....	54
<b>Figura 8.15</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono. ....	55
<b>Figura 8.16</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono. ....	56
<b>Figura 8.17</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 3 Ug.....	61
<b>Figura 8.18</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 4 Ug.....	62
<b>Figura 8.19</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 3 Ug.....	62
<b>Figura 8.20</b> Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 4 Ug.....	63

<b>Figura 8.21</b> Evaluación de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite de gastado de cocina como sustrato y 4 Ug.....	65
<b>Figura 8.22</b> Evaluación de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite gastado de cocina como sustrato y 4 Ug.....	66
<b>Figura 8.23</b> Evaluación de la tensión superficial y CMC del producto crudo cosechado del reactor airlift con AGC como sustrato y a 4 Ug a diferentes tiempos. ....	68
<b>Figura 8.24</b> Evaluación del sustrato (aceite gastado de cocina) durante el cultivo de la cepa IMP-P en reactor airlift. ....	69
<b>Figura 8.25</b> Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes temperaturas .....	71
<b>Figura 8.26</b> Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes salinidades .....	72
<b>Figura 8.27</b> Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes valores de pH .....	72
<b>Figura 8.28</b> Evaluación de la tensión superficial con el producto parcialmente purificado (biosurfactante) de la cepa IMP-P a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial .....	74

## Resumen

Los aceites vegetales son productos básicos en la vida humana, su principal uso es en la preparación de alimentos. Después de ser usados, sus desechos no son depositados de forma correcta contaminando cuerpos de agua. Una de las alternativas de utilización de estos residuos es la producción de biosurfactantes (BS) con microorganismos. Los cuales a su vez pueden tener aplicaciones en varias industrias entre ellas la farmacéutica, cosmética, alimenticia y petrolera.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de un aceite gastado de cocina (AGC) como fuente de carbono para la producción de BS mediante la cepa IMP-P a nivel matraz y posteriormente a nivel reactor.

El microorganismo utilizado en este trabajo fue la cepa IMP-P que pertenece al género *Pseudomonas*, proveniente de una colección microbiana.

En el desarrollo de este trabajo, primero se llevó a cabo la evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-P a nivel matraz y utilizando un aceite vegetal denominado aceite nuevo de cocina (ANC) correspondiente a aceite de soya. La producción de BS se evaluó mediante la prueba de dispersión de aceite (DA) y tensión superficial (TS). Durante esta evaluación, el BS producido por la cepa IMP-P logró una dispersión de aceite de 10 cm y disminuyó la TS de 59 a 29 mN/m desde las 24 h de cultivo. Estos resultados indicaron la capacidad productora de BS con la cepa IMP-P.

Después, se realizó una evaluación preliminar de la producción de BS a nivel matraz, pero utilizando AGC como sustrato, obteniendo una TS de 29 mN/m, pero hasta las 48 h a diferencia de 24 h con el ANC. Además, en los cultivos con AGC se observó la presencia de carga microbiana proveniente de este sustrato, a pesar de que se esterilizó previamente varias veces en calor húmedo y microondas.

Se realizó un diseño de experimentos Taguchi L9 para evaluar la concentración de sustrato e inóculo, fuente de N y agitación a tres niveles cada variable, con la finalidad de optimizar la producción de BS. El mejor tratamiento fue aquel que tuvo los niveles altos de concentración de sustrato e inóculo (15 mL y 5%, respectivamente), agitación de 200 rpm y NaNO<sub>3</sub> como fuente de N<sub>2</sub>. Durante la producción de BS con este tratamiento, se observó una TS de 28 mN/m y halos de dispersión de aceite de 12 cm desde las 24 h.

Posteriormente, la producción fue escalada a nivel laboratorio en un reactor airlift de 3 L, utilizando primero ANC, para evaluar la aireación y determinar la más adecuada para la producción de BS. En esta etapa se observó que a mayor aireación, se obtenía mayor cantidad de BS como producto crudo. La mejor aireación fue de 3016 mL/min equivalente a 4 Ug's dando un rendimiento de 10.38 g/L, TS de 29 mN/m y dispersión de aceite de 11.5 cm desde las 24 h.

Con la aireación de 4 Ug se evaluó la producción de BS en reactor airlift con AGC como fuente de carbono, mostrando que también había producción de BS con disminución de la TS hasta 29 mN/m y dispersión de aceite de 12 cm desde las 24 h. El BS contenido en el sobrenadante tuvo una dilución micelar crítica (DMC) de 1:16 y una CMC de 1000 mg/L a las 41 h, tiempo en el que se observó la máxima cantidad de producto crudo (13.64 g/L), corroborando la posibilidad de usar estos residuos como fuente de carbono.

La evaluación del BS a diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH, mostró que es estable desde 20 hasta 120 °C, a pH de 6 a 10 y hasta 300 g/L de NaCl. Lo anterior indica que el biosurfactante producido por la cepa IMP-P es un bioproducto atractivo para su aplicación en diferentes áreas donde las condiciones son extremas.

Además, fue posible obtener un biosurfactante parcialmente purificado mediante extracciones con acetona. Este bioproducto dio una CMC de 500 mg/L DMC de 1:16 teniendo un costo para las materias primas de MXN \$30.92 / L.

El uso de aceites gastados de cocina para la producción de BS es una alternativa viable para la disposición de estos residuos, obteniendo un producto con valor agregado.



## **Abstract**

Vegetable oils (VO) are basic products in human life; their principal use are as food. After use, their waste aren't properly deposited contaminating the water. One application of this waste is the production of biosurfactant (BS) by microorganisms. BS are used in different industries: pharmaceutical, cosmetic, food and oil industry.

The aim of this study was to evaluated the use of a residual cooked oil as a carbon source for BS production by IMP-P strain first in flask and then in a reactor level.

The microorganism used in this study was IMP-P strain belonging *Pseudomonas sp.* from a microbial collection.

First was evaluated the growth and production of BS by IMP-P strain in flask using a vegetal oil name new cooking oil (NCO) corresponding soybean oil. Biosurfactant production evaluation was performed by determining oil dispersion test and surface tension (ST). During this evaluation, the BS produced by IMP-P strain produced 10 cm of oil dispersion and decreased the ST from 59 to 29 mN/m since 24 h. Both measurements demonstrated the BS production by IMP-P strain.

After the preliminary BS production in flask with waste cooking oil (WCO) as substrate was done, giving a ST of 29 mN/m but at 48 h. Also in cultures with WCO was observed another microorganisms from the substrate in spite of been sterilized several times with wet heat and microwave.

An experiment design Taguchi L9 was done in order to evaluated the substrate and inoculum concentration, N source and stirring at 3 levels. The best treatment has had high levels of inoculum and substrate concentration (15 mL and 5% respectively), 200 rpm stirring and NaNO<sub>3</sub> as a N source. During the BS production with this treatment a ST of 28 mN/m and oil dispersion halos of 12 cm was observed since 24 hours.

Then the BS production was done a reactor level in an airlift reactor of 3 L, using first NCO to evaluate the aeration rate. High aeration .produced more quantity of crude product. The best aeration rate was 3016 mL/min equivalent to 4 Ug giving a yield of 10.38 g/L, ST 29 mN/m and oil dispersion halos of 11.5 cm since the 24 h.

With 4 Ug aeration was evaluated the BS production in airlift reactor with WCO as a carbon source, showing that also produce BS with ST reduction until 29 mN/m and oil dispersion halos of 12 cm since the 24 h. The BS contained as a supernatant has a critical micelar dilution (CMD) of 1:16 and a critical micelar concentration (CMC) of 1000 mg/L at 41 h, at which time we obtained the maximum amount of crude product (13.64 g/L) confirming the possibility to use this waste as a carbon source.

The BS evaluation at different conditions of temperature, salinity and pH demonstrated that the product was stable from 20-120 °C, pH of 6-10 and 300 g/L of salt. This indicated that BS producing by IMP-P strain is a bio product that can be used in different areas where the condition are extreme.

A semi pure product was obtain with acetone. This product give a CMC of 500 mg/L a CMD of 1:16 and the cost of raw materials was MXN \$30.92 / L.

The use of WCO for the BS production is a viable option for disposition of this waste providing an added value product alternative.

## 1. Introducción

En 2007 la producción mundial promedio de aceites vegetales equivalía a 3.86 millones de toneladas (Rosillo *et al.*, 2009), lo cual representa una cantidad semejante de residuos cuyo tratamiento implica un alto costo (Raza *et al.*, 2007). El inventario de residuos del D.F. en 2012 (SEMARNAT, 2013) reportó que se habían recolectado 619,000 L de este tipo de residuos, a los que se le debía dar un tratamiento posterior. Sin embargo, de esta cantidad solamente fueron utilizados 110,240 L para producir biodiesel por una empresa mexicana encargada de la recolección y reciclaje de aceites vegetales usados. Por lo que quedaron aproximadamente 82% de estos residuos sin tratamiento, de los cuales su única posible aplicación es en los hornos de incineración por su alta capacidad calorífica.

Por otra parte también debe ser considerada la mala disposición de estos residuos, la cual llega a afectar los diferentes cuerpos de agua, tomando en cuenta que 1 L de aceite contamina 1000 L de agua (Guerrero *et al.*, 2011); además de implicar una problemática en las plantas de tratamiento de aguas residuales pues complica la homogenización del líquido dentro de los reactores.

La posibilidad de encontrar otro uso para este tipo de residuos resulta atractivo desde el punto de vista ambiental y económico pues se pueden obtener productos con valor agregado.

Una de las aplicaciones para estos residuos es la producción de biosurfactantes (BS), la cual se ha realizado con diferentes sustratos (De Lima *et al.*, 2009; Abbasi *et al.*, 2012; Ahmed y Hassan, 2012). Los BS son compuestos importante en varias industrias (cosmética, alimentos, farmacéutica, petrolera, entre otras).

## **1.1. Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas producidas por una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos; constituidas por péptidos, lipopéptidos, glicopéptidos, ácidos grasos y fosfolípidos, entre otros (Abalos *et al.*, 2002).

Los biosurfactantes son agentes tensoactivos que provocan un descenso significativo en la tensión superficial, por lo que pueden reemplazar fácilmente a sus análogos químicos. Estos compuestos tienen múltiples aplicaciones en la industria petrolera donde pueden ser utilizados para la extracción, transporte y mejoramiento del petróleo; además en la limpieza de tanques y en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y otros contaminantes (De Lima *et al.*, 2009).

Estos compuestos también tiene aplicaciones en otras áreas, como la medicina, donde en los últimos años han sido utilizados para el tratamiento de cáncer o como agentes fungicidas para el tratamiento de enfermedades provocadas por hongos (Witenburn y Martin, 2012). Algunas compañías como Ecover (que comercializa productos de limpieza) han empezado la promoción de productos hechos a base de biosurfactantes, resaltando sus beneficios con el medio ambiente.

## **1.2. Ventajas de los biosurfactantes**

Los biosurfactantes, al ser comparados con surfactantes químicos, presentan algunas ventajas como:

- **Biodegradabilidad:** Al ser inyectado para su aplicación en campo, los biosurfactantes pueden ser degradados por microorganismos propios del sistema (Pacwa *et al.*, 2011).

- **Baja toxicidad:** En un estudio realizado por el grupo de trabajo de Kanga *et al.* (1997) se demostró que el BS producido por *Rhodococcus sp.* 413 A fue 50% menos tóxico que el producido por el surfactante químico Tween 80.
- **Útil en diferentes industrias:** Los BS tienen aplicación en la industria petrolera, farmacéutica, cosmética y de alimentos entre otras (Abalos *et al.*, 2002)
- **Bajos costos de producción:** Varios autores han reportado la producción de BS a partir de fuentes de carbono económicas y/o residuales (Rahman *et al.*, 2002, Abbasi *et al.*, 2012; Ahmed y Hassan, 2012) lo que representa un ahorro en su producción.
- **Aplicables en condiciones extremas:** Se ha observado que los BS son estables y resistentes a condiciones extremas de temperatura, salinidad y pH (Makkar y Cameotra, 1998).

### **1.3 Factores que afectan la producción de biosurfactantes**

Los factores que afectan la producción de BS pueden ser: nutricionales (fuente de C y N, presencia de iones polivalentes) y condiciones de cultivo como temperatura, pH, salinidad, agitación y aireación (Amézcuca *et al.*, 2004).

#### **1.3.1. Fuente de carbono**

En la mayoría de los estudios relacionados con la producción de biosurfactantes a partir de microorganismos se han usado fuentes de carbono convencionales como glucosa, sacarosa y melaza (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Tahzibi *et al.*, 2004; Anyanwu *et al.*, 2010). Sin embargo, en los últimos años se han evaluado fuentes

oleaginosas como aceites vegetales tanto nuevos como gastados para la producción de biosurfactantes con microorganismos (Ahmed y Hassan, 2012).

A pesar de las ventajas antes citadas, los biosurfactantes todavía no compiten con los surfactantes químicos debido a sus costos de producción. En este sentido, se sabe que la fuente de carbono para producir BS puede representar hasta un 30% del costo total de producción (Bachmann *et al.*, 2014); por lo que, al utilizar residuos como fuente de carbono, cuyo costo es muy bajo, se puede disminuir el costo de producción de BS.

El uso de aceites residuales no implica solamente un costo de producción más bajo, sino que representa una alternativa a la problemática ambiental generada por la mala disposición de estos desechos, además de la obtención de un producto de alto valor agregado (De Lima *et al.*, 2009).

### **1.3.2 Otros requerimientos nutricionales para la producción de biosurfactante**

La fuente de carbono no es el único factor sobre el cual se debe tener especial cuidado al momento de su selección para la producción de biosurfactantes, además, se debe prestar especial atención en la fuente de nitrógeno, ya que ocupa un papel esencial en la síntesis de biosurfactantes (Xia *et al.*, 2013).

Reis *et al.* (2010) mencionan que la producción del biosurfactante del tipo ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* depende de bajas concentraciones de nitrógeno y por lo tanto altas relaciones C/N. También observaron que con relaciones C/N de 15 y utilizando glicerol como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, el microorganismo aumentaba la producción de ramnolípido.

Por su parte Xia *et al.* (2013) estudiaron también para *P. aeruginosa* el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno usando aceite de girasol como fuente de carbono, apreciando que la mejor fuente de nitrógeno era nitrato de sodio y al igual que Reis *et al.* (2010), concluyeron que lo mejor era tener altas relaciones C/N.

Wu *et al.* (2008) mencionan que el uso de fuentes orgánicas favorece el crecimiento del microorganismo, sin embargo inhibe la formación de glicolípidos.

Guerra-Santos *et al.*, (1986) observaron que la limitación de sales de Mg, K, Ca, Na y elementos traza para *P. aeruginosa* aumentaban la producción de BS.

Por otra lado se ha visto que la producción de surfactina por *Rhodococcus* puede ser estimulada por la adición de sales de hierro o manganeso al medio de cultivo (Mutalik *et al.*, 2008)

### **1.3.3 Condiciones de crecimiento**

Las condiciones de cultivo de los microorganismos como temperatura, pH, salinidad, agitación y disponibilidad de oxígeno, son factores que también están relacionados con la producción de biosurfactantes (Xia *et al.*, 2011).

En el caso de *P. aeruginosa*, el crecimiento y producción de biosurfactantes se ha realizado entre 30° y 37 °C (Abalos *et al.*; 2002; Raza *et al.*, 2007; Amani *et al.*, 2010).

El pH es un factor que también debe ser controlado, ya que un pH ácido o básico puede afectar la producción de BS. Se ha observado que la mejor producción de ramnolípidos con el género *Pseudomonas* se lleva a cabo con pH entre 6.0 y 6.5.

La aireación es otro parámetro importante a controlar en la producción de biosurfactantes; lo anterior dependerá del tipo de microorganismo utilizado, el tipo de agitación y la geometría del reactor utilizado. Un estudio realizado por Adamczak y Bendnarski (2010) evaluó diferentes flujos de aire y saturación de oxígeno para la producción de BS por *Candida antarctica*, encontrando los mejores resultados a 1000 mL/min y saturación de O<sub>2</sub> del 50 %. Para el caso de *Pseudomonas* se ha reportado que la mejor producción de biosurfactantes a nivel reactor tipo tanque agitado, se logra con un flujo de aire de 1650 mL/min y 550 rpm (De Lima *et al.*, 2009).

#### **1.4 Producción de BS a nivel reactor**

Como se ha mencionado en los puntos anteriores, la producción de BS es atractiva para su aplicación en diferentes áreas. Es por ello que se ha trabajado en la producción de biosurfactantes a nivel reactor a escala laboratorio, resaltando que la mayoría de los trabajos sobre producción de biosurfactantes se han realizado en reactores tipo tanque agitado (Mercadé *et al.*, 1993; Benincasa *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha incursionado en la producción de biosurfactantes en reactores airlift (Rosero *et al.*, 2002).

##### **1.4.1 Reactores airlift**

Un reactor airlift es un reactor neumático que es agitado por una fase de gas continua en forma de burbujas, se caracteriza por el suministro de energía para mantener homogeneidad en su interior mediante la expansión isotérmica de la fase gaseosa (aire) introducida (Lizardi *et al.*, 2012).

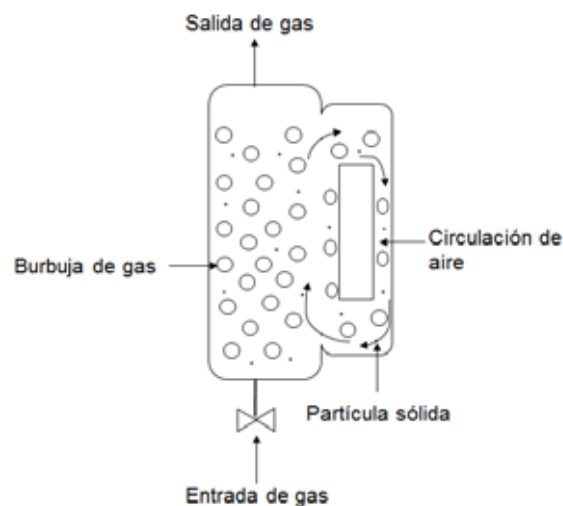
Este tipo de reactores se han aplicado en la producción de ácido láctico por hongos, en la degradación de compuestos de fenol mediante el uso de



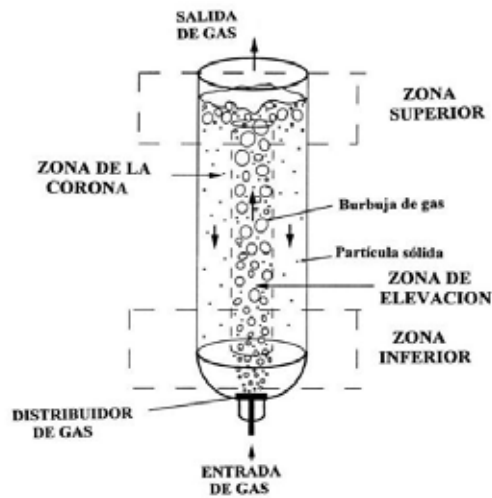
microorganismos, desulfuración del petróleo, tratamiento de aguas residuales, entre otras (Lizardi *et al.*, 2012).

Los reactores airlift pueden tener circulación interna o externa. En el caso de los reactores con circulación externa se tiene un brazo separado pero conectado en la parte superior del reactor por donde circula el gas (Figura 1.1), mientras que los reactores de circulación interna tienen un tubo concéntrico por el cual pasa el flujo de gas por todo el reactor (Figura 1.2). De manera general la transferencia del gas tiene cuatro zonas; la primera es en la que el gas entra y es conocida como fase de ascenso; en esta ocurre la mayor parte de la transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida. El líquido que circula entra en una zona de liberación de los gases funciona como un separador gas-líquido. El líquido libre de gas fluye entonces hacia la zona de descenso y viaja hacia el fondo de la columna, en donde completa el ciclo y reingresa a la zona de ascenso (Chisti-Young, 1987).

A nivel industrial los reactores con circulación interna son los más usuales (Díaz, 2011) ya que requieren de un espacio menor que los de circulación externa y cuentan con mayores opciones de arreglos, logrando altas velocidades de circulación sin necesidad de sistemas mecánicos auxiliares.



**Figura 1.1** Diagrama general de un reactor airlift de circulación externa.



**Figura 1.2** Diagrama general de un reactor airlift de circulación interna.

Los reactores airlift tienen la ventaja de mantener una mezcla homogénea, con lo que puede asegurarse que el reactor esté completamente mezclado sin causar daño celular (Merchuck, 2003); sobre todo cuando se trabaja con sustratos hidrofóbicos. Además, este tipo de reactores permiten mayor flujo de aire y representan un menor costo energético.

La mayor ventaja que presentan estos reactores sobre los tipo tanque agitado, es que al no tener una agitación por paletas se evitan los cambios morfológicos y metabólicos de las células, así como una reducción en el gasto de energía para proporcionar la agitación (Chisti y Jáuregui-Haza, 2002).

## 2. Antecedentes

Los biosurfactantes han adquirido gran interés por su aplicación en diferentes industrias y por sus diferentes ventajas. Sin embargo, se necesita producirlos a bajo costo, utilizando fuentes de carbono baratas o residuales, con altos rendimientos y efectividad de acción para su aplicación, de tal manera que sean competitivos con los surfactantes químicos.

Como se mencionó previamente existen reportes en donde se ha evaluado la producción de biosurfactantes con diferentes sustratos, entre ellos glucosa, melaza y sacarosa como fuentes de carbono convencionales (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Tahzibi *et al.*, 2004; Anyanwu *et al.*, 2010) y fuentes hidrófobas como diésel, glicerol, hidrocarburos y aceites (Raza *et al.*, 2007; Centeno *et al.*, 2010).

En la tabla 2.1 se muestran algunos de los microorganismos productores de biosurfactantes, utilizando diferentes sustratos comerciales; mientras que la tabla 2.2 muestra la producción de BS utilizando sustratos residuales.

Para la producción de biosurfactantes en reactor a escala laboratorio, la mayoría de los trabajos se han realizado en reactores tipo tanque agitado. Sin embargo la producción de biosurfactantes también se puede llevar a cabo en reactores airlift (Rosero *et al.*, 2002). En La tabla 2.3 se muestran algunos trabajos sobre la producción de BS a nivel reactor.

**Tabla 2.1.** Microorganismos productores de biosurfactante en diferentes sustratos como fuente de carbono.

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Condiciones de crecimiento</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	<b>Referencia</b>
<i>Serratia marcescens</i> <i>ST10</i>	Diferentes aceites vegetales (oliva, girasol, sésamo y maíz)	37°C, 150 rpm	TS 41 mN/m (%E24): 92 % (C / sésamo)	Ahmed y Hassan, 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>AT10</i>	Aceite de soya	30 °C, 150 rpm	TS 26.8 mN/m C.M.C 150 mg/L	Abalos <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>MA01</i>	Melaza, aceite de soya, extracto de malta, miel y semillas de frutas	30 °C, 150 rpm	TS 32.5 mN/m CMC 10.1 mg/L (C / A. de soya)	Abbasi <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i> <i>B30</i>	Glucosa, melaza, sacarosa, almidón.	40°C, 160 rpm	TS 26.6 mN/m TI 11.8 mN/m (C / glucosa)	Al-Wahabi <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	Sacarosa	37 °C, 150 rpm	TS 25 mN/m TI 2.5 mN/m	Amani <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sacarosa	37 °C, 150 rpm	TS 26 mN/m TI 5.3 mN/m	Amani <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterobacter cloacae</i>	Aceite de girasol	37 °C, 150 rpm	TI 2.7 mN/m	Sarafzadeh <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Dodecano	37 °C, 150 rpm	TI 15 mN/m	Sarafzadeh <i>et al.</i> , 2014

TS: tensión superficial, TI: tensión interfacial, %E24: % de actividad emulsificante a las 24 h, CMC: concentración micelar crítica

**Tabla 2.2.** Microorganismos productores de biosurfactantes utilizando sustratos residuales.

Microorganismo	Sustrato	Condiciones de crecimiento	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	Residuos destilería	30 °C, 150 rpm	TS 27 mN/m	Dubey <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Aceite quemado de oliva	30 °C, 150 rpm	TS 34 mN/m, (%E24): 53.4 %	Haba <i>et al.</i> , 2000
<i>Candida lipolytica</i> 0988	Residuos de aceite de soya	28 °C, 150 rpm	TS 25.3 mN/m, CMC 0.03 %	Rufino <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Aceite de soya usado (a)	30 °C, 200 rpm	(a) TS 26.92 mN/m, TI 1.25 mN/m, (%E24): 55.7 %	Nitschke <i>et al.</i> , 2005
	Aceite usado de maíz (b)		(b)TS 30.96 mN/m, TI 2.4 mN/m, (%E24): 20 %	
	Aceite usado de babasú (c)		(c)TS 30.08 mN/m, TI 16.15 mN/m, (%E24): 20 %	

TS: tensión superficial, TI: tensión interfacial, %E24: % de actividad emulsificante a las 24 h, CMC: concentración micelar crítica

**Tabla 2.3.** Producción de BS a nivel reactor.

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Condiciones de crecimiento</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pseudomonas sp</i>	Efluente de aceite de oliva	30 °C, Biofermentador de 2 L, 1000 rpm, 1 L/min	TS 30 mN/m (%E24): 75 %	Mercadé <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucosa	37 °C, Tanque agitado de 5 L, 2.25 L/min, 1500 rpm	TS 29 mN/m TI 0.25 mN/m	Guerra-Santos <i>et al.</i> , 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aceite vegetal	32 °C, Reactor Airlift de 3.5 L, 4 L aire/min		Rosero <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Residuo del aceite residual de refinería	30°C, Tanque agitado de 3 L, 3 L aire / min, 500 – 800 rpm	TS 32.9 mN/m	Benincasa <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	Aguas residuales de yuca	35 °C, Reactor batch de 40 L, 0.25 L/min /12 h y 0.42 L/min en adelante a 150 rpm	TS 27 mN/m CMC 11 mg/L	Barros <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	Efluente del proceso de papas	30 °C, Reactor Airlift de 6.5L, 1.5 L aire /min	TS 25 mN/m	Noah <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aceite de soya residual	30°C, Tanque agitado de 6 L, 1.65, 3.3 y 4.95 L/min 300, 550 y 800 rpm	TS 26 mN/m	De Lima <i>et al.</i> , 2009

TS: tensión superficial, TI: tensión interfacial

En el Instituto Mexicano del Petróleo se ha desarrollado y se sigue trabajando con la línea de investigación referente a microorganismos productores de biosurfactantes (Roldán *et al.*, 2011), donde se ha utilizado a la cepa IMP-P, que corresponde a una cepa del género *Pseudomonas* proveniente de una Colección Microbiana. La capacidad de producción de BS de este microorganismo ha sido evaluada a nivel matraz utilizando diferentes sustratos, entre ellos los aceites vegetales. El biosurfactante producido por este microorganismo fue capaz de reducir la tensión superficial e interfacial a 28 y 1 mN/m, respectivamente (Vargas, 2015) a nivel matraz con aceite de soya nuevo. Sin embargo, falta evaluar el comportamiento de dicha cepa con fuentes de carbono provenientes de residuos, así como el proceso de producción de BS a nivel reactor con la finalidad de aumentar la producción y reducir el tiempo de operación.

### **3. Justificación**

La cantidad de aceites gastados de cocina (AGC) ha ido aumentando en las últimas décadas y no se ha implementado a la par una política de disposición para estos residuos, siendo una situación cotidiana su derrame en la tarja, haciendo más difícil el tratamiento de las aguas residuales.

De los pocos litros que llegan a ser recolectados el uso más común son los biocombustibles, sin embargo este es un proceso poco rentable por los altos costos que maneja. Por ello en los últimos años se ha trabajado en la producción de BS utilizando AGC como sustrato.

Los costos de producción actuales de los BS, todavía no los hacen tan competitivos frente a los surfactantes sintéticos. Sin embargo, al utilizar el aceite vegetal gastado, como fuente de carbono y un reactor airlift para la producción de BS se busca abatir los costos de producción, aumentando la calidad, efectividad y cantidad del biosurfactante obtenido.

Lo anterior debido a que uno de los inconvenientes para la producción de BS está asociado a los altos costos que representan las materias primas, principalmente la fuente de carbono, la cual llega a representar hasta un 30% del costo de producción. Además, el uso de un reactor airlift no sólo representa un menor gasto energético, sino que garantiza que no habrá daño celular. De esta manera se obtendrá un proceso más rentable y eficiente y con la ventaja de la reutilización de un residuo para generar un producto con valor agregado, generando una alternativa a la problemática generada por estos residuos.



## **4. Hipótesis**

La producción de biosurfactantes con un aceite gastado de cocina se puede igualar a la de un aceite vegetal nuevo e inclusive incrementar variando parámetros como: la fuente de nitrógeno, concentración de sustrato e inóculo y agitación. La cantidad y calidad del producto puede verse mejorada en un reactor airlift a escala laboratorio manipulando la aireación.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar la producción de biosurfactante en un reactor airlift a escala laboratorio utilizando un aceite vegetal nuevo y gastado variando condiciones operacionales en función de la aireación.

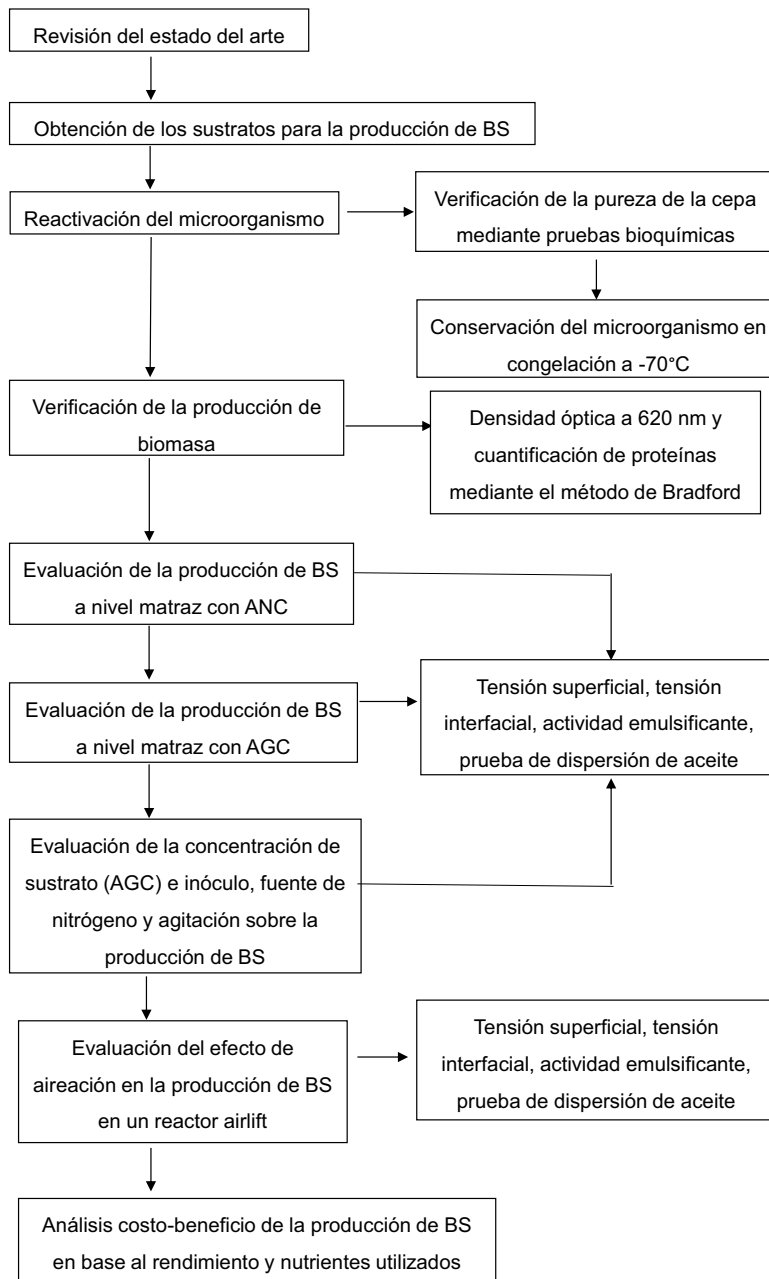
### **5.2 Objetivos específicos**

- Optimizar la producción de biosurfactante variando las siguientes condiciones de crecimiento: fuente de nitrógeno, concentración de sustrato e inóculo y agitación a nivel matraz.
- Realizar el escalamiento de la producción de biosurfactante a nivel reactor, tomando en cuenta las condiciones determinadas a nivel matraz.
- Realizar estudios de crecimiento y producción del biosurfactante con el microorganismo seleccionado a nivel reactor utilizando dos tipos de sustratos: aceite comercial (de tipo vegetal, sin usar) y aceite gastado (residual).

- Determinar las propiedades del biosurfactante producido, en cuanto a su actividad tensoactiva, concentración y dilución micelar crítica, así como su estabilidad en condiciones de pH, temperatura y salinidad a nivel reactor.
- Analizar de manera preliminar de los costos de producción del biosurfactante obtenido frente a los surfactantes químicos comercializados.

## 6. Estrategia experimental

En la figura 6.1 se presenta la estrategia experimental para comprobar la producción de biosurfactante con un microorganismo utilizando un aceite de cocina nuevo y otro gastado como fuentes de carbono.



**Figura 6.1** Estrategia experimental para evaluar la producción de biosurfactante con un microorganismo

## **7. Metodología**

### **7.1 Microorganismo**

El microorganismo que se utilizó en este trabajo fue la cepa IMP-P, que corresponde al género *Pseudomonas* proveniente de una colección microbiana. Este microorganismo ha sido reportado como potencial productor de biosurfactantes (Abbasi *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2013).

### **7.2 Reactivación del microorganismo**

La reactivación del microorganismo se realizó en medio líquido con caldo nutritivo, constituido por peptona (5 g/L) y extracto de levadura (3 g/L).

Los sistemas consistieron en matraces de 125 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo.

En la primera siembra, el inóculo fue a partir de la cepa IMP-P conservada en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  con glicerol. El cultivo se dejó incubando 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm. Con este cultivo se realizó una segunda resiembra a las 24 h, en la cual se tomó 1 mL del cultivo anterior y se pasó a un matraz con medio fresco. El mismo proceso se repitió a las 24 horas siguientes. Todos los sistemas fueron incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm.

### **7.3 Caracterización macroscópica y microscópica**

El microorganismo seleccionado se cultivó en cajas Petri con agar nutritivo constituido por: peptona (5 g/L), extracto de levadura (3 g/L) y agar (15 g/L).

A partir de este cultivo se observaron las colonias formadas, evaluando la forma, coloración, elevación y consistencia. Además, se caracterizó microscópicamente mediante tinción de Gram, observándose la preparación en un microscopio óptico marca Nikon modelo E-800. De igual manera se observó de forma directa en contraste de fases. En ambos casos, la observación se realizó con el objetivo de 100x.

Para verificar el género y especie del microorganismo se realizaron pruebas bioquímicas utilizando una prueba API 20E marca Biomérieux.

#### **7.4 Evaluación preliminar del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite nuevo de cocina**

La evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con el microorganismo IMP-P se llevó a cabo en matraces de 250 mL con 100 mL de medio mineral y aceite nuevo de cocina como sustrato (Tabla 7.1 y 7.2). Estos sistemas fueron incubados a 30 °C y 150 rpm durante 72 h. La evaluación de la producción de biosurfactante se realizó a las 0, 24, 48 y 72 h por triplicado.

En cada muestreo se tomaron 5 mL de cultivo. La producción de biosurfactante fue evaluada mediante tensión superficial y prueba de dispersión de aceite. Cada sistema y medición se realizaron por triplicado.

**Tabla 7.1** Medio de cultivo para la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
KCl	0.1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
CaCl <sub>2</sub>	0.01
Extracto de levadura	0.01
Fuente de carbono (aceite de soya)	10
Elementos traza en solución	0.05 mL/L

**Tabla 7.2** Composición de la solución de elementos traza

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	260
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	500
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	500
MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	60
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	720

## **7.5 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite nuevo de cocina**

La evaluación del crecimiento y la capacidad productora de biosurfactante con la cepa IMP-P, se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio, como se describe en la sección 7.4.

El crecimiento del microorganismo se determinó por densidad óptica y cuantificación de proteínas (Sección 7.6.6). Para evaluar la producción de biosurfactante con el sobrenadante libre de células se llevó a cabo la determinación de tensión superficial e interfacial, dispersión de aceite y actividad emulsificante (secciones 7.6.3, 7.6.5, 7.6.2 y 7.6.4, respectivamente)

El muestreo se realizó cada 3 horas hasta las 24 h., posteriormente se evaluaron los tiempos 30, 33, 48, 57 y 72 h. En cada muestreo se evaluaron 3 réplicas con sus respectivos controles. Con la curva de crecimiento del microorganismo se determinó algunos parámetros cinéticos, como tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), utilizando la ecuación de Monod.

## **7.6 Técnicas analíticas**

### **7.6.1 Procesamiento de la muestra**

De cada cultivo se tomaron 5 mL y se colocaron en tubos Falcón de 15 mL, estas muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 min. El sobrenadante libre de células se separó y con este se evaluó la producción de BS.

### **7.6.2 Dispersión de aceite**

Esta técnica evalúa la dispersión de un aceite por efecto del BS contenido en el sobrenadante libre de células, sobre una superficie agua-aceite (Anandaraj y Thivakaran, 2010; Cardoso *et al.*, 2010; Chandran y Das, 2010).

La medición se realizó colocando 70 mL de agua destilada en una caja Petri y se le adicionaron 25  $\mu$ L de hidrocarburo sobre la superficie, después se adicionaron 25  $\mu$ L de sobrenadante y se midió el diámetro de la zona clara que produce. Cada medición se realizó por triplicado. El control consistió en medio de cultivo sin inocular.

### **7.6.3 Tensión superficial**

La tensión superficial es uno de los parámetros más importantes para evaluar la eficacia de un microorganismo productor de BS (Bodour *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2006). La medición de la tensión superficial se realizó mediante el método de la placa de Wilhelmy utilizando un tensiómetro marca Krüss modelo K-100.

Este método se basa en aplicar la fuerza necesaria para vencer la tensión superficial de las muestras analizadas (Youssef *et al.*, 2007), mediante el desplazamiento vertical de una placa de Wilhelmy de platino. Cuando la placa está dentro del líquido a evaluar y se retira verticalmente, se ejerce una fuerza directamente proporcional a la tensión superficial del líquido.

Para verificar el buen funcionamiento del tensiómetro se midió la tensión superficial del agua, reportada en 72.2 mN/m a 20 °C (Shaw, 1992). El control utilizado fue el medio de cultivo sin inocular. Cada medición se realizó por triplicado y a temperatura de 25 °C.



#### **7.6.4 Actividad emulsificante (E24%)**

Esta medición se llevó a cabo siguiendo la técnica de Pruthi y Cameotra (1997); se agregó en un tubo de ensayo 5 mL del sobrenadante y 5 mL de diésel, se agitó en vórtex durante 2 min y se dejó reposar 24 h. Una vez que transcurrió este tiempo, con una regla se midió el tamaño de la emulsión y se calculó como se indica en la ecuación 7.1.

$$\% E24 = \frac{E_f}{H_t} * 100 \quad (7.1)$$

Donde:

E 24 %: Índice de emulsificación a las 24 h.

E<sub>f</sub>: Altura de la emulsión formada.

H<sub>t</sub>: Altura total.

#### **7.6.5 Tensión interfacial**

La tensión interfacial que produce el biosurfactante fue evaluada utilizando hexadecano. Esta medición se realizó con el tensiómetro Krüss K-100 utilizando el método del anillo. Se utilizaron 15 mL del sobrenadante libre de células y se adicionó un volumen igual de hexadecano. Con estos dos fluidos contenidos en el mismo recipiente se procedió a la medición de la tensión interfacial (Urum y Pekdemir, 2004) de la misma manera como se hizo en la tensión superficial (sección 7.4.3). Los análisis se llevaron a cabo a 25°C.

#### **7.6.6 Cuantificación de biomasa**

El crecimiento microbiano se evaluó mediante la densidad óptica a 620 nm y por la

determinación de proteínas en el botón celular obtenido de los cultivos, para lo cual se utilizó el método de Bradford (1976). Estos análisis se realizaron en un espectrofotómetro marca Thermo Modelo Biomate 3S.

### **7.7 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con un aceite gastado de cocina como fuente de carbono**

La producción de biosurfactante utilizando AGC fue evaluada cultivando el microorganismo en matraces de 125 mL con el medio descrito en la sección 7.4, pero utilizando un aceite residual como fuente de carbono, el cual fue obtenido de un comedor industrial.

El microorganismo se incubó bajo las mismas condiciones: 30°C y 150 rpm. Los tiempos evaluados fueron 0, 24, 48 y 72 h. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### **7.8 Evaluación de diferentes parámetros para la producción de BS**

Una vez verificado el crecimiento y producción de biosurfactante con sustrato residual, se optimizaron algunos parámetros que afectan su producción. Para este fin se utilizó un diseño estadístico Taguchi L9, donde se evaluó la concentración de sustrato e inóculo, fuente de nitrógeno y agitación, a tres niveles cada variable (Tabla 7.3).

El método de Taguchi está basado en un arreglo ortogonal que puede ser usado para analizar un gran número de variables a diferentes niveles cada una y con una cantidad pequeña de experimentos, es decir, el número de experimentos puede ser disminuido significativamente. Con este método se puede optimizar procesos y además determina la relación entre variables contrastándose aquellas

interacciones que se cree afectan las características funcionales bajo estudio (Mohan *et. al.*, 2007).

El diseño experimental estuvo conformado por nueve tratamientos, los cuales se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL del medio mineral descrito en la Tabla 7.1, pero con las variables a evaluar ajustadas (Tabla 7.3). Los tratamientos se realizaron por duplicado y cada uno con su respectivo control sin inocular.

Los resultados fueron analizados con el software Statistica V7, teniendo como variables dependientes la tensión superficial y la dispersión de aceite. Estos parámetros fueron evaluados a las 0, 48 y 72 h por triplicado cada uno. Además, se realizó un análisis de estos resultados mediante la metodología de Superficie de Respuesta (Montgomery, 2005).

**Tabla 7.3.** Diseño experimental Taguchi L9 para evaluar el efecto de diferentes parámetros en la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.

Tratamiento	[Aceite] mL/L	Fuente N <sub>2</sub>	Agitación rpm	[Inóculo] %
1	5	NaNO <sub>3</sub>	100	1
2	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	3
3	5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200	5
4	10	NaNO <sub>3</sub>	150	5
5	10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	1
6	10	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100	3
7	15	NaNO <sub>3</sub>	200	3
8	15	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	5
9	15	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	150	1

## 7.9 Validación del medio de cultivo

Dado que los resultados del diseño experimental, arrojaron más de un tratamiento posible, se realizaron tratamientos adicionales (Tabla 7.4) con la finalidad de determinar y validar el mejor tratamiento para la producción de biosurfactante. Los sistemas utilizados fueron iguales a los valores intermedios y altos descritos en la sección 7.8, y con las variantes de la Tabla 7.4.

Los tratamientos se evaluaron por triplicado cada uno, a las 0, 24, 48 y 72 h, mediante la determinación de tensión superficial y dispersión de aceite. De cada tratamiento se tuvo un control sin inocular.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con el método dms (diferencia mínima significativa) de Fisher (Montgomery, 2005), para evaluar la diferencia significativa entre tratamientos y determinar el mejor tratamiento. Además, se complementó con el cálculo de la concentración micelar crítica (CMC) y rendimiento de los mejores tratamientos.

**Tabla 7.4.** Tratamientos adicionales para evaluar el efecto de diferentes parámetros en la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P.

Tratamiento	[Aceite]	Agitación	[Inóculo]
	mL	rpm	%
1	10	150	3%
2	10	150	5%
3	10	200	3%
4	10	200	5%
5	15	150	3%
6	15	150	5%
7	15	200	3%
8	15	200	5%

### **7.9.1 Concentración micelar crítica (CMC)**

A partir del sobrenadante libre de células, se llevó a cabo la separación parcial del biosurfactante, mediante liofilización. Se utilizó una liofilizadora marca Labconco. Se depositaron 20 mL de muestra en frascos especiales, estos fueron congelados a -70 °C, para posteriormente ser procesados en la liofilizadora. Después del proceso de liofilización, la muestra fue recuperada y se colocó en una estufa a 45° C durante 24 h, hasta peso constante, para asegurar que la muestra estuviera completamente libre de agua.

El producto liofilizado (biosurfactante crudo) fue pesado para obtener el rendimiento como producto crudo. Con este producto también se procedió a realizar soluciones a diferentes concentraciones, a las cuales se les midió la tensión superficial, con la finalidad de determinar la menor cantidad de producto necesaria para obtener la mayor disminución de la tensión superficial, es decir determinar la concentración micelar crítica (CMC).

### **7.10 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina como fuente de carbono**

Una vez encontrado el medio optimizado para la producción de BS con la cepa IMP-P, se realizó una curva de crecimiento igual que la descrita en la sección 7.5, pero utilizando aceite gastado de cocina como sustrato.

Durante esta evaluación se cuantificó la tensión superficial, dispersión de aceite y concentración micelar crítica a diferentes tiempos, por triplicado y con su respectivo control en cada uno.

### 7.11 Evaluación de la producción de biosurfactante en reactor airlift

Comprobado el crecimiento y producción de biosurfactante del microorganismo a nivel matraz, con algunos parámetros del medio de cultivo optimizados (concentración de sustrato, % de inóculo y tipo de fuente de nitrógeno) y condiciones de cultivo (agitación), se procedió a realizar la producción de biosurfactante en un reactor airlift de 3 L (Fig. 7.1), utilizando aceite nuevo de cocina.

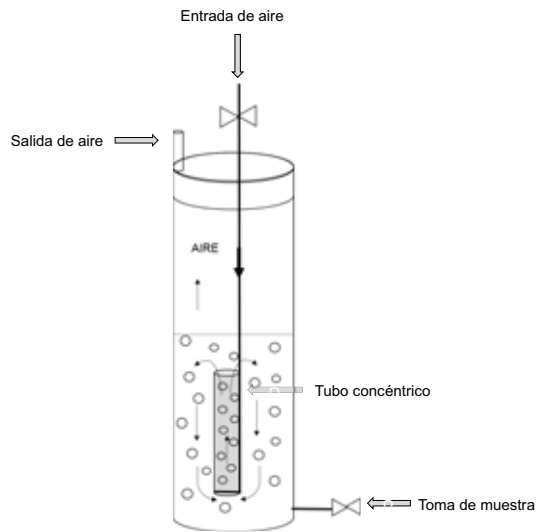
Debido a la geometría del reactor y al tipo de aireación que se utiliza para el suministro de oxígeno, así como para proporcionar agitación neumática al sistema, en este reactor se evaluó la aireación. Para ello, se evaluaron 4 flujos de aire, expresados como velocidad superficial del gas ( $U_g$ ), la cual se calcula de acuerdo a la ecuación 7.2. Los flujos de aire evaluados fueron 754, 1508, 2262 y 3016 mL/min, los cuales corresponden a 1, 2, 3, y 4  $U_g$  (cm/s), respectivamente.

$$U_g = \frac{Q}{A} \quad (7.2)$$

Donde:

Q = Caudal o gasto de aire (mL/s)

A = Área interna del reactor (cm<sup>2</sup>)



**Figura 7.1** Diagrama del reactor Airlift

Las características y condiciones operacionales del reactor son descritas en la tabla 7.5; el flujo de aire se varió de acuerdo a la  $U_g$  a utilizar.

**Tabla 7.5.** Características y condiciones operacionales del reactor airlift.

<b>Propiedad</b>	
Diámetro interno	4.1 cm
Diámetro externo	10 cm
Altura del tubo concéntrico	21 cm
Altura del reactor	63 cm
Área operacional	13.2 cm <sup>2</sup>
Volumen operacional	1.2 L
Altura operacional	21 cm

El reactor se operó en lote y la producción de BS se evaluó mediante la determinación de la tensión superficial y la dispersión de aceite a las 0, 24 y 48 h, por triplicado.

## **7.12 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift**

Con la mejor aireación, determinada como  $U_g$ , se procedió a realizar una cinética con aceite nuevo de cocina (ANC) como fuente de carbono y posteriormente se repitió el mismo procedimiento con aceite gastado de cocina (AGC). De la misma manera que a nivel matraz, la producción de BS se cuantificó mediante tensión superficial y dispersión de aceite. El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante densidad óptica y cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Adicionalmente se midió la tensión superficial del sobrenadante diluido comenzando con una cantidad determinada de BS líquido y una cantidad semejante de agua, y este proceso se repitió hasta que la TS aumentó considerablemente, a esta medición se le denominó dilución micelar crítica (DMC).

Para el AGC se cuantificó el sustrato residual a las 0, 18, 24 y 35 h (sección 7.13).

El biosurfactante, evaluado como producto crudo, fue separado del sobrenadante por liofilización en los tiempos de cultivo 0, 9, 15, 21, 24, 30 y 35 h para determinar el tiempo donde se obtenía la máxima producción de BS. Al producto crudo (polvo) se le determinó su concentración micelar crítica (CMC).

El problema de formación de espuma, se trató de solucionar implementando una malla con alfileres en la parte superior del reactor. Además se conectó una manguera posterior a la malla para recolectar la espuma en frascos estériles (Fig. 7.2).





**Figura 7.2** Reactor airlift con sistema de control y recolección de espuma

### 7.13 Cuantificación del sustrato residual

Para cuantificar el sustrato residual se realizó una extracción líquido-líquido con hexano. Se tomó una muestra del sobrenadante de 20 mL y se lavó 3 veces con un volumen igual de hexano. Posteriormente, la fase orgánica fue colocada en el rotavapor a 220 mmHg y 50°C, para eliminar el solvente y por diferencia de pesos se estimó la cantidad de sustrato residual.

## **7.14 Estabilidad del biosurfactante**

La estabilidad del biosurfactante producido a nivel reactor se evaluó a diferentes condiciones de temperatura, pH y salinidad mediante la determinación de tensión superficial. Estas condiciones son importantes y determinantes para la aplicación de los biosurfactantes en diversos procesos industriales.

La evaluación de la estabilidad se realizó con el sobrenadante del tiempo de operación del reactor donde se obtuvo la mayor y mejor producción de BS (menor TS y mayor DA) durante la evaluación previa a nivel reactor (sección 7.12).

### **7.14.1 Estabilidad al pH**

La estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-P se evaluó en el intervalo de pH de 2 a 12, mediante la determinación de tensión superficial.

Se utilizaron 5 mL del sobrenadante y se midió su pH con un potenciómetro marca Cole Parmer, modelo Accumet AR50. Para obtener valores ácidos de pH, el sobrenadante se ajustó con HCl 1 N en decrementos de una unidad. En cada valor de pH se evaluó la tensión superficial por triplicado.

Para obtener valores de pH alcalinos, el sobrenadante se ajustó con NaOH 1 N en incrementos de una unidad. En cada valor de pH se evaluó la tensión superficial por triplicado.

### **7.14.2 Estabilidad a la salinidad**

La estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-P, se evaluó a diferentes salinidades, desde 0 hasta 300 g/L de NaCl, mediante la determinación

de tensión superficial. Se utilizó un volumen de 10 mL del sobrenadante y se disolvió la cantidad necesaria de NaCl para alcanzar las concentraciones de salinidades a evaluar: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 y 300 g/L. En cada concentración se determinó la tensión superficial por triplicado.

#### **7.14.3 Estabilidad a la temperatura**

La estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-P, se evaluó a diferentes temperaturas, de 25 a 120° C. Se tomaron muestras de 5 mL las cuales fueron incubadas a 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 120°C por triplicado cada una, durante 4 h. Después de este tiempo se dejaron 30 min a temperatura ambiente y se procedió a evaluar su TS.

#### **7.15 Purificación parcial del biosurfactante y rendimiento**

El sobrenadante libre de células fue lavado con acetona en una relación 1:3 v/v. Esta mezcla se dejó reposar a 4°C durante 72 h. Después de este tiempo se formó un precipitado, el cuál fue filtrado y eliminado. La fase líquida fue colocada en el rotavapor a 180 mmHg y 40°C con la finalidad de eliminar la acetona. El líquido resultante del rotavapor (fase acuosa) se liofilizó y al polvo resultante se le determinó su actividad tensoactiva a diferentes concentraciones.

La estimación del rendimiento se realizó con el producto parcialmente purificado, el sustrato consumido, biomasa determinada por contenido de proteínas y consideraciones mencionadas en el Anexo IV.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Caracterización de la cepa IMP-P

La evaluación microscópica y macroscópica de la cepa IMP-P, permitió determinar algunas de sus características. La cepa IMP-P fue reactivada en agar nutritivo y a partir de esta reactivación se hicieron pases sucesivos, hasta que se observaron colonias con el mismo color y tamaño (Fig. 8.1), así como una sola estructura.

La caracterización macroscópica de las colonias obtenidas con la cepa IMP-P incubada a 30° C, se muestra en la tabla 8.1. El análisis de la morfología colonial reveló la formación de colonias redondas de color crema, con borde regular y tamaño de 1-2 mm.



**Figura 8.1** Evaluación macroscópica de la cepa IMP-P cultivada en medio sólido con caldo nutritivo a 30 °C

**Tabla 8.1.** Caracterización macroscópica de la cepa IMP-P cultivada en agar nutritivo a 30° C.

<b>Morfología</b>	<b>Cepa IMP-P</b>
Forma	Circular
Elevación	Elevada
Borde	Entero
Color	Crema
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Suave
Luz reflejada	Brillante

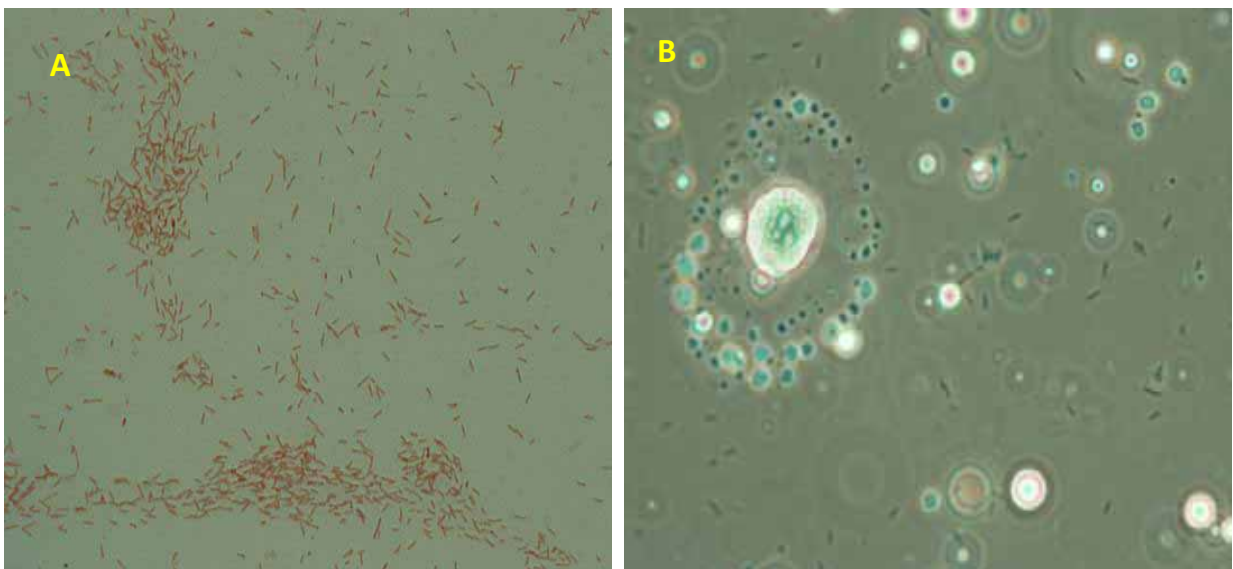
A nivel microscópico se observó que la cepa IMP-P es un microorganismo Gram negativo con forma bacilar (Fig. 8.2). En la Fig. 8.3 se observa a la misma cepa pero cultivada en medio mineral y aceite nuevo de cocina como sustrato, observada con tinción de Gram (Fig. 8.3A) y en forma directa en fresco y contraste de fases (Fig. 8.3B). Con la tinción de Gram se corroboró que la cepa IMP-P es un bacilo Gram negativo, pero ligeramente más delgado que cuando se crece en un medio rico (caldo nutritivo). Durante la observación en fresco en contraste de fases, además de los bacilos se observó la presencia de micelas de aceite que se integraron en la fase acuosa por efecto del biosurfactante que produce el microorganismo (Fig. 8.3B).

El hecho de que la cepa IMP-P sea un bacilo Gram negativo es relevante, ya que se ha reportado que los microorganismos Gram negativos, sobre todo los provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos y/o de altas temperaturas, pueden ser productores de biosurfactantes o bioemulsificantes (Makkar y Cameotra, 1998). Batista *et al.* (2006) aislaron bacterias Gram negativas, de tres sitios brasileños contaminados con hidrocarburos y sus

productos, los cuales mostraron actividad emulsificante y redujeron la tensión superficial del medio de cultivo.



**Figura 8.2** Observación microscópica de la cepa IMP-P, con tinción de Gram y a 100x cultivada en caldo nutritivo a 30° C.



**Figura 8.3** Observación microscópica de la cepa IMP-P cultivada en medio mineral con ANC como sustrato. A) Tinción de Gram y B) En fresco con microscopio de contraste de fases, ambos con el objetivo de 100x.

Para verificar el género y especie de la cepa IMP-P se realizaron las pruebas bioquímicas recomendadas para microorganismos Gram negativos, utilizando la prueba API 20E de Biomerieux. Después de que la cepa IMP-P estuvo en contacto con los sustratos correspondientes incubada a 37° C durante 24 h, y de verificar que los resultados fueran positivos o negativos (Anexo I), los resultados fueron analizados en el software API web de Biomerieux, indicando que la cepa IMP-P corresponde a la especie *Pseudomonas aeruginosa* con un 99.7% de confiabilidad.

## 8.2 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante

La evaluación preliminar para la producción de biosurfactantes con la cepa IMP-P y utilizando aceite nuevo de cocina (ANC) como sustrato, se muestra en la Tabla 8.2. Se observó que este microorganismo es potencial productor de biosurfactantes, ya que dio positiva la prueba de dispersión de aceite desde las 24 h, alcanzando un halo de 10.8 cm a las 72 h. En cuanto a la tensión superficial disminuyó desde las 24 h, logrando una disminución máxima de 28.1 mN/m a las 72 h.

Estos resultados coinciden con otros autores (Abalos *et al.*, 2002; Abbasi *et al.*, 2012), quienes han trabajado con *Pseudomonas aeruginosa* y han obtenido tensiones superficiales en el intervalo de 27 a 32 mN/m.

**Tabla 8.2.** Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, utilizando ANC.

Tiempo	TS (mN/m)	DA (cm)
24 h	29.23 ± 0.64	9.33 ± 0.37
48 h	28.47 ± 0.03	9.93 ± 0.67
72 h	28.1 ± 0.25	10.83 ± 0.26

TS: Tensión Superficial, DA: Dispersión de aceite

### 8.3 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz con aceite nuevo de cocina

El crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, utilizando aceite nuevo de cocina como sustrato, se presenta en la figura 8.4. Se observó que la cepa IMP-P presentó una fase lag o de adaptación de aproximadamente 6 h, seguida de crecimiento exponencial hasta las 24 h y posteriormente una fase estacionaria aproximadamente hasta las 57 h, ya que a las 72 h se observó una ligera disminución del crecimiento. La capacidad de producción de biosurfactante estuvo ligada al crecimiento microbiano, con una disminución en la tensión superficial hasta 29 mN/m a las 18 h manteniéndose este valor constante hasta las 72 h de monitoreo.

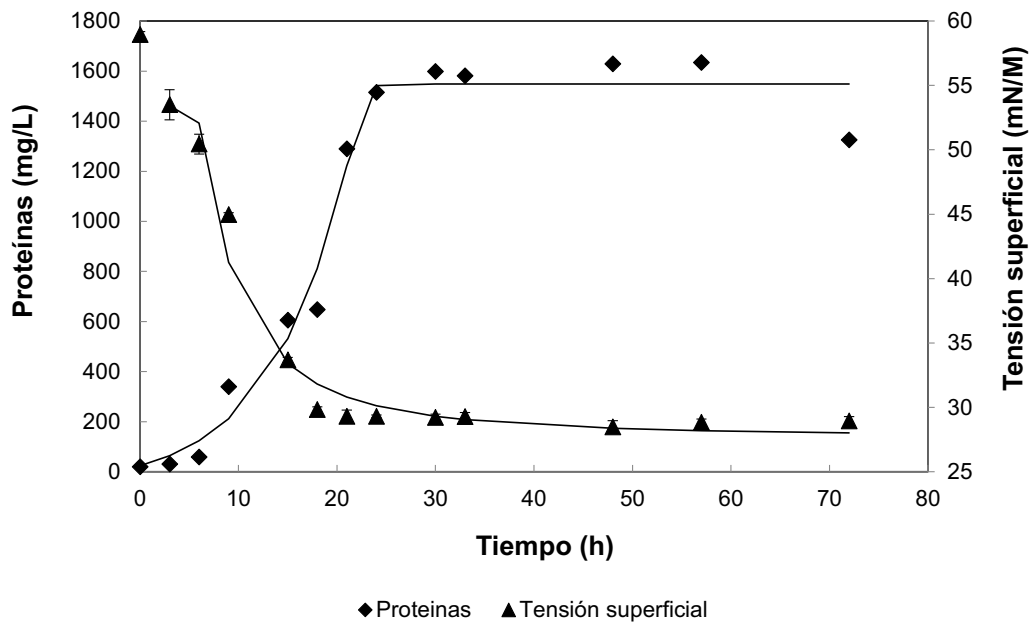
Estos resultados son semejantes a los obtenidos en otros trabajos (Zhang *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 2006; Aparna *et al.*, 2012), los cuales también utilizaron una cepa de *Pseudomonas sp.* logrando tensiones superficiales de 30 mN/m en promedio, con sustratos diferentes o similares al de este trabajo (glucosa, aceite de coco, aceite de soya).

En este análisis se encontró una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) del microorganismo de  $0.104 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 6.6 h, calculados de acuerdo a la ecuación de Monod. Para conocer estos valores se estimó la pendiente del Ln de proteínas vs tiempo durante la fase exponencial ( $\mu$ ) y el  $\text{Ln } 2 / \mu$  para conocer el tiempo de duplicación.

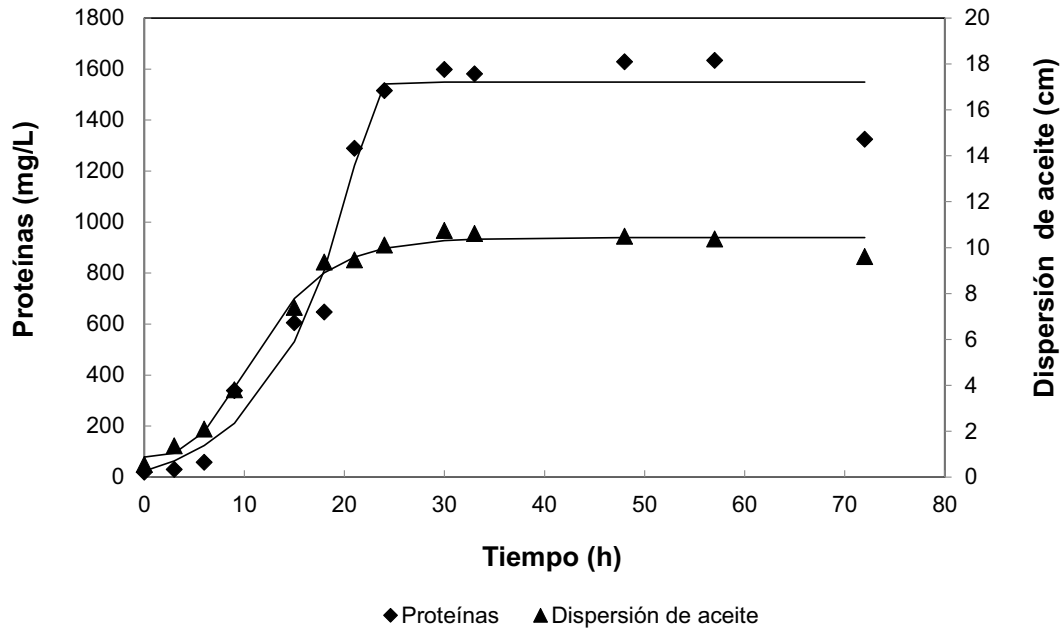
Resultados similares han sido reportados en otros trabajos sobre la producción de biosurfactantes con *Pseudomonas*, tanto en sustratos solubles (glucosa) como hidrofóbicos (aceite gastado de soya) a nivel reactor (De Lima *et al.*, 2009; Guerra-Santos *et al.*, 1984) donde reportan valores de  $\mu$  entre  $0.1$  y  $0.114 \text{ h}^{-1}$ .



En el caso de la dispersión de aceite (Fig. 8.5) se tuvo un halo de dispersión máximo de 10 cm el cual permaneció constante hasta las 57 h. Esta determinación también fue indicativa de la producción de biosurfactante por la cepa IMP-P, como la tensión superficial. Ambos parámetros estuvieron indirectamente correlacionados, como ha sido reportado en otros trabajos (Youssef *et al.*, 2004). En cambio, la dispersión de aceite y el crecimiento estuvieron directamente correlacionados.



**Figura 8.4** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la determinación de proteína y tensión superficial, cultivada con ANC como fuente de carbono.



**Figura 8.5** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, mediante la determinación de proteína y dispersión de aceite, cultivada con ANC como fuente de carbono.

En cuanto a la evaluación de la tensión interfacial y la actividad emulsificante que produce el biosurfactante de la cepa IMP-P, los resultados se presentan en la tabla 8.3. Se puede observar que este bioproducto, también provocó actividad emulsificante utilizando diésel, alcanzando un máximo de 20% a las 72 h, valor que puede ser considerado bajo con respecto a lo reportado en otros trabajos (Centeno *et al.*, 2010). Sin embargo la tensión interfacial logró disminuirla hasta en un 95%, alcanzando valores de 1.35 mN/m a las 24 h. Pacwa *et al.* (2011) explicaron que los biosurfactantes de bajo peso molecular tienden a disminuir las tensiones superficial e interfacial sin embargo la actividad emulsificante no es alta.

Karant *et al.* (1999) y Batista *et al.* (2006) explican que los compuestos de superficie activa producidos por microorganismos son de dos tipos, los que reducen la tensión superficial en la interface aire-agua (biosurfactantes) y los que reducen la tensión interfacial entre líquidos inmiscibles o en las interfaces sólido-líquido (bioemulsificantes). Los biosurfactantes usualmente exhiben capacidad de

emulsificación, pero los bioemulsificantes no necesariamente reducen la tensión superficial.

**Tabla 8.3.** Evaluación de la actividad emulsificante y tensión interfacial que produce el biosurfactante generado con la cepa IMP-P.

Tiempo (h)	E24 (%)	TI (mN/m)
0	0.00	26.50
24	8.97 ± 2.79	1.35 ± 0.36
48	15.12 ± 2.18	8.01 ± 0.22
72	19.23 ± 3.34	N.C.

TI: Tensión Interfacial, E24: Actividad emulsificante a las 24 h. N.C: No cuantificado

La comparación de estos resultados con la literatura podría resultar difícil, ya que los hidrocarburos utilizados para evaluar estos parámetros no siempre son los mismos. Sin embargo, en el caso de la TI se han reportado valores desde 3 mN/m con queroseno (Amani *et al.*, 2010) hasta 0.4 mN/m con hexadecano (Raza *et al.*, 2007). Por lo tanto la TI obtenida con el biosurfactante de la cepa IMP-P a las 24 h, está cercana de los valores reportados. Además, los mejores biosurfactantes disminuyen la TI a valores  $\leq 1$  (Mulligan, 2005).

Para el caso de actividad emulsificante, en la mayor de parte de la literatura científica se reporta basada en estudios con queroseno, donde el biosurfactante produce una emulsificación alrededor del 53% (Haba *et al.*, 2000) hasta 100% (De Lima *et al.*, 2009). En el caso de la cepa IMP-P se encontró una actividad emulsificante más baja, aunque se observó que aumentó con el tiempo, por lo cual se puede inferir que a tiempos mayores se podría esperar una actividad mayor.

#### **8.4 Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con aceite gastado de cocina**

Una vez corroborada la producción de biosurfactante con un sustrato nuevo, se procedió a evaluar esta producción con un sustrato residual (aceite gastado de cocina), tal y como se describe en la sección 7.4. Este sustrato fue obtenido de un comedor industrial lo que implica que fue utilizado para freír y procesar diferentes alimentos. Durante este experimento se evaluó la tensión superficial y dispersión de aceite (Tabla 8.4), para determinar si era factible utilizar este residuo como fuente de carbono y que, adicionalmente, los diferentes componentes (procedentes de los alimentos fritos) no provocaran interferencia. Se observó que el aceite gastado no afectó la producción de biosurfactante, ya que los resultados fueron semejantes a los obtenidos con el aceite nuevo de cocina (Tabla 8.2). Sin embargo, la cepa tardó un poco más en adaptarse que en el caso anterior, logrando obtener una disminución de la TS de 28 mN/m hasta las 48 h, en lugar de las 24 h que se obtuvieron con el ANC.

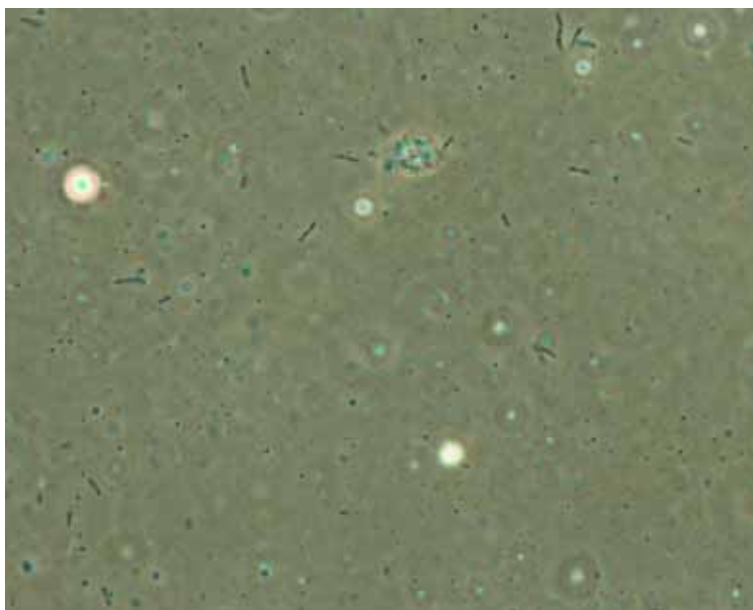
En los experimentos con AGC se observaron, además de la cepa IMP-P, otros microorganismos (Fig. 8.6), con forma de cocos y bacilos diferentes a la cepa IMP-P, que probablemente provienen del aceite gastado, a pesar de que fue esterilizado 3 veces en autoclave y tuvo una esterilización por 15 min en microondas. Lo que implica, que para este tipo de residuos se debe tener otra alternativa de esterilización, pero esto no es del todo factible cuando se realice la producción de biosurfactante a nivel industrial, porque al necesitar este proceso incrementará el costo y lo que se requiere es utilizar el AGC como proviene de los lugares de recolección.

Una observación al comparar las imágenes al microscopio es que con AGC se aprecia una menor cantidad de micelas lo que implica una menor actividad por parte de la cepa IMP-P, este comportamiento puede atribuirse a la competencia que se tiene por el sustrato con los microorganismos provenientes del aceite.

Por lo anterior, se decidió evaluar la producción de BS con cantidades mayores de inóculo (3% y 5%) (Sección 8.5)

**Tabla 8.4.** Evaluación preliminar de la producción de biosurfactante con la cepa IMP-P, utilizando un sustrato residual (aceite gastado de cocina).

Tiempo (h)	Tensión superficial (mN/M)	Dispersión de aceite (cm)
24	$31.49 \pm 0.26$	$4.93 \pm 0.59$
48	$28.66 \pm 0.07$	$10.93 \pm 0.10$
72	$28.98 \pm 0.03$	$11 \pm 0.11$



**Figura 8.6** Observación microscópica de la cepa IMP-P cultivada en aceite gastado de cocina a 30° C. Observación en fresco con microscopio de contraste de fases, con el objetivo de 100x.

## 8.5 Efecto de diferentes parámetros sobre la producción de biosurfactante utilizando aceite gastado de cocina como sustrato

Con la finalidad de optimizar la producción de biosurfactante y/o de al menos igualar su producción comparada con lo que se obtenía con aceite nuevo de cocina, se llevó a cabo un diseño de experimentos Taguchi L9, para evaluar el efecto que tenían 4 variables (concentración de sustrato e inóculo, fuente de nitrógeno y agitación) sobre la producción de BS utilizando aceite gastado de cocina como sustrato y a tres niveles cada variable (Tabla 7.2). Las variables dependientes evaluadas fueron la tensión superficial y dispersión de aceite a las 48 y 72 h (Tabla 8.5), donde se observó que los mejores tratamientos fueron el 4 y 7, que corresponden al NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno y valores medios y altos de concentración de sustrato e inóculo y agitación.

**Tabla 8.5** Resultados del diseño de experimentos Taguchi L9.

Trat.	Variables Respuesta					
	Dispersión de aceite (cm)			Tensión superficial (mN/m)		
	Tiempo (h)			Tiempo (h)		
	0	48	72	0	48	72
1	3.8	8.5	10.2	45.8	31.8	29.3
2	3.2	4.0	5.8	49.9	38.9	38.8
3	3.0	9.4	4.5	49.5	31.3	35.7
<b>4</b>	<b>3.0</b>	<b>11.8</b>	<b>11.6</b>	<b>45.4</b>	<b>30.1</b>	<b>29.4</b>
5	3.8	4.7	9.4	44.2	46.7	38.4
6	3.0	6.5	8.3	47.0	31.3	31.9
<b>7</b>	<b>3.0</b>	<b>12.0</b>	<b>11.9</b>	<b>46.7</b>	<b>29.0</b>	<b>29.3</b>
8	3.0	7.2	10.1	45.7	40.2	35.9
9	3.2	3.8	10.5	44.6	33.0	31.9

El análisis estadístico del diseño de experimentos (Fig. 8.7), corroboró que la variable que más afectó a la tensión superficial y dispersión de aceite fue la fuente de nitrógeno ( $p < 0.000001$ ), seguido de la concentración de inóculo ( $p < 0.00001$ ) desde las 48 h.

El tipo de fuente de N es un parámetro importante para la producción de BS ya que es un elemento esencial para la formación de proteínas, el crecimiento y la producción de enzimas del proceso de fermentación (Xia *et al.*, 2013).

Algunos autores han relacionado la producción de BS con el agotamiento de la fuente de nitrógeno, por lo que la producción de biosurfactante se lleva a cabo en la fase estacionaria (Saharan *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores como Pruthi y Cameotra (2000), quienes trabajaron con *Serratia marcesens* observaron que conforme el microorganismo iba creciendo se reducía la TS lo que indica que la producción de BS está ligada con el crecimiento como ocurrió con nuestro microorganismo.

Las fuentes inorgánicas más utilizadas han sido  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ . Autores como Raza *et al.* (2007); De Lima *et al.* (2009); Aparna *et al.* (2012) han utilizado  $\text{NH}_4^+$  reduciendo la TS hasta 26 mN/m con *Pseudomonas aeruginosa*; mientras Abalos *et al.* (2002) y Amani *et al.* (2010) han usado  $\text{NaNO}_3$ , obteniendo reducciones de TS de 26 mN/m.

En el diseño de experimentos se pudo apreciar que la mejor fuente de nitrógeno fue el  $\text{NaNO}_3$  y que ésta fue la variable con mayor efecto sobre las variables respuesta (TS y DA) (Fig.8.7)

Un comportamiento similar al obtenido lo obtuvo el grupo de trabajo de Wu *et al.* (2008), quienes al trabajar con *Pseudomonas aeruginosa* evaluando fuentes de  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  apreciando que los primeros eran mejor fuente de nitrógeno. La posible explicación a este comportamiento se la atribuyen a la condición limitada

de N simulada que se realiza al utilizar  $\text{NO}_3$  ya que para que este sea asimilado por el microorganismo primero debe ser reducido a  $\text{NH}_4^+$  lo que se ve reflejado como una limitante de la fuente de nitrógeno, efecto que se ha visto esencial para el aumento de la producción de ramnolípido.

Cardoso *et al.* (2010) evaluaron el efecto que tenían diferentes variables (aireación, agitación, fuente de C y  $\text{N}_2$ ) sobre la producción de BS por *Yarrowia lipolytica*, observando que la fuente de nitrógeno juega un papel importante, al igual que las relaciones C/N como lo mencionan otros autores (Reis *et al.* 2010; Ricalovic *et al.*, 2012). En estos trabajos se encontró que mientras más alta era la relación C/N, la cantidad de producto también se incrementaba. Además, observaron que a mayor aireación y agitación aumentaba la producción de BS.

En el presente estudio no se apreció un cambio significativo al aumentar las relaciones C/N en cuanto a tensión superficial (Figs. 8.7 A y B), sin embargo en cuanto a dispersión de aceite (Fig. 8.7 B y D) se obtuvieron mejores resultados con 15 mL/L de AGC lo que equivale a una relación C/N de 15.

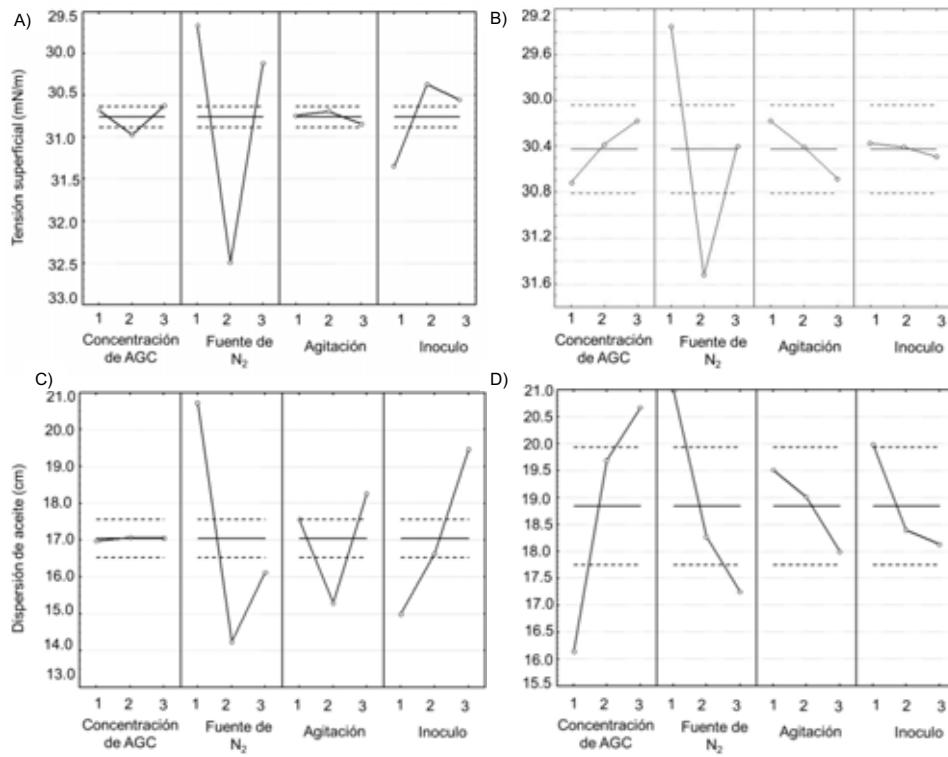
Por su parte la agitación no presentó diferencia significativa en cuanto a los resultados obtenidos, pero los matraces que tenían mayor agitación se observaron más homogéneos en cuanto a la distribución e integración del sustrato (AGC).

Sahoo *et al.* (2011) evaluaron el efecto de algunas variables, entre las que se encontraba la concentración de sustrato e inóculo. Estos investigadores trabajaron con *Pseudomonas aeruginosa* y octadecano como fuente de carbono, y pudieron apreciar que los valores de 2 y 4% v/v de concentración de sustrato daban los mejores resultados para la producción de biosurfactante; sin embargo optaron por trabajar con el valor de 2%, ya que no existía diferencia significativa al utilizar una concentración mayor de sustrato y si implicaba un costo mayor. En cuanto a la concentración de inóculo, utilizaron 1%, ya que a porcentajes mayores de inóculo, el microorganismo empezaba a perder actividad tensoactiva.

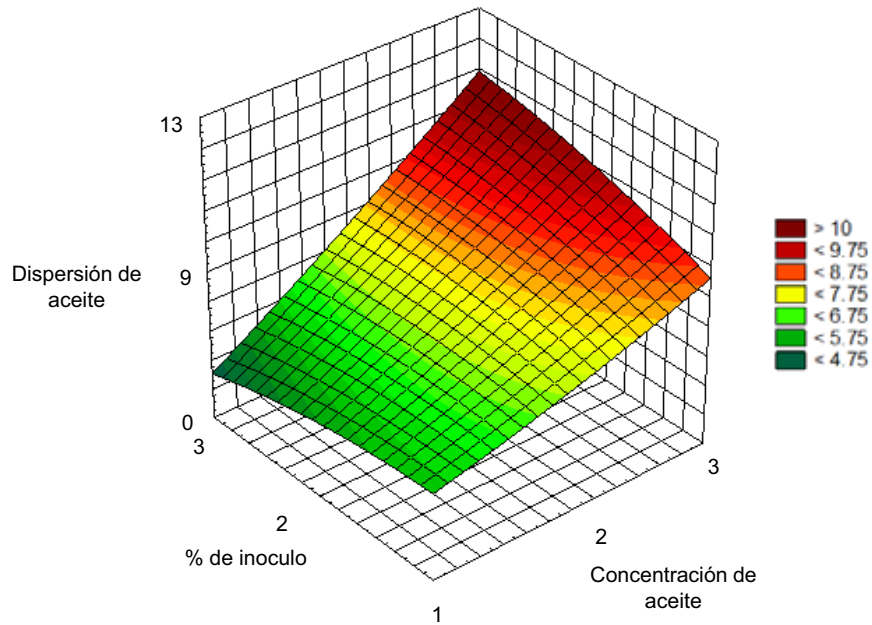


En el diseño experimental con la cepa IMP-P se observó que los matraces con 3 y 5% de inóculo presentaban una menor desviación estándar de las mediciones de TS y DA que los que tenían solamente 1%.

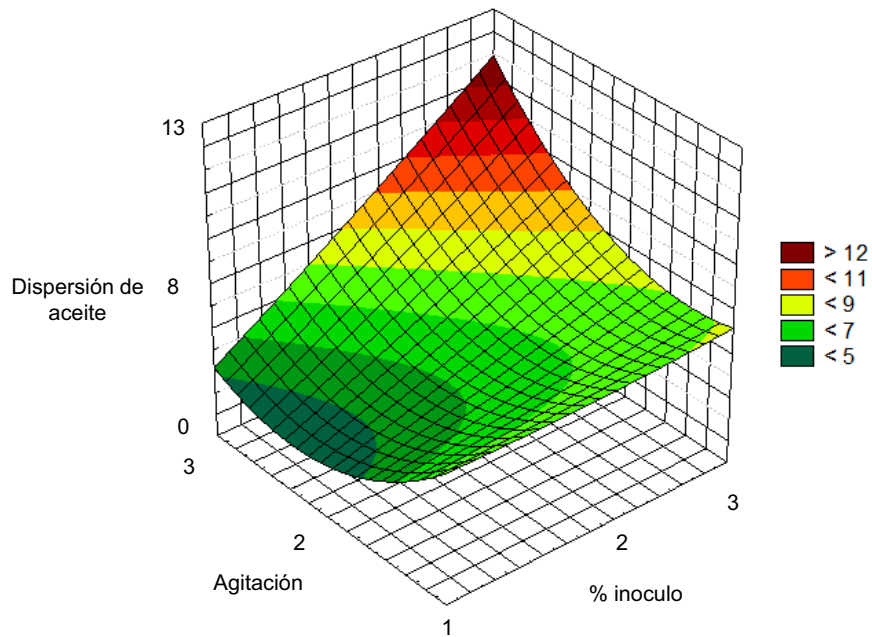
El análisis mediante superficies de respuesta se realizó con la variable dependiente “dispersión de aceite” a las 48 h, ya que fue la que presentó mayor significancia ( $\alpha=0.05$ ), arrojando que el mejor tratamiento fue el que contenía  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno; agitación de 200 rpm, inóculo al 5% y una concentración de sustrato 15 mL/L (Figs. 8.8 - 8.10).



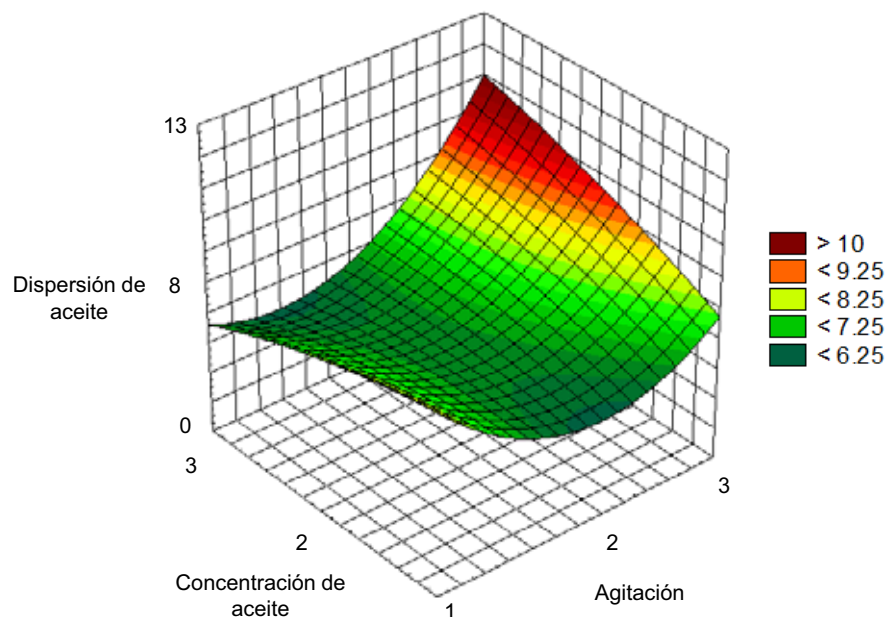
**Figura 8.7** Efecto de las variables independientes sobre la tensión superficial: A) 48 h y B) 72 h, y sobre la dispersión de aceite: C) 48 h y D) 72 h. AGC: aceite gastado de cocina.



**Figura 8.8** Análisis de superficie de respuesta del efecto de la concentración de inóculo y la concentración de aceite a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite.



**Figura 8.9** Análisis de superficie de respuesta del efecto de la agitación y concentración de inóculo a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite.



**Figura 8.10** Análisis de superficie de respuesta del efecto de la concentración de aceite y la agitación a las 48 h sobre la producción de biosurfactante evaluada como dispersión de aceite.

### 8.5.1 Validación del diseño de experimentos

Los resultados del diseño de experimentos, indicaron que uno de los mejores tratamientos teóricos fue aquel que utiliza  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno, 15 mL de sustrato (AGC), 5% de inóculo y agitación de 200 rpm, pero considerando únicamente la dispersión de aceite (DA) a las 48 h. Sin embargo, tomando en cuenta ambas variables (DA y TS), así como los tiempos de respuesta (48 y 72 h) se observó que no había diferencia significativa contundente entre los tratamientos con niveles medios y altos de las variables (concentración de sustrato e inóculo y agitación). Por lo que se decidió evaluar tratamientos adicionales que consideraron el mejor tratamiento teórico y los niveles medios y altos de las tres variables antes mencionadas (Tabla 7.3). En estos tratamientos se evaluó la tensión superficial y la dispersión de aceite a las 24, 48 y 72 h. Los resultados

fueron analizados mediante un análisis de comparación de medias utilizando el método de diferencia mínima significativa (dms) de Fisher (Montgomery, 2005).

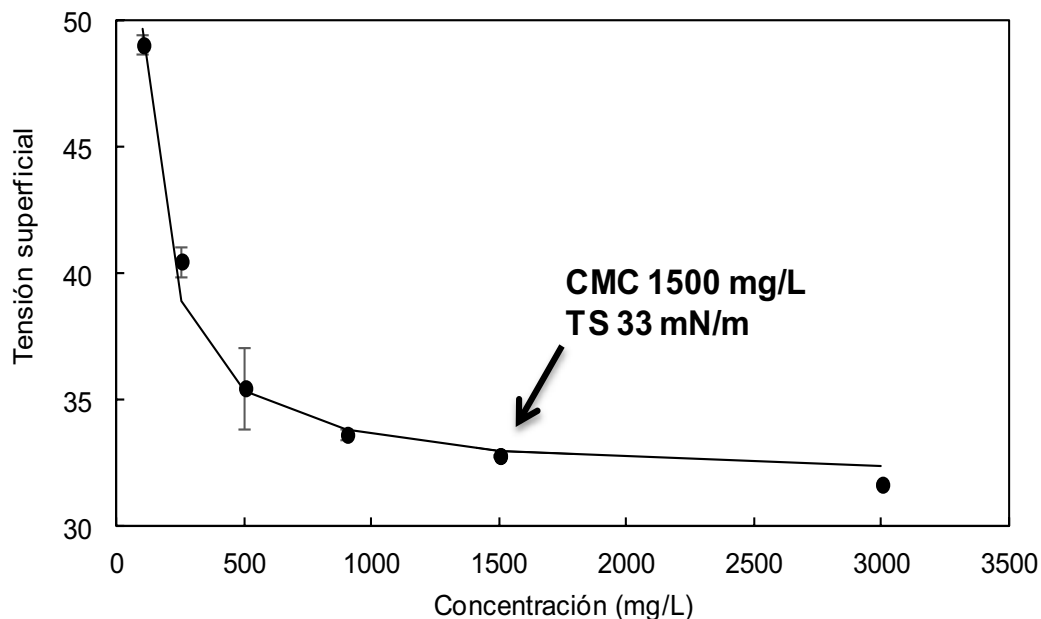
La tabla 8.6 muestra la actividad tensoactiva que tuvieron los diferentes tratamientos mediante TS y DA. Al realizar el análisis estadístico de comparación de medias con la prueba dms, utilizando la variable TS a las 48 y 72 h, este análisis indicó que los mejores tratamientos correspondían al 6 y 8, los cuales fueron significativamente diferentes ( $\alpha= 0.05$ ) a los demás, pero iguales entre sí (Anexo II). Los tratamientos 6 y 8 tenían la misma concentración de sustrato e inóculo y su diferencia radicaba en la agitación (150 rpm y 200 rpm, respectivamente).

**Tabla 8.6.** Evaluación de la actividad tensoactiva en los tratamientos para la optimización y validación del medio y condiciones de cultivo de la cepa IMP-P.

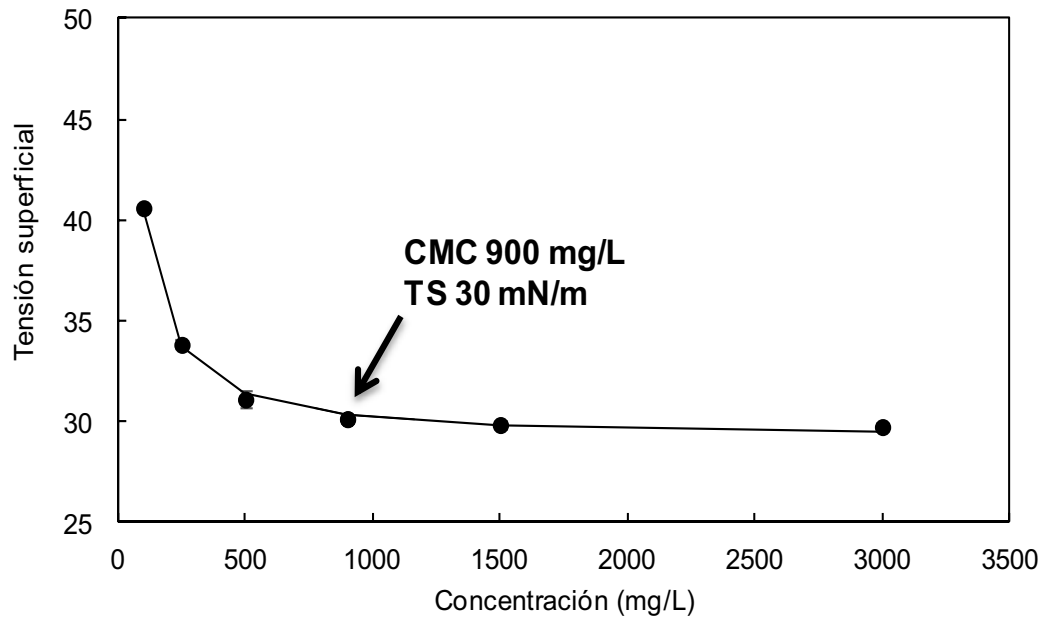
Trat.	Variables Respuesta							
	Dispersión de aceite (cm)				Tensión superficial (mN/m)			
	t0	t24	t48	t72	t0	t24	t48	t72
1	5.03	8.28	10.55	9.98	45.75	28.75	29.40	29.68
2	4.72	11.42	11.93	12.25	48.86	29.03	29.21	29.15
3	4.72	7.80	9.72	12.33	50.77	30.42	29.28	29.64
4	5.08	12.00	12.23	12.02	46.31	29.55	28.87	29.14
5	5.22	11.60	12.00	10.12	45.55	28.93	29.01	28.86
6	5.11	11.90	11.93	11.93	45.16	28.67	28.71	28.87
7	4.75	12.00	12.50	12.18	46.82	29.11	29.04	28.90
8	5.17	12.32	12.58	12.47	46.48	28.89	28.68	28.29

Con la finalidad de complementar los resultados para elegir el mejor tratamiento se evaluó la concentración micelar crítica (CMC) de los tratamientos 6 y 8. La figura 8.11 muestra que para el tratamiento 6 se tuvo una CMC de 1500 mg/L con una

TS de 33 mN/m; mientras que el tratamiento 8 (Figura 8.12) presentó una CMC de 900 mg/L con una TS de 30 mN/m. Además, en el tratamiento 6 se obtuvieron 8 g/L de producto crudo (biosurfactante), mientras que en el tratamiento 8 se obtuvieron 10.36 g/L. Razón por la cual y tomando en cuenta el análisis de comparación de medias, se eligió el tratamiento 8 como el mejor y con éste se realizó la cinética con aceite gastado de cocina como sustrato. Este tratamiento corresponde al tratamiento teórico arrojado en el diseño de experimentos como el mejor (Sección 8.5) y consistió de 15 mL/L de AGC, 5 % de inóculo, 200 rpm y  $\text{NaNO}_3$  como fuente de N.



**Figura 8.11** Evaluación de la tensión superficial con el producto crudo (biosurfactante) obtenido con el tratamiento 6 a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial.

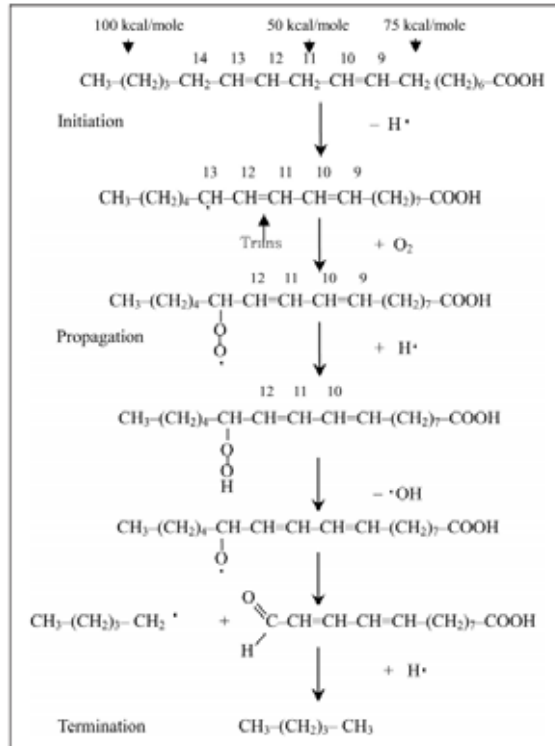


**Figura 8.12** Evaluación de la tensión superficial con el producto crudo (biosurfactante) obtenido con el tratamiento 8 a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial

### 8.6 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante a nivel matraz con aceite gastado de cocina

En la evaluación del crecimiento y producción de BS realizada con la cepa IMP-P con AGC como sustrato se apreció el mismo comportamiento que con el ANC. La fase de adaptación o lag se observó hasta las 6 h, seguida de un crecimiento exponencial hasta las 24 h y una fase estacionaria hasta las 48 h (Fig. 8.14).

Los AGC son un sustrato accesible para los microorganismos ya que al calentarse para su uso alimenticio son oxidados formando cadenas más pequeñas (Choe y Min 2007) lo que las hace de más fácil acceso para que el microorganismo lleve su degradación (Fig. 8.13).



**Figura 8.13** Reacciones de oxidación del AGC

Sin embargo en este caso, el microorganismo presentó una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.0478 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 14.5 h, tiempo que representa casi el doble del obtenido con ANC. Este comportamiento se puede deber a varios factores: primero hay que considerar que para este proceso se utilizó un medio optimizado, el cual tiene 4 variaciones con respecto al inicial (tipo y concentración de fuente de carbono, mayor agitación e inóculo); además, hay que considerar que a pesar de que la fuente de carbono (AGC) se esterilizó, ésta contenía carga microbiana de difícil eliminación, la cual se observó en el cultivo de la cepa IMP-P con AGC como se mostró en la figura 8.6.

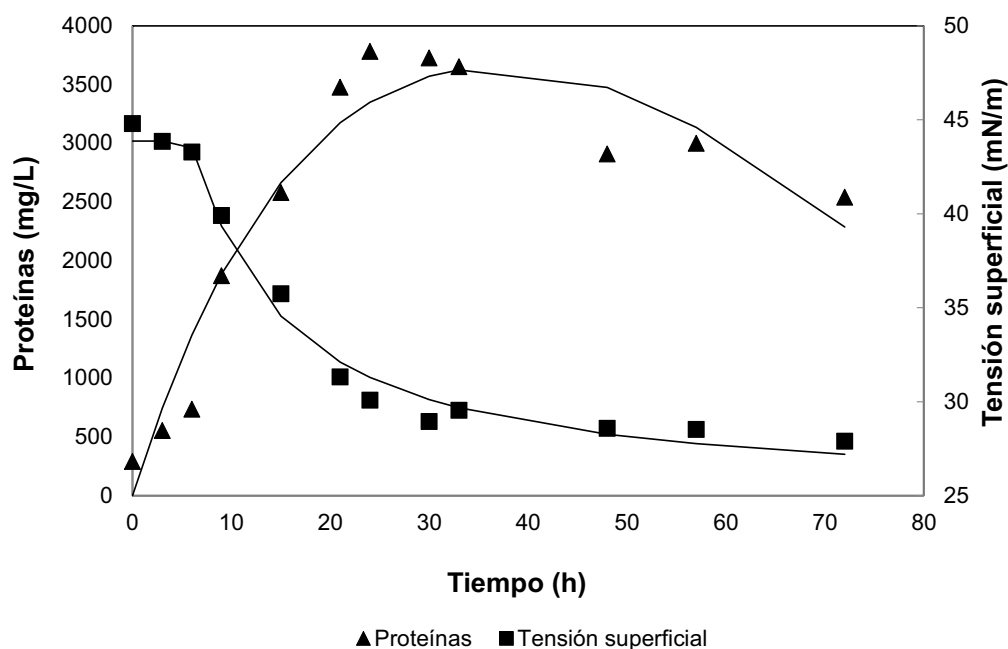
En este caso la capacidad de producción de biosurfactante, al igual que con ANC, estuvo ligada al crecimiento microbiano, ya que se presentó una disminución en la tensión superficial hasta 28 mN/m a las 24 h, valor que se mantuvo constante hasta las 72 h.



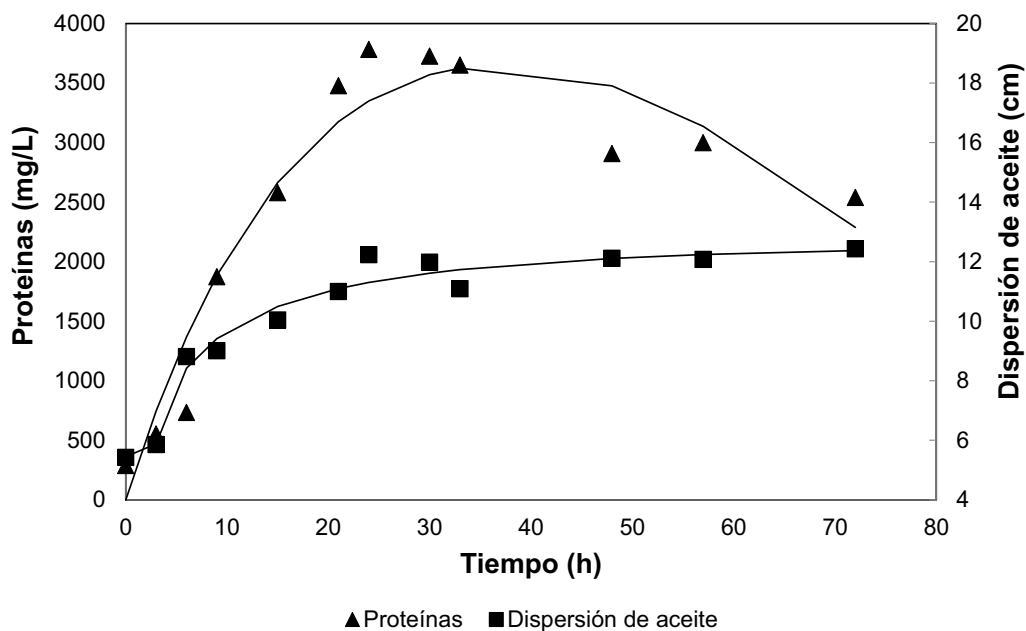
Estos resultados son semejantes a los obtenidos por autores (Haba *et al.*, 2000; Abalos *et al.*, 2002; De Lima *et al.*, 2009) que utilizaron aceites residuales como fuente de carbono con *Pseudomonas aeruginosa* y lograron TS de 27 a 34 mN/m.

En el caso de la dispersión de aceite (Fig. 8.15) se observó un halo de dispersión máximo de 12 cm, el cual permaneció constante hasta las 72 h. Esta determinación también fue indicativa de la producción de biosurfactante por la cepa IMP-P. La TS y la DA estuvieron indirectamente correlacionadas.

Zhang *et al.* (2012) obtuvieron halos de DA de 4.5 cm y reducción de TS de un 25% para *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que estas propiedades ayudan a mejorar la accesibilidad y la biodisponibilidad de los hidrocarburos del petróleo inmiscibles con el agua a través de los microorganismos por pseudosolubilización.



**Figura 8.14** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono con medio correspondiente al tratamiento 8



**Figura 8.15** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada con aceite gastado de cocina como fuente de carbono con medio correspondiente al tratamiento 8.

También se cuantificó la cantidad de producto crudo obtenido a las 24, 48 y 72 h (Tabla 8.7) y con estos productos se evaluó la actividad tensoactiva, apreciándose que el mejor tiempo de operación fue a las 48 h ya que se obtuvo la mayor cantidad de producto con menor CMC; el tiempo de 72 h presentó un aumento el cual puede ser atribuido a la degradación del producto como fue posible apreciar en el crecimiento con ANC (sección 8.3).

**Tabla 8.7.** Evaluación del rendimiento y CMC en la cinética de la cepa IMP-P con AGC como sustrato .

Tiempo (h)	Producto (g/L)	CMC (mg/L)
0	0	0 (T.S. $63.05 \pm 0.09$ mN/m)
24	3.78	1000 (T.S. $31.56 \pm 0.07$ mN/m)
48	7.75	1000 (T.S. $30.99 \pm 0.73$ mN/m)
72	7.63	2500 (T.S. $30.37 \pm 0.10$ mN/m)

### 8.7 Efecto de la aireación sobre la producción de BS en un reactor airlift

En esta etapa se realizó el cambio de sistema de cultivo, de matraz a un reactor airlift escala laboratorio. La evaluación de la aireación se realizó en el reactor utilizando aceite nuevo de cocina como sustrato y los mejores parámetros establecidos en el diseño de experimento y validación (secciones 8.5 y 8.5.1), excepto la agitación ya que los reactores airlift homogenizan su contenido con el flujo de aire (agitación neumática) (Sección 1.4.1).

Se ha demostrado que la aireación es un factor importante en la producción de BS a nivel reactor (Cardoso *et al.*, 2010; Adamczak y Bendnarski, 2010).

La mayoría de los trabajos sobre la producción de BS a nivel reactor a escala laboratorio han sido realizados en reactores tipo tanque agitado (Tabla 2.3). En estos trabajos se han utilizado aireaciones desde 0.25 hasta 5 L/min, donde se han tenido resultados óptimos. Por su parte de los pocos trabajos con reactores airlift se han tenido aireaciones de hasta 4 L/min.

En el caso de los reactores airlift, tal y como se mencionó en la metodología (sección 7.10) la velocidad superficial de gas en este tipo de reactores se conoce

como Ug. En esta etapa de evaluación de la cepa IMP-P para la producción de biosurfactantes, se probaron 4 valores de Ug's (1, 2, 3 y 4) que corresponden a

flujos de aire de 754, 1508, 2262 y 3016 mL/min, respectivamente. Se determinó el efecto de estas aireaciones sobre la producción de biosurfactante, evaluada mediante la tensión superficial y dispersión de aceite

La tabla 8.8 muestra que la producción de biosurfactante, evaluada con tensión superficial a las 24 h, no tuvo diferencias significativas con las cuatro aireaciones probadas. En cambio, con la dispersión de aceite hubo mayor diferencia significativa entre las Ug's evaluadas y los tiempos de medición (24 y 48 h) (Tabla 8.9). Se observó que el biosurfactante obtenido con la Ug de 4 produjo el valor más alto de dispersión de aceite a las 24 h. Sin embargo en este reactor se presentó un problema, ya que al ser muy alta la aireación, se formó una cantidad excesiva de espuma. Lo anterior provocó que el reactor solamente pudiera operar 32 h, ya que al ser un sistema abierto tiende a vaciarse mediante la espuma que se produce y sale. Sin embargo los valores de TS obtenidos con 2 y 3 Ug a las 48 h fueron muy similares al obtenido con 4 Ug.

Los productos de los reactores a las 48 h con 2, 3 y 4 Ug's fueron liofilizados para evaluar la cantidad de producto crudo producido en los mismos. La mayor cantidad de producto crudo se obtuvo con 3 Ug (Tabla 8.10). Sin embargo, no es posible asegurar que el reactor con 4 Ug, no pueda alcanzar este valor, ya que como se mencionó anteriormente solo operó por 32 h debido a la formación de espuma. En cuanto a 2 Ug fue el que menor CMC dio y la cantidad de producto fue un poco menos de la mitad que la obtenida con 3 y 4. El producto de 1 Ug no fue cuantificado ya que la dispersión de aceite dio 2 unidades menores que las anteriores y el comportamiento del microorganismo demostró que crecía mejor en aireaciones mayores. La actividad tenso activa en cuanto a CMC de 3 y 4 Ug fueron similares, siendo ligeramente mejor 4 Ug.

**Tabla 8.8.** Efecto de la aireación sobre la tensión superficial del biosurfactante obtenido en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato.

<b>Ug</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Tensión superficial (mN/m)</b>			
0	53.07 ± 0.07	54.07 ± 0.02	52.87 ± 0.02	54.51 ± 0.04
24	30.73 ± 0.06	30.78 ± 0.08	30.18 ± 0.07	29.98 ± 0.02
48	29.20 ± 0.06	29.35 ± 0.03	29.00 ± 0.03	28.80 ± 0.05 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Este reactor operó 32 h. Ug: velocidad superficial del gas

**Tabla 8.9.** Efecto de la aireación sobre la dispersión de aceite del biosurfactante obtenido en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato.

<b>Ug</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Dispersión de aceite (cm)</b>			
0	1.03 ± 0.05	1 ± 0.00	1 ± 0.00	1.13 ± 0.11
24	7.37 ± 0.11	10.43 ± 0.11	8.43 ± 0.11	11.8 ± 0.10
48	10 ± 0.00	11.7 ± 0.17	12 ± 0.00	12.27 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Este reactor operó 32 h. Ug: velocidad superficial del gas

**Tabla 8.10.** Evaluación de la cantidad de producto crudo producido en reactor airlift a diferentes Ug's y utilizando aceite nuevo de cocina como sustrato.

<b>Ug</b>	<b>Producto crudo a las 48 h (g/L)</b>	<b>CMC (mg/L)</b>
2	5.04	1000 (TS 30.62 ± 0.06 mN/m)
3	11.98	2500 (T.S. 31.25 ± 0.05 mN/m)
4	10.38 <sup>a</sup>	2500 (T.S. 30.7 ± 0.06 mN/m)

<sup>a</sup> Producción a 32 h.

## 8.8 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato

Debido a que no se apreció diferencia significativa entre 3 y 4 Ug's se optó por realizar una cinética de crecimiento y producción de biosurfactante con ambas aireaciones.

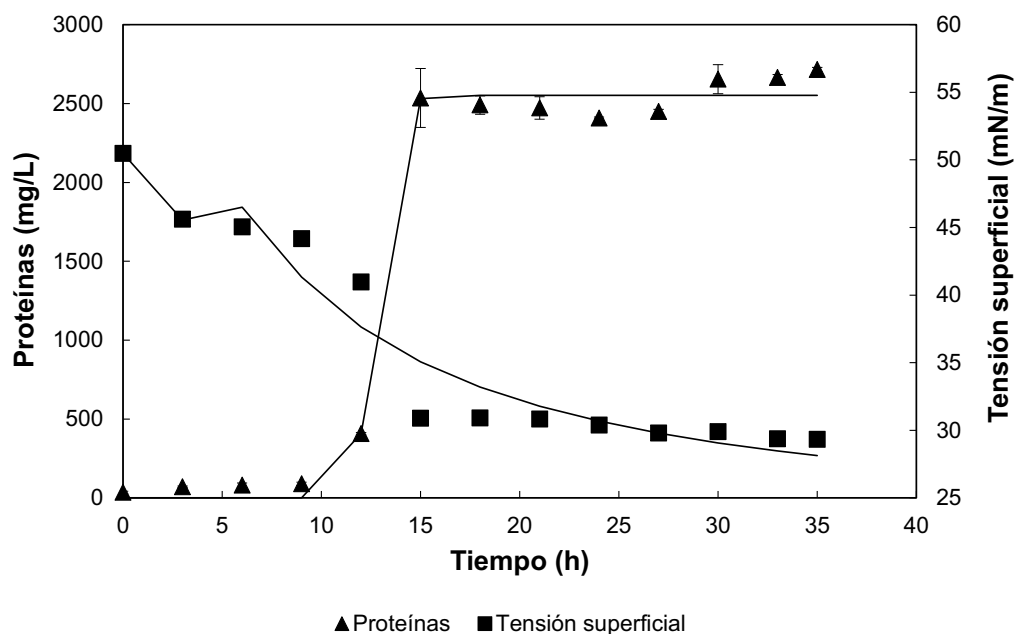
El crecimiento fue similar en ambos casos; donde la fase lag duró 9 h seguida de un crecimiento exponencial hasta las 15 h y posteriormente se presentó la fase estacionaria (Fig. 8.16 y 8.18). Estos valores fueron menores que los obtenidos a nivel matraz. Resultado que fue favorable, ya que al utilizar un reactor lo que se busca es reducir los tiempos de operación y maximizar la cantidad de producto.

Sin embargo al evaluar sus constantes cinéticas vemos que siguieron un comportamiento diferente; con 3 Ug el microorganismo presentó una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.5582 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 1.24 h; mientras que con 4 Ug se tuvo una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.2013 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 3.44 h.

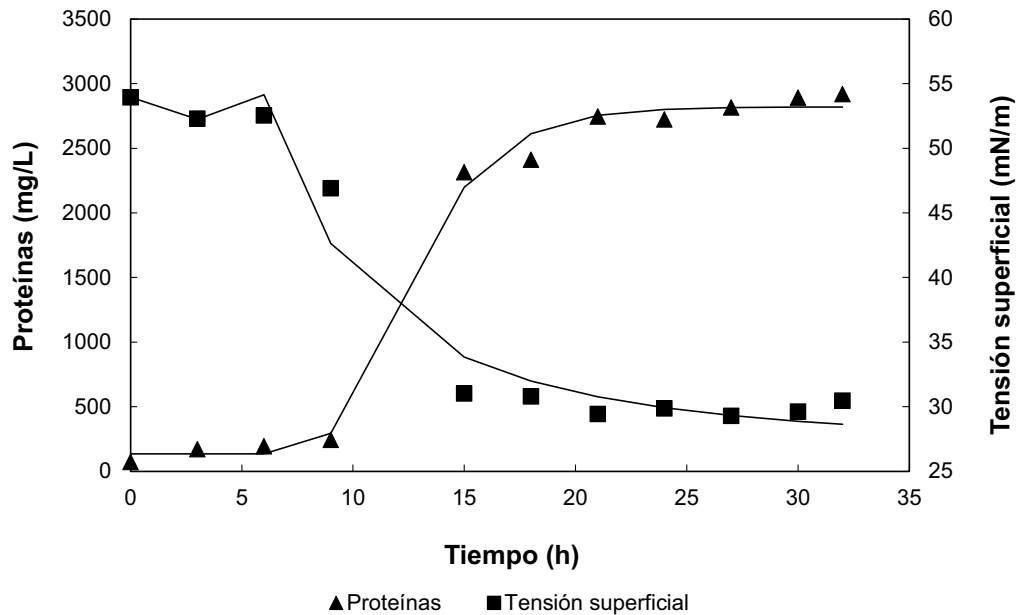
Lo anterior nos indica que el microorganismo se adapta más rápido cuando la aireación es menor, tomando en cuenta la variable dispersión de aceite (Fig. 8.18 y 8.19) se observó que para 3 Ug's su máximo (12 cm) se alcanzó hasta las 30 h, mientras que con 4 Ug's desde las 24 h se obtuvo este valor. Saharan *et al.* (2011) trabajaron con *N. erythropolis* y *A. calcoaceticus* para la producción de biosurfactante y observaron que dicha producción se incrementa cuando hay mayor aireación.

En cuanto a la tensión superficial para ambas Ug's alcanzó su mínimo (29 mN/m) a partir de las 24 h y este valor se mantuvo constante hasta el final de la evaluación.

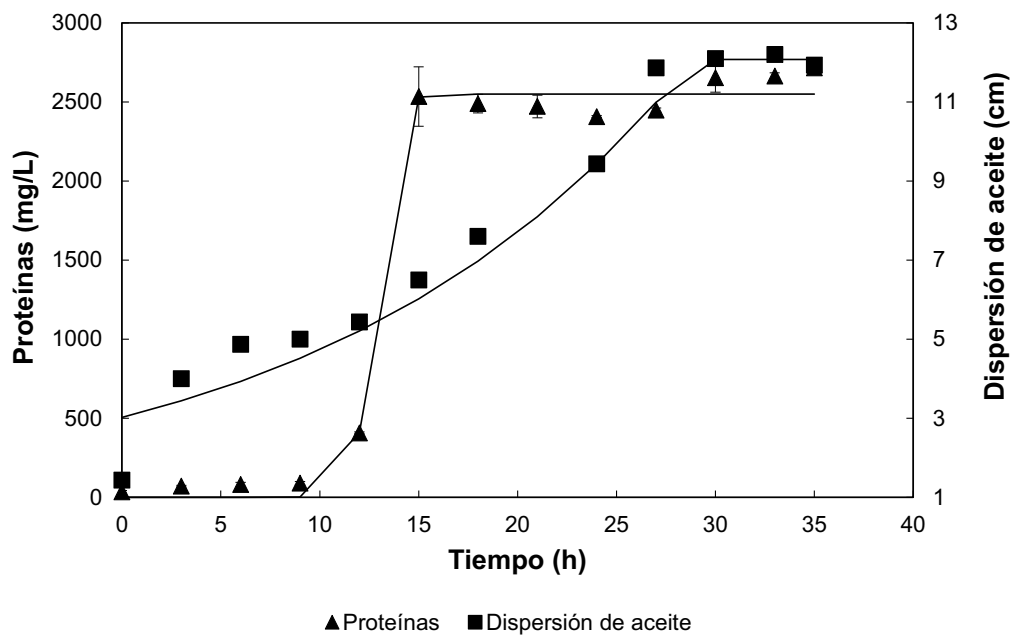
Xia *et al.* (2013) evaluaron la producción de BS de *Pseudomonas aeruginosa* a nivel reactor con un reactor tipo tanque agitado de 3000 L con 200 rpm y 300 L aire/ h obteniendo un producto que reducía la TS a 26 mN/m hasta las 36 h, 12 h después del obtenido en el presente estudio.



**Figura 8.16** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 3 Ug.

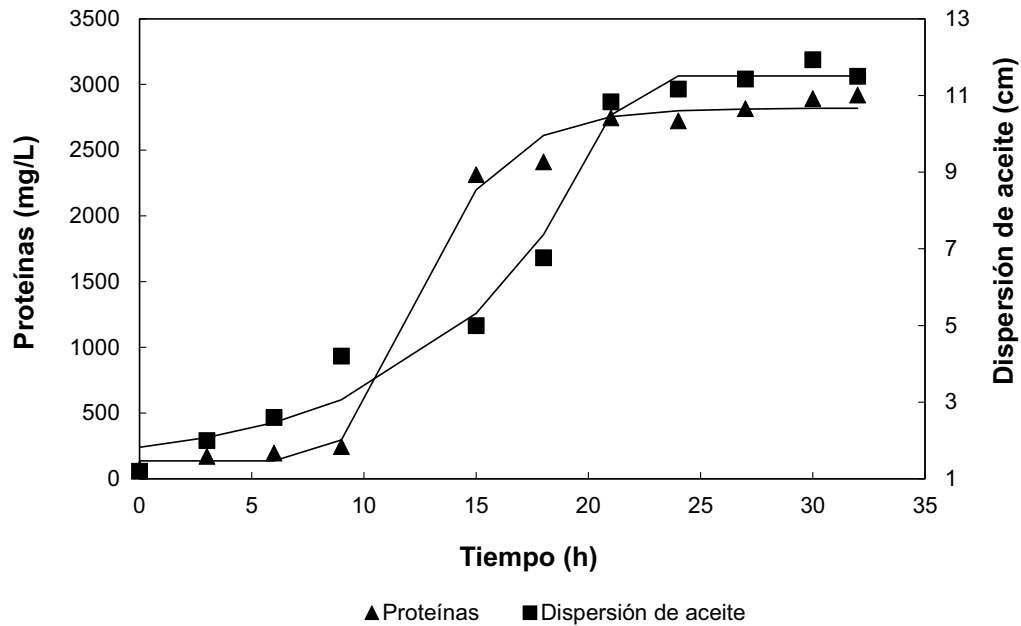


**Figura 8.17** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 4 Ug.



**Figura 8.18** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 3 Ug.





**Figura 8.19** Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite nuevo de cocina como sustrato y 4 Ug.

Los productos crudos de ambos reactores fueron cuantificados a diferentes tiempos (Tabla 8.11) apreciándose que desde las 9 h la producción con 4 Ug fue mayor, por lo que se eligió esta aireación para la producción de biosurfactante con AGC como sustrato (sección 8.9).

**Tabla 8.11** Cuantificación de producto crudo con 3 y 4 Ug's y ANC como fuente de carbono.

Tiempo (h)	Producto 3 Ug's (g/L)	Producto 4 Ug's (g/L)
0	0	0
9	2.51	3.17
21	4.83	5.22
24	7.86	9.22
32	8.71	11.73

## **8.9 Evaluación del crecimiento y producción de biosurfactante en reactor airlift con aceite gastado de cocina como sustrato**

La evaluación de crecimiento de la cepa IMP-P con AGC como sustrato y en reactor airlift se realizó con una aireación de 4 Ug, de acuerdo a los resultados observados en la sección 8.8. Considerando, que se seleccionó la máxima aireación y que con esta había mayor producción de espuma en el reactor, durante la cinética de producción de BS con la cepa IMP-P y AGC, se implementó un sistema eliminador o retenedor de espuma como se describe en la sección 7.12. Este sistema consistió de una malla con alfileres y una manguera acoplados al reactor, con la finalidad de que pudiera operar más tiempo sin que se vaciara totalmente por la formación excesiva de espuma.

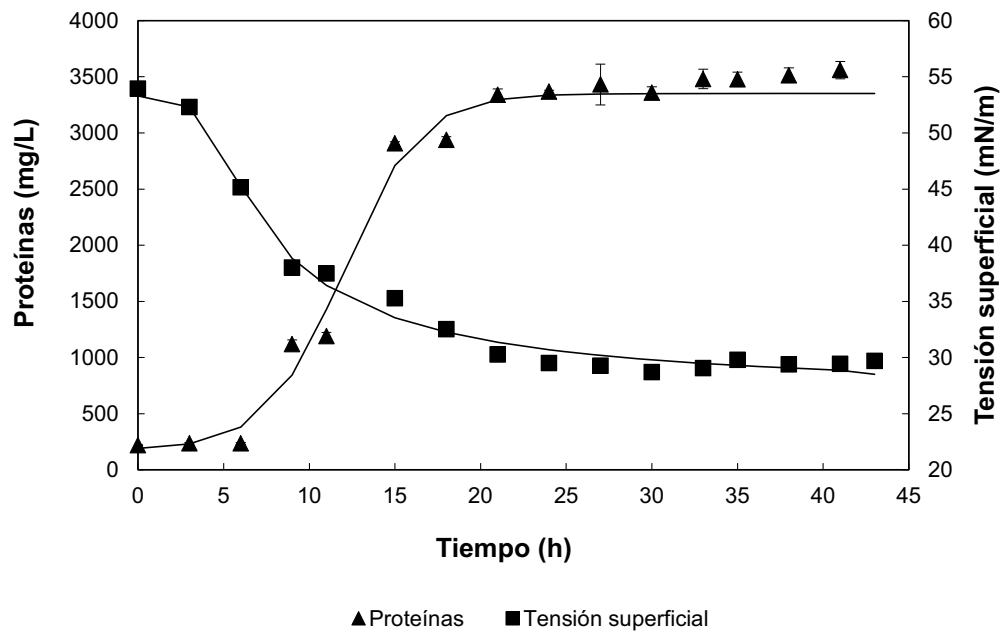
El microorganismo presentó un perfil similar que el obtenido a nivel reactor con ANC como fuente de carbono (sección 8.8); pero presentó una fase lag o de adaptación de 6 h, seguido de un crecimiento exponencial hasta las 21 h y una fase estacionaria hasta las 48 h; este comportamiento puede atribuirse a que la fuente de carbono fue de más fácil acceso al microorganismo, ya que al ser un aceite quemado las cadenas de lípidos pueden ser más cortas y además tener ácidos grasos libres (Choe y Min, 2007).

En esta evaluación el microorganismo presentó una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.0911 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 7.61 h; al compararlos con su análogo a nivel matraz se observa que la  $\mu$  fue casi el doble mientras que el  $t_d$  equivale a la mitad. Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que al utilizar un reactor se aceleró el crecimiento del microorganismo, obteniendo mayor cantidad de bioproducto en un menor tiempo de operación.

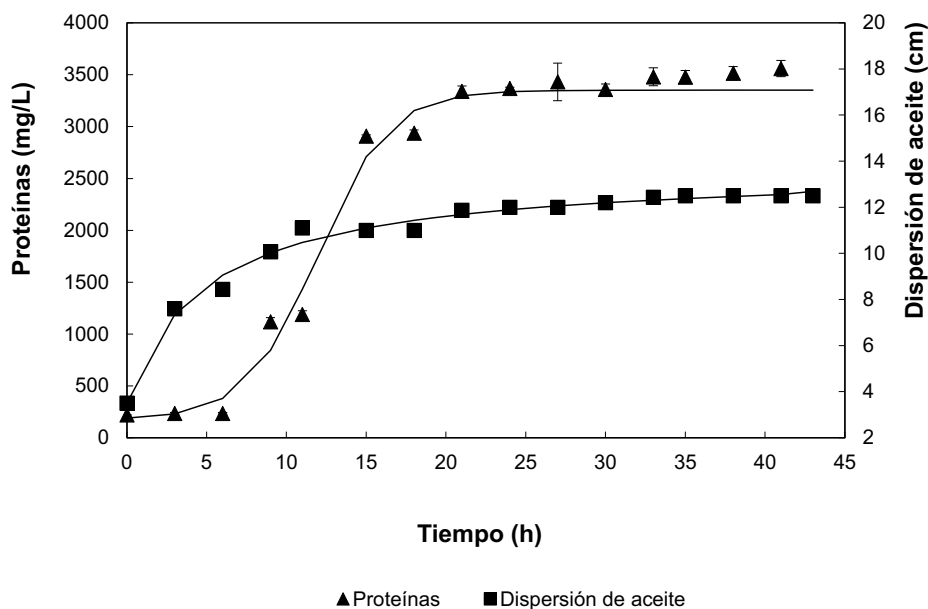
Al igual que en los sistemas anteriores (nivel matraz con AGC y reactor con ANC) el crecimiento estuvo ligado con la producción de BS ya que presentó una

disminución de la TS hasta 29 mN/m a las 24 h, valor que se mantuvo constante hasta las 48 h (Figura 8.20).

La dispersión de aceite también fue indicativa de la producción de BS y tuvo una correlación indirecta con la TS. En este caso el BS produjo dispersión de aceite de 12 cm desde las 24 h sin embargo alcanzó su valor máximo (12.5 cm) a las 35 h, el cual se mantuvo constante hasta las 48 h (Figura 8.21).



**Figura 8.20** Evaluación de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y tensión superficial, cultivada en reactor airlift con aceite de gastado de cocina como sustrato y 4 Ug.



**Figura 8.21** Evaluación de crecimiento y producción de biosurfactante de la cepa IMP-P, mediante la evaluación de proteína y dispersión de aceite, cultivada en reactor airlift con aceite gastado de cocina como sustrato y 4 Ug

Para conocer el punto de máxima producción de producto crudo, se liofilizó el sobrenadante a partir de las 24 horas y se apreció que la máxima producción se da a las 41 h (Tabla 8.12). Sin embargo, no se buscaba solamente la mayor cantidad de producto, sino que además tuviera la mejor actividad tensoactiva. Por lo que a todos los productos liofilizados se les evaluó su CMC (Figura 8.22) y su DMC (antes de procesarlos) (Tabla 8.12). Con estos resultados se observó que los mejores tiempos para la producción de biosurfactante estaban entre las 35 y las 43 h, donde se obtuvieron los mejores rendimientos de producto crudo y las mejores DMC (Tabla 8.12). Los tiempos 35, 38 y 41 no tuvieron diferencia significativa en cuanto a su DMC y TS, sin embargo, el mayor rendimiento de biosurfactante crudo se obtuvo a las 41 h. Además, en estos tiempos también se obtuvieron las mejores CMC de 750 a 1000 mg/L (Fig. 8.22). Por lo que se seleccionó el tiempo 41 h para realizar la cosecha puntual y las pruebas de estabilidad del BS; ya que fue donde se encontró mayor cantidad de producto

crudo, sin encontrar diferencias significativas con los tiempos 35 y 38 h en cuanto a CMC y DMC.

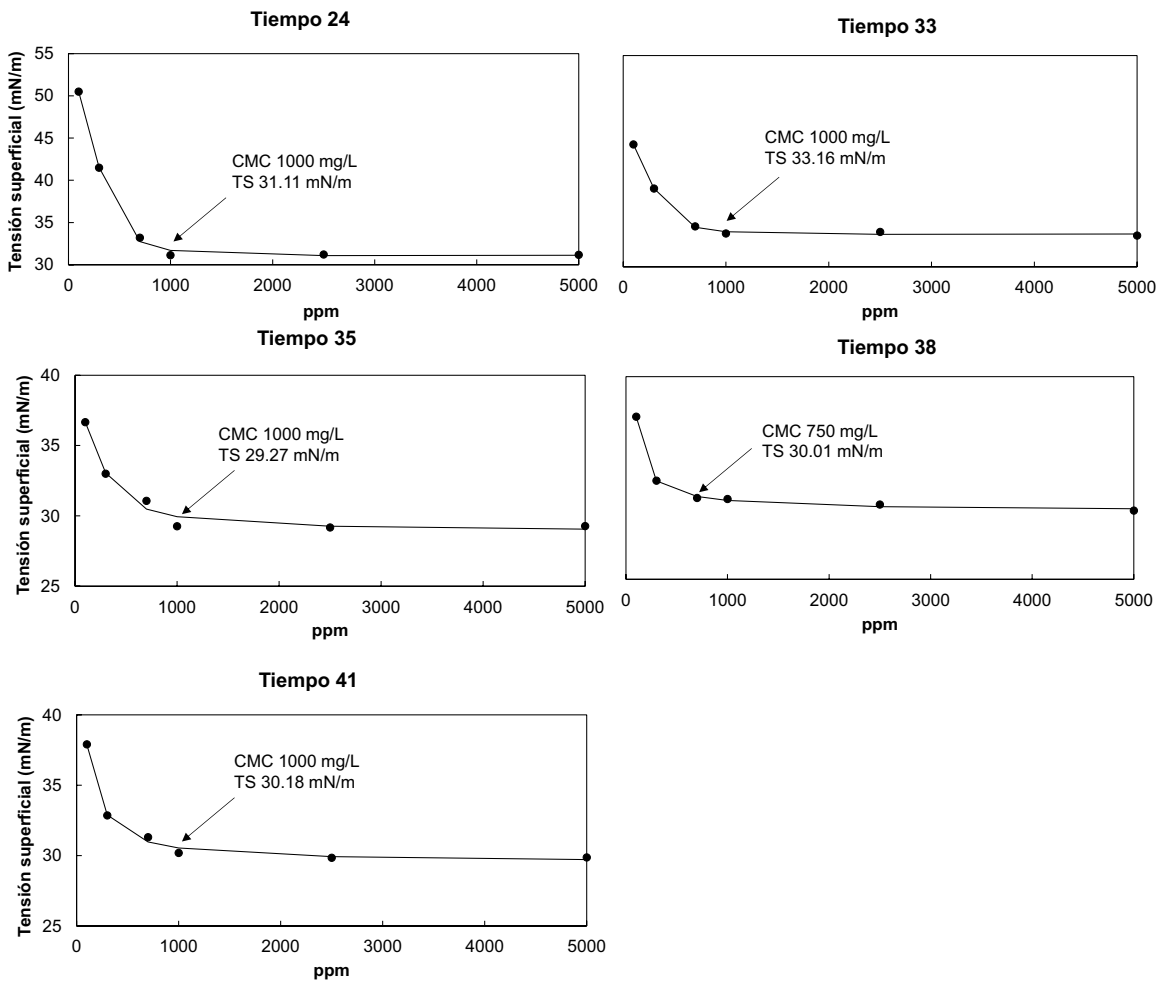
Aunque el biosurfactante obtenido a las 43 h tenía una DMC de 1:32, este tiempo fue descartado debido a que el producto contenido en el sobrenadante era difícil de manipular, ya que presentaba una nata que no se eliminaban con la centrifugación, ni con alguna forma de extracción, además su CMC fue mayor que las anteriores.

Rocha y Silva *et al.* (2014) evaluaron la DMC del biosurfactante producido por *Pseudomonas capacia* apreciando que solamente era estable con una dilución 1:2 a las 144. Por otro lado, el biosurfactante producido por la cepa IMP-P soporta diluciones de 1:16 desde las 35 h, que lo hace un producto sumamente atractivo para ser utilizado en campo sin ningún tratamiento posterior.

**Tabla 8.12** Evaluación del sobrenadante y producto crudo con biosurfactante provenientes del reactor airlift con AGC como sustrato y 4 Ug.

Tiempo (h)	DMC	Producto (g/L)
0	0 ( 72.3 ± 0.02 mN/m)	6.24
24	1:4 (30.76 ± 0.04 mN/m)	5.27
27	1:8 (30.79 ± 0.03 mN/m)	5.03
30	1:8 (29.83 ± 0.04 mN/m)	4.87
33	1:8 (30.1 ± 0.02 mN/m)	8.52
35	1:16 (30.34 ± 0.04 mN/m)	11.29
38	1:16 (30.22 ± 0.05 mN/m)	11.32
41	1:16 (30.05 ± 0.04 mN/m)	13.64
43	1:32 (30.45 ± 0.08 mN/m)	12.93

AGC: Aceite gastado de cocina

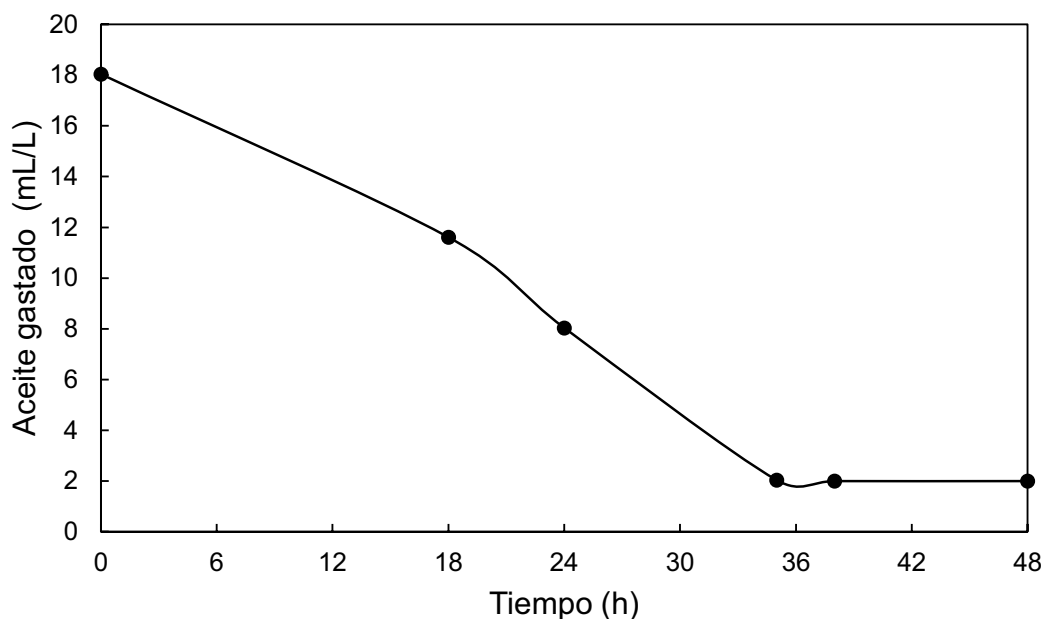


**Figura 8.22** Evaluación de la tensión superficial y CMC del producto crudo cosechado del reactor airlift con AGC como sustrato y a 4 Ug a diferentes tiempos.

El sustrato residual (AGC) en el reactor fue cuantificado, apreciándose que a las 35 h ya se había consumido el 89% (Fig. 8.23) con una constante de degradación de  $0.4535 \text{ h}^{-1}$ . Lo anterior muestra que la producción de BS es una alternativa viable para el uso de estos residuos.

Sadouk *et al.* (2008) utilizaron 27 g/L de aceite residual de girasol para el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* teniendo un consumo del 98.5 % a las 336 h, mientras que Xia *et al.* (2013) trabajaron con *Pseudomonas aeruginosa*

también con un sustrato residual de aceite de girasol (30 g/L) teniendo un consumo del 90.98%, durante la producción de biosurfactante. Por lo tanto, los resultados de este trabajo están en el intervalo reportado y es posible inferir que el microorganismo pueda degradar una mayor cantidad de sustrato (AGC) si se cultiva durante un tiempo mayor.



**Figura 8.23** Evaluación del sustrato (aceite gastado de cocina) durante el cultivo de la cepa IMP-P en reactor airlift.

### 8.11 Evaluación de la estabilidad del BS

La aplicación de los biosurfactantes depende de su estabilidad a diferentes condiciones, como son la temperatura, salinidad y pH. Por esta razón es importante evaluar la estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-P y así determinar su margen y límite de aplicación a nivel industrial.

El sobrenadante proveniente del reactor airlift a las 41 horas, utilizando AGC como sustrato y con 4 Ug, se utilizó para evaluar la estabilidad del biosurfactante producido por cepa IMP-P a condiciones extremas. En las figuras 8.24 y 8.25, se pudo apreciar que tanto la temperatura como la salinidad no tuvieron mayor impacto en la actividad tensoactiva del biosurfactante, manteniendo su TS estable durante la evaluación.

La temperatura no tuvo efecto desfavorable sobre la TS que el biosurfactante produce, manteniéndose en un valor de TS alrededor de 28 mN/m hasta los 120° C durante 4 h (Fig. 8.26). Este resultado es similar al reportado para la cepa NY3BS de *Pseudomonas aeruginosa* por Nie *et al.* (2010), donde el biosurfactante obtenido es estable al calentarlo a 120 °C, pero durante 1 h.

Sin embargo el BS producido por otros microorganismo, como *Bacillus subtilis* (Mukherjee *et al.*, 2007) era estable solamente hasta 80°C por 60 min.

Durante la evaluación del efecto de la salinidad (NaCl) sobre el biosurfactante producido por la cepa IMP-P (Fig. 8.26), se observó que la TS que produce se mantiene estable hasta salinidades de 30%, con valores de TS entre 28-29 mN/m. Yataghene *et al.*, (2008) observaron que el biosurfactante producido con *Pseudomonas fluorescens* era estable a concentraciones de 10-30% de salinidad, ya que la tensión superficial no se afectaba.

Lo anterior implica que el biosurfactante producido por la cepa IMP-P puede utilizarse en un amplio rango de salinidades desde 0-300 g/L de NaCl.

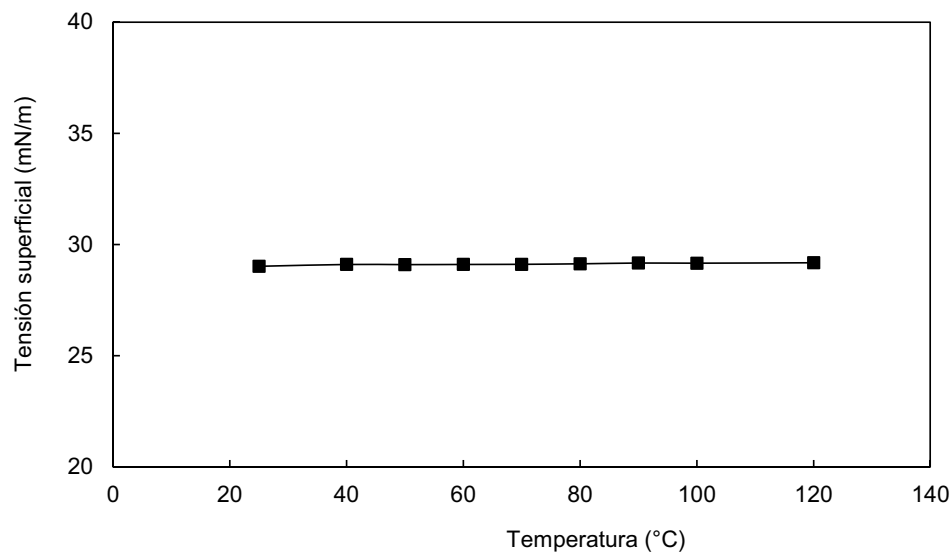
En cuanto al pH, es un parámetro que afectó la capacidad tensoactiva del biosurfactante producido por la cepa IMP-P, ya que a pH ácidos (menores a 6) se tuvo un aumento de 6.5 unidades de TS y en pH básicos (mayores a 12) aumentó 4 unidades en TS (Figura 8.27).



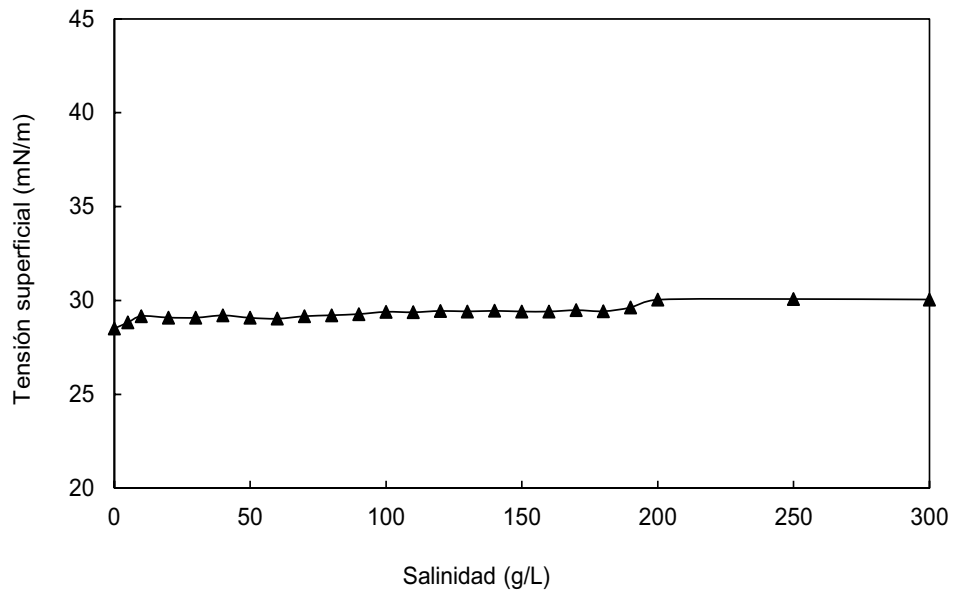
Yataghene *et al.* (2008) trabajaron con el BS producido por *Pseudomonas fluorescens*, el cual produce una tensión superficial de 30.5 mN/m y al someterlo a diferentes valores de pH, con un pH de 1.5 presentó un cambio en tensión superficial (38 mN/m) y a un pH de 12 la tensión fue de 29.5 mN/m.

En otros trabajos reportan que el BS obtenido por *Pseudomonas aeruginosa* a valores de pH entre 6 a 10 no afectaron la actividad tensoactiva del mismo (Abalos *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2009).

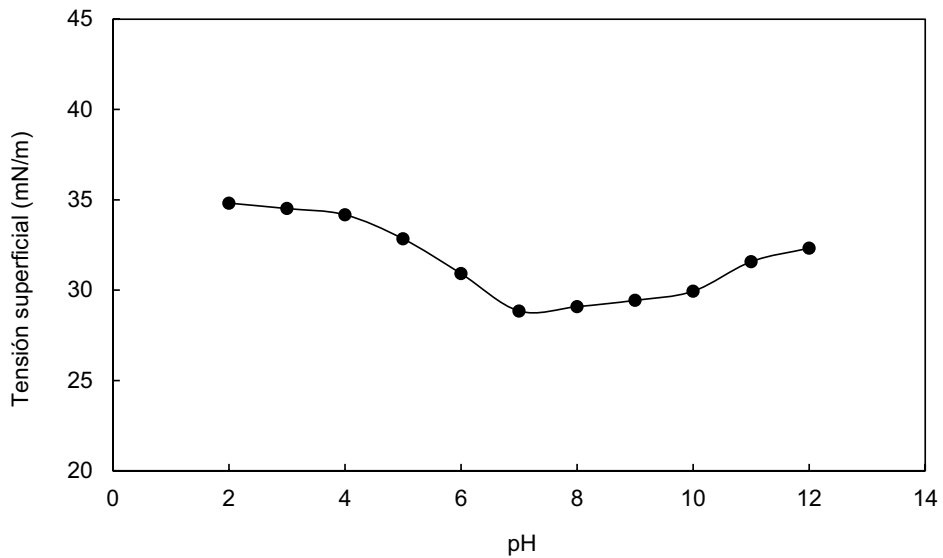
Los resultados de estabilidad del biosurfactante producido por la cepa IMP-P indican que es un producto estable a condiciones de temperatura de 25 a 120° C, a salinidades de 0-300 g/L de NaCl y a pH de 6 a 10. Por lo tanto, su aplicación puede ser factible en industrias que trabajan a estas condiciones, como la industria petrolera.



**Figura 8.24** Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes temperaturas



**Figura 8.25** Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes salinidades



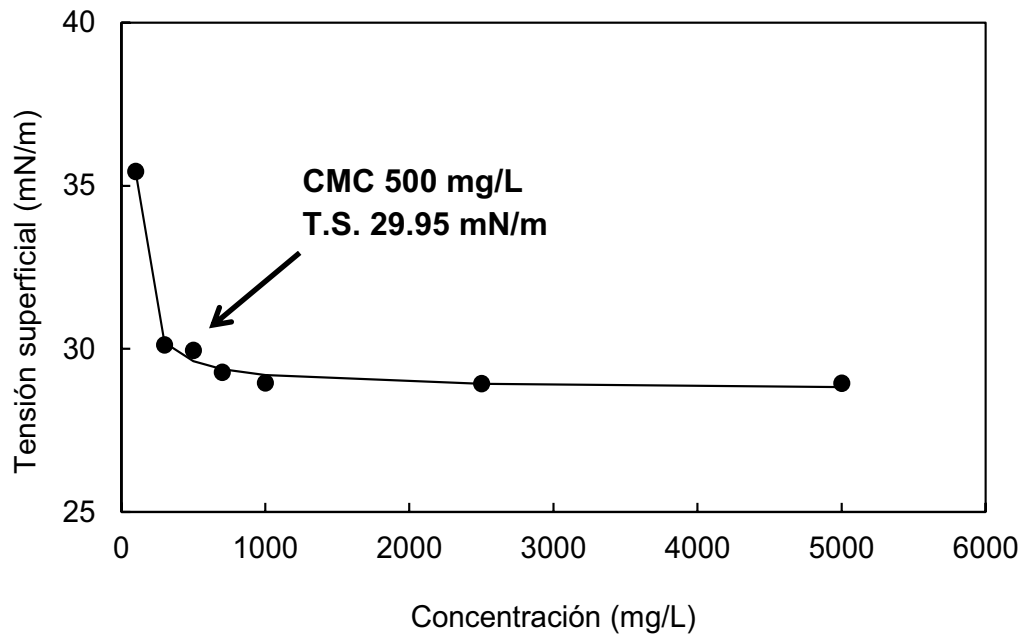
**Figura 8.26** Evaluación de la estabilidad del BS producido por la cepa IMP-P sometido a diferentes valores de pH

## 8.12 Purificación parcial del biosurfactante

El biosurfactante producido por la cepa IMP-P en reactor airlift utilizando AGC como sustrato fue parcialmente purificado. A partir del sobrenadante libre de células, se llevó a cabo la purificación parcial como se indica en la sección 7.15. Al producto obtenido (polvo) se le evaluó su actividad tensoactiva a diferentes concentraciones de biosurfactante y se determinó su CMC (Figura 8.27). Se observó una CMC menor (500 mg/L) a la obtenida con el producto crudo liofilizado (1000 mg/L). Lo anterior se puede atribuir a que este producto parcialmente purificado tiene menos impurezas que causan interferencia.

En cuanto a la cantidad de producto parcialmente purificado se obtuvo aproximadamente la mitad (6.2 g/L) del producto crudo liofilizado (13.6 g/L), Esta cantidad de biosurfactante se encuentra en el rango reportado por diferentes autores (Tabla 8.13), quienes han obtenido producción de biosurfactante con microorganismos desde 1.4 hasta 7 g/L.

Respecto a la actividad tensoactiva, se puede apreciar que el producto parcialmente purificado de la cepa IMP-P tiene una CMC de 500 mg/L con TS de 29 mN/m, por lo tanto, este bioproducto es mejor que algunos surfactantes químicos, como el Tween 80, SDS y el Igepal CO-880 y 970, además de algunos biológicos como el producido por *Lactococcus lactis* 53 (Rodrigues *et al.*, 2006) y *Bacillus subtilis* (Zhi-feng *et al.*, 2010), de los cuales se reportan CMC's más altas (Tabla 8.13).



**Figura 8.27** Evaluación de la tensión superficial con el producto parcialmente purificado (biosurfactante) de la cepa IMP-P a diferentes concentraciones. CMC: Concentración micelar crítica., TS: tensión superficial

**Tabla 8.13** Parámetros tensoactivos de surfactantes producidos por microorganismos y de origen químico

<b>Biosurfactante producido por microorganismo</b>	<b>Rendimiento (g/L)</b>	<b>CMC (mg/L)</b>	<b>TS (mN/m)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Biológicos</b>				
IMP-P	6.196	500	29.95	Este trabajo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4		200	29	Pornsunthorntawee <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas sp</i>	4.97	100	30	Aparna <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PACL	3.3			De Lima <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus paracasei</i>		250	41.8	Gudiña <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactococcus lactis</i> 53	1.4	2900	36	Rodrigues <i>et al.</i> 2006
<i>Bacillus subtilis</i> C9	7	100	28.5	Kim <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus subtilis</i>	1.64	2960	45.9	Zhi-feng <i>et al.</i> , 2010
<b>Químicos</b>				
Tween 80		1250	37	Chandran y Das, 2010
SDS		1280	28.6	Pornsunthorntawee <i>et al.</i> , 2008
Igepal CO-880		535.4		Van Hamme y
Igepal CO-970		31449.5		Ward (1999)

### 8.13 Rendimiento del proceso

Para determinar el rendimiento del producto crudo parcialmente purificado se realizaron algunas consideraciones:

- El contenido de proteína microbiana equivale al 50 % del peso seco de la célula (Madigan, 2012).
- La biomasa microbiana está constituida aproximadamente del 45-50% de carbono (Quintero, 1990).
- En la literatura está reportado que *Pseudomonas aeruginosa* produce biosurfactantes del tipo ramnolípidos (Soberón, 2011), los cuales se producen en una mezcla de mono y di-ramnolípidos y sus diferentes isómeros. Debido a que no se tenía la caracterización química del biosurfactante producido por la cepa IMP-P, se tomó en cuenta la anterior información, pero considerando la fórmula condensada de un ramnolípidos promedio:  $C_{32}H_{58}O_{13}$  (Ricalovic *et al.*, 2011).

La estimación del rendimiento para el producto parcialmente purificado (Anexo IV) arrojó un rendimiento de biomasa con respecto al consumo de sustrato ( $Y_{X/S}$ ) de 0.32, un rendimiento de producto con respecto al consumo de sustrato ( $Y_{P/S}$ ) de 0.34, y un rendimiento de otros productos ( $CO_2$ , entre otros) con respecto al consumo de sustrato ( $Y_{Otros\ producto/S}$ ) de 0.34.

Amani *et al.* (2015) cultivaron *Pseudomonas aeruginosa* con aceite de girasol en un reactor tipo tanque agitado, obteniendo un rendimiento  $Y_{X/S}$  de 0.54 y  $Y_{P/S}$  de 0.059 a las 42 h. Comparando estos resultados con lo obtenido en este trabajo para la cepa IMP-P en reactor airlift, observamos que aunque el rendimiento de biomasa fue mayor, el rendimiento de producto fue aproximadamente una quinta parte del obtenido por la cepa IMP-P.

#### **8.14 Análisis económico de la producción de biosurfactante considerando la materia prima y el consumo energético en reactor airlift**

Para estimar el costo de producción del biosurfactante a nivel reactor airlift escala laboratorio, se consideró únicamente:

- El costo de los nutrientes necesarios para el medio de cultivo, tanto en grado reactivo como grado industrial. .
- El costo de la energía eléctrica consumida por los equipos utilizados para la producción del biosurfactante.
- Si el biosurfactante producido es utilizado como sobrenadante (medio de cultivo libre de células) o si debe ser liofilizado para su aplicación (Tablas 8.14 y 8.15).

Cabe señalar, que no se consideró un costo para el AGC; sin embargo, cuando este proceso se realice a gran escala debe considerarse el costo de recolección, transporte y almacenamiento del mismo.

Para el costo de la energía eléctrica se utilizó la tarifa H-M (2015) que corresponde a los servicios de media tensión, con una demanda de 100 kilowatts o más. Además, se consideró la región del Distrito Federal, así como los cargos por el tipo de energía (punta, intermedia y de base), el horario y día de uso (Anexo III).

Con estos resultados, se puede apreciar que el producto liofilizado (Tabla 8.14 y 8.15) aumenta considerablemente el costo del producto. Sin embargo, con los resultados previos de actividad tensoactiva se observó que el biosurfactante producido por la cepa IMP-P puede utilizarse como sobrenadante libre de células. Además, dependiendo de la aplicación que se le dé al BS, puede o no llevar un tratamiento posterior. Bajo estas condiciones este sobrenadante puede

permanecer en almacenamiento en refrigeración (4° C) hasta 3 meses con la misma actividad tensoactiva. Por lo tanto, para su aplicación en campo para la extracción de crudo podría ser factible utilizarlo inmediatamente desde que se produce y hasta 3 meses después.

Por su parte el uso de sales grado industrial para un litro de medio implica un ahorro en el medio de cultivo de MXN \$ 4.32 (Tabla 8.15). Sin embargo el uso de un sustrato residual solamente representa MXN \$0.30, ya que la concentración de sustrato es baja, sin embargo si se aumenta la misma se podrá ver reflejado el 30% del costo de producción que menciona Bachman *et al.* (2009)

El más bajo costo de producción (MXN \$30.92 /L) para el biosurfactante producido por la cepa IMP-P se obtuvo cuando se utilizó AGC como sustrato, sales grado industrial y cuando se utiliza como sobrenadante.

Rodríguez y Olivera (2006) evaluaron el costo de producción de los BS producidos por *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, que resultó ser más alto que el obtenido en este trabajo, considerando solamente las sales del medio de cultivo (US \$66 /L para *Lactococcus lactis* y US \$331 /L para *Streptococcus thermophilus*).

A nivel comercial 1 L de ramnolípido al 5% y pureza de 90% es vendido en US \$100 por la compañía AGAE Technologies en Estados Unidos. En México este producto puede ser adquirido mediante la empresa Sigma Aldrich la cual oferta 10 mg de ramnolípido al 95% a MXN \$ 6,585.00.

Con lo anterior se observa que nuestro proceso pudiera ser más rentable que los actualmente utilizados, sin embargo para hacer un análisis completo, real y exhaustivo hace falta considerar el costo de capital invertido, mantenimiento del equipo, tratamiento y disposición de residuos, almacenamiento de materia prima y mano de obra. Se ha reportado que los costos de operación para la producción de



biosurfactantes incluyen: materias primas (10-30%), equipos (20-80%), consumibles (1-50%), servicios (1-30%), mano de obra (5-30%), mantenimiento (1-40%) y otros (0-20%) (Kosaric & Van-Sukan, 2015)

**Tabla 8.14** Análisis económico para la producción de BS utilizando sales grado reactivo.

	<b>Medio mineral</b>	<b>Energía eléctrica</b>	<b>Costo total (\$/L)</b>
<b>Sustrato: AGC</b>			
Sin liofilizar	\$ 4.49	\$ 30.75	\$ 35.25
Liofilizado	\$ 4.49	\$ 150.19	\$ 154.68
<b>Sustrato: ANC</b>			
Sin liofilizar	\$ 4.79	\$ 30.75	\$ 35.55
Liofilizado	\$ 4.79	\$ 150.19	\$ 154.98

**Tabla 8.15** Análisis económico para la producción de BS utilizando sales grado industrial.

	<b>Medio mineral</b>	<b>Energía eléctrica</b>	<b>Costo total (\$/L)</b>
<b>Sustrato: AGC</b>			
Sin liofilizar	\$ 0.17	\$ 30.75	\$ 30.92
Liofilizado	\$ 0.17	\$ 150.19	\$ 150.36
<b>Sustrato: ANC</b>			
Sin liofilizar	\$ 0.47	\$ 30.75	\$ 31.22
Liofilizado	\$ 0.47	\$ 150.19	\$ 150.96

## 9. Conclusiones

- La cepa IMP-P mostró capacidad para producir BS, ya que redujo la tensión superficial hasta 28 mN/m y tuvo halos de dispersión de aceite de hasta 12 cm.
- La cepa IMP-P creció en un sustrato aceitoso sin usar (nuevo) y en un sustrato aceitoso residual, con resultados similares en cuanto a la producción de biosurfactante.
- La optimización del medio de cultivo indicó que el parámetro más significativo para la producción de BS con la cepa IMP-P es la fuente de nitrógeno, siendo el  $\text{NaNO}_3$  el más adecuado. El mejor tratamiento para la producción de biosurfactante fue aquel que utiliza  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno, 15 mL/L de sustrato, 5% de inóculo y agitación de 200 rpm a nivel matraz.
- El escalamiento de la producción de biosurfactante de matraz a reactor tipo airlift a nivel laboratorio fue factible, con una producción de 13 g/L a las 41 h, actividad tensoactiva de 29 mN/m y CMC de 1000 mg/L. La evaluación de la aireación indicó que 3 y 4 Ug's son las más adecuadas para la producción de biosurfactante.
- El BS obtenido en reactor airlift a escala laboratorio muestra una alta estabilidad a condiciones extremas, sin mostrar efecto ante la temperatura (de 25 a 120° C) y salinidad (0-300 mg/L) y siendo estable en pH de 6 a 10.
- Los reactores airlift son una alternativa viable para la producción de biosurfactantes, representando un bajo costo de producción.
- El biosurfactante parcialmente purificado presentó mejor actividad tensoactiva que el biosurfactante crudo (sobrenadante), ya que presentó una CMC de 500 mg/L, TS de 29 mN/m y un rendimiento de 6 g/L.

- El costo de la materia prima y consumo energético para el BS crudo (sobrenadante) con sales industriales y AGC como sustrato fue de MXN \$30.92.
- El aceite gastado de cocina es una fuente alternativa sustentable y viable para la producción de biosurfactante, y al ser un residual contaminante, se mitiga un problema ambiental, con beneficio técnico, ecológico y económico, ya que puede ser aplicado en la industria del petróleo en la recuperación mejorada de hidrocarburos y en procesos de biorremediación.

## 10. Perspectivas a futuro

A pesar de haberse obtenido una cantidad considerable de producto con actividad tensoactiva y estabilidad del BS similar o mejor que otros reportados, el proceso puede optimizarse aún más, considerando:

- Evaluar concentraciones mayores de aceite, y determinar si la cepa IMP-P es capaz de degradar mayores cantidades de aceite y así obtener mayor cantidad de producto.
- Analizar el crecimiento de la cepa IMP-P y la producción de BS en un reactor airlift a escala piloto.
- Optimizar la purificación del biosurfactante y caracterizarlo químicamente.
- Evaluar la aplicación del BS para biorremediación de suelos contaminados.
- Evaluar el efecto del BS sobre diferentes tipos de aceites crudos (petróleo) y determinar el efecto tensoactivo que provocan o propiedad reológica que modifican en dichos aceites.
- Evaluar la aplicación del BS en sistemas modelo para la recuperación de aceite.

## 11. Referencias

- Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A., Bastida, J., (2002), Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10, J. Chem. Technol. Biotechnol., 77(7): 777-784.
- Abbasi, H., Hamed, M. M., Lotfabad, T. B., Zahiri, H. S., Sharafi, H., Masoomi, F., Moosavi-Movahedi, A. A., Ortiz, A., Amanlou, M., Noghabi, K. A., (2012), Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, J. Biosci. Bioeng., 113 (2): 211-219.
- Adamczak, M., Bednarski, O. W., (2010), Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida Antarctica*, Biotechnol. Lett., 22(4): 313-316.
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B., (2014), Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery, Colloids. Surface. B: Biointerfaces., 114: 324-333.
- Ahmed, E. F., Hassan, S. S., (2012), Effect of media composition (carbon and nitrogen sources) on the production of bioemulsifier from *Serratia marcescens* S10, J. Biotechnol., 6(2): 9-14.
- Amani, H., (2015), Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micromodel, J. Pet. Sci. Eng., 128: 212-219.
- Amani, H., Sarrafzadeh, M. H., Haghighi, M., Mehrnia, M. R., (2010), Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, J. Pet. Sci. Eng., 75: 209-214.
- Amézcuca V.C., Ferrera C.R., Esparza G.F., Ríos L.E., Rodríguez V., (2004), Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *Pseudomonas putida*, J. Environ. Health., 11(12): 2983-2991.
- Anandaraj B., Thivakaran P., (2010), Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil, J. Biosci. and Technol., 1(3): 120-126.

- Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H., (2012), Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B, *Colloid. Surface. B.*, 95: 23-29.
- Anyanwu, Chukwudi, U., (2010), Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleumcontaminated soil, *Int. J. Environ Sci.*, 1(2): 225-235.
- Bachmann, R. T., Johnson, A. C., Edyvean, R. G., (2014), Biotechnology in the petroleum industry: An overview, *Int. biodeterior. biodegrad.*, 86: 225-237.
- Barros, F. F. C., Ponezi, A. N., Pastore, G. M., (2008), Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate, *J. ind. microbiol. Biot.*, 35 (9): 1071-1078.
- Batista S.B., Munteer A.H., Amorim F.R., Tótola M.R., (2006), Isolation and characterization of biosurfactant / bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites, *Bioresour. Technol.*, 97: 868–875.
- 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, *J. Food. Eng.*, 54(4): 283-288.
- Bodour A.A., Drees P.K., Maier M.R., (2003), Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils, *Appl and Environ. Microbiol.*, 69(6): 3280-3287.
- Bordoloi, N.K., Konwar, B. K., (2009), Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons, *J. Hazard. Mater.*, 170: 495-505
- Bradford M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bryant, R.S., & Douglas, J., (1988), Evaluation of Microbial Systems in Porous Media for EOR, *Res. Eng.*, 489–495.
- Cardoso F. G., Fonseca A.P.F., Nele M., Zarur C.M.A., (2010), Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*, *J. Biomedicine Biotechnol.*, 1-8.

- Castorena-Cortés, G., Zapata-Peñasco, I., Roldán-Carrillo, T., Reyes-Avila, J., Mayol-Castillo, M., Román-Vargas, S., Olguín-Lora, P., (2012), Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoirs with potential MEOR application, *J. Petrol. Sci. Eng.*, 81: 86-93.
- Centeno da Rosa, C. F., Michelon, M., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., Veiga Burkert, C. A., (2010), Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol, *J. Biotechnol.*, 9(53): 9012-9017.
- Chandran P. y Das N., (2010), Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *trichosporon adahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil, *International J. Eng. Sci. Technol.*, 2(12): 6942-6953.
- Chisti, M. Y., & Moo-Young, M., (1987), Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations, *Chem. Eng. Commun.*, 60(1-6): 195-242.
- Chisti Y. y Jáuregui-Haza U.J., (2002), Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors, *Biochem. Eng. J.*, 10: 143-153.
- Choe, E., & Min, D. B. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food. Sci.*, 72(5): R77-R86.
- Costa, S., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., & Contiero, J., (2006), Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, *Process. Biochem.*, 41(2): 483-488.
- De Lima, C. J. B., Ribeiro, E. J., Servulo, E. F. C., Resende, M. M., Cardoso, V. L., (2009), Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152(1): 156-168.
- Díaz M.R. (2011). Tesis de doctorado: Estudio del flujo con reactores por tres fases de simulación. Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Dubey, K., & Juwarkar, A., (2001), Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production, *World J. Micro. Biot.*, 17(1): 61-69.
- Fahim, S., Dimitrov, K., Vauchel, P., Gancel, F., Delaplace, G., Jacques, P., Nikov, I., (2013), Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*, *Biochem. Eng. J.*, 76: 70-76.

- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A., (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, Appl. Environ. Microb., 48(2): 301-305.
- Guerrero C.A., Guerrero R.A., Sierra F.E., (2011) Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. In Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies, Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-713-0. Ch. 2, 23-44.
- Gudiña E.J., Teixeira J.A., Rodriguez L.R., (2010), Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*, Colloid. Surface. B., 76: 298-304.
- Fahim H., Dimitrov K., Vauchel P., Gancel F., Delaplace G., Jacques P., Nikov I., (2013), Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*, Biochem. Eng. J., 76: 70-76.
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., Manresa, A., (2000), Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils, J. Appl. Microb., 88(3): 379-387.
- Joshi S., Bharucha C., Jha S., Yadav S., Nerurkar A., Desai A.J., (2008), Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions, Bioresour. Technol., 99: 195–199.
- Kanga, S.H., Bonner J.S., Page, C.A., Mills, M.A., Autenrieth, R.L., (1997), Solubilization of naphthalene from crude oil using biosurfactants, Environ. Sci. Technol., 31: 556-561.
- Karanth N.G.K., Deo P.G., VeenanadigN.K. (1999) Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Sci., 77: 116-126.
- Khire J. M., (2010), Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR), 672: 146-157.
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Lee, C. H., Suh, H. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1997), Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, J. ferment. Bioeng., 84(1): 41-46.
- Kosaric N., Vardar-Sukan F. (2015), Biosurfactants Production and Utilization- Processes, Technologies and Economies, Taylor & Francis Group, LLC.



- Lang, S., Wullbrandt, D., (1999), Rhamnolipids-Biosynthesis, microbial production and application potential. *App. Microbiol. Biotech.*, 51(1) : 22-32.
- Lizardi-Jiménez, M. A., Saucedo-Castañeda, G., Thalasso, F., & Gutiérrez-Rojas, M. (2012). Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor. *Chem. Eng. J.*, 187: 160-165.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P.V., Clark D. P. (2012). *Brock Biología de los microorganismos*, 13ª Edición, Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20(1): 48-52.
- Mercadé, M. E., Manresa, E. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andrés, C., Guinea, J., (1993), Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production, *Bioresour. Technol.*, 43: 1–6.
- Merchuk, J. C. (2003). Airlift bioreactors: review of recent advances. *Can. J. Chem. Eng.*, 81(3-4): 324-337.
- Mohan, S. V., Sirisha, K., Rao, R. S., & Sarma, P. N. (2007), Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil: process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology, *Ecotox. Environ. Safe.*, 68(2): 252-262.
- Montgomery C.D. (2005). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa Wiley.
- Montgomery C.D. y Runger G. C. (2002). *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería*. Limusa Wiley.
- Mukherjee, A. K. (2007), Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations, *Lett. App. Microb.*, 45(3): 330-335.
- Müller, M. M., Hörmann, B., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 87(1): 167-174.

- Mulligan C.N., (2005), Environmental applications for biosurfactants, Environ. Pollution. 133: 183-198.
- Mutalik S.R., Vaidya B.K., Joshi R.M., Desai K.M., Nene S.N (2008), Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus spp.* MTCC 2574, Bioresour. Technol., 99:7875–7880.
- Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., & Shen, Q., (2010), Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. Biotech. Adv., 28(5): 635-643.
- Nitschke, M., Costa, S. G., Haddad, R., Gonçalves, G., Lireny, A., Eberlin, M. N., Contiero, J., (2005), Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI, Biotechnol. Prog., 21(5): 1562-1566.
- Noah, K. S., Fox, S. L., Bruhn, D. F., Thompson, D. N., Bala, G. A., (2002), Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor, App. Biochem. Biotechnol., 98 (100): 803-813.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S., (2011), Environmental applications of biosurfactants: recent advances, Int. J. Mol. Sc., 12(1): 633-654.
- Perfumo, A., Rancich I., Banat I.M., (2010), Possibility and challenges for biosurfactant uses in petroleum industry, Adv. Explo. Med. Biol., 672: 135-145.
- Petróleos Mexicanos (2012) Las reservas de hidrocarburos.
- Pornsunthorntawe O., Wongpanit P., Chavadej S., Abe M., Rujiravanit R., (2008), Structural and physiochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil, Biores. Technol., 99: 1589-1595.
- Pruthi V., Cameotra S.S. (1997). Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. World J. Microbiol. and Biotechnol., 13: 133-135.
- Pruthi V., Cameotra S.S., (2000), Novel sucrose lipid production by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery, J. Surfactants Deterg., 3(4): 533-537.

- Quintero, Rodolfo. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. México, Editorial Alambra, 1990.
- Rahman K.S.M, Rahman T.J., McClean S., Marchant R., Banat, I.M., (2002), Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials, *Biotechnol*, 1277-1281.
- Raiger, I. L., López N., (2009), Los biosurfactantes y la industria petrolera, *QuimicaViva*, 3(8): 146-161.
- Raza, A. Z., Khan, M. S., Khalid, Z., M., Rehman, A., (2007), Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes, *Biotechnol Lett.*, 28:1623–1631.
- Reis, R. S., Da Rocha, S. L. G., Chapeaurouge, D. A., Domont, G. B., Santa Anna, L. M. M., Freire, D. M. G., Perales, J., (2010), Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production, *Process Biochemistry*, 45(9): 1504-1510.
- Rikalovic, M. G., Gojic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M., & Karadzic, I., (2012), Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san ai. *J. Serb. Chem. Soc.*, 77(1): 27-42.
- Rocha e Silva, N. M. P., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., (2014) Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3: 132-139
- Roldán-Carrillo T., Martínez-García X., Zapata-Peñasco I., Castorena-Cortés G., Reyes-Ávila J., Mayol-Castillo M., Olguín-Lora P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 86: 384-389.
- Rosero, N. G., Dugarte, F., Pimienta, A. L., Díaz, M. P., Carvajal, F. G., (2002), Producción de un tensoactivo biológico, *Revista colombiana de biotecnología*, 1 (IV).
- Rosillo-Calle F., Pelkmans L., Walter A., (2009), A Global Overview of Vegetable Oils, with Reference to Biodiesel.  
<http://www.bioenergytrade.org/downloads/vegetableoilstudyfinaljune18.pdf>

- Rufino, R. D., Luna, J. M., Sarubbo, L. A., Rodrigues, L. R. M., Teixeira, J. A. C., Campos-Takaki, G. M., (2011), Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988, Colloid. Surface. B., 84(1): 1-5.
- Sadouk, Z., Hacene, H., & Tazerouti, A., (2008), Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain, Oil Gas Sci. Technol., 63(6): 747-753.
- Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D., (2011), A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. Genet. Eng. Biotechnol. J., 2011(1): 1-14.
- Sahoo, S., Datta, S., & Biswas, D. (2011). Optimization of culture conditions for biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1., J. Adv. Sci. Res., 2 (3): 32-36
- Salehizadeh H., Mohanmadizad S., (2009), Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis* Irani, J. Biotech., 7(4): 216-223.
- Sarafzadeh, P., Niazi, A., Oboodi, V., Ravanbakhsh, M., Hezave, A. Z., Ayatollahi, S. S., Raeissi, S., (2014), Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stearothermophilus* SUCPM # 14 (biosurfactant-producing strains) in carbonated reservoirs, J. Petrol. Sci. Eng., 113: 46-53.
- Shah, Vishal, Jurjevic M., Badia D., (2007), Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production, Biotech. Progr., 23(2): 512-515.
- Shaw J. D., (1992), Introduction to Colloid and Surface Chemistry., Ed. Butterworth Heinemann. Fourth Edition. London.pp 64-73.
- SEMARNAT, (2012), Inventario de Residuos Sólidos del Distrito Federal.
- Soberón-Chávez, G. (2010). Biosurfactants: from genes to applications (Vol. 20). Springer Science & Business Media.
- Tahzibi A., Kamal F., Mazaheri A., (2004), Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant, Iran. Biomed. J., 8: 25-31.
- Urum K., Pekdemir T., (2004), Evaluation of biosurfactant for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere, 57: 1139-1150.

- Vargas N. L. (2015). Tesis de licenciatura: Evaluación de un microorganismo productor de biomoléculas tensoactivas con aplicación en la industria petrolera. Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.
- Van Hamme J.D., Ward O.P., (1999), Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture, *J. Microbiol.*, 45: 130-137.
- Wei Y.H., Lai H.C., Chen S.Y., Yeh M.S., Chang J.S., (2004), Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SM $\Delta$ R defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein, *Biotechnol. Lett.*, 26: 799-802.
- Winterburn, J. B., & Martin, P. J. (2012). Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnol. Lett.*, 34(2): 187-195.
- Wu, J. Y., Yeh, K. L., Lu, W. B., Lin, C. L., Chang, J. S., (2008), Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site, *Bioresource Technol.*, 99(5): 1157-1164.
- Xia W.J., Luo Z.B., Dong H.P., Yu L., (2013), Studies of biosurfactant for Microbial Enhanced Oil Recovery by using bacteria isolated from the formation water of petroleum reservoir, *Pet. Sci. Tech.*, 31: 2311-2317.
- Yataghene M. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., (2008), Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1), 143-151.
- Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., He B., (2009), Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochem.*, 44: 302–308.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, 56(3): 339-347.
- Youssef H.N., Simpson D.R., Duncan K.E., McInerney M.J., Folmsbee M., Fincher T., Knapp R.M., (2007), In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(4):1239–1247.

- Zhang, Y. I. M. I. N., & Miller, R. M., (1992), Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant), *App. Env. Microbiol.*, 58(10), 3276-3282.
- Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., & Scherr, K. E., (2012), Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Chem. Eng. J.*, 209: 138-146.
- Zhi-feng L., Guang-ming Z., Hua Z., Hai-yan F., Xiao-lan L., (2010), Production and characterization of biosurfactante from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. *J. Cent. South Univ. Technol.*, 17: 516-521.

## ANEXO I

### Prueba bioquímica API 20 E realizada a la cepa IMP-P

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
Ortonitrofenol $\beta$ -galactósido	Negativo
Arginina	Positivo
Lisina	Negativo
Ornitrina	Negativo
Citrato de sodio	Positivo
Tiosulfato sódico	Negativo
Urea	Negativo
Triptofano deaminasa	Negativo
Indol	Negativo
Piruvato sódico	Positivo
Gelatina de Kohn	Positivo
Glucosa	Positivo
Manitol	Negativo
Inositol	Negativo
Sorbitol	Negativo
Ramnosa	Negativo
Sacarosa	Negativo
Melibiosa	Negativo
Amigdalina	Negativo
Arabinosa	Negativo
Oxidasa	Positivo

Estos resultados se procesaron en el banco de datos de la Compañía Biomeriux con 99.7% de confiabilidad.

**ANEXO II**

**Análisis estadístico de comparación de medias con la prueba de diferencia de medias significativa (dms)**

**Tabla A.1. Tratamiento de datos para la TS a las 24 h**

Tensión superficial 24 h									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
	28.35	29.2	31.58	29.64	28.92	28.71	29.09	29	
	28.32	29.19	31.53	29.62	28.91	28.59	29.04	28.88	
	28.28	29.18	31.46	29.53	28.82	28.57	29.03	28.85	
	29.21	28.91	29.37	29.52	29.01	28.74	29.18	28.89	
	29.18	28.89	29.28	29.49	28.98	28.71	29.16	28.89	
	29.17	28.8	29.25	29.48	28.97	28.69	29.15	28.88	
<b>Sum Yij</b>	172.51	174.17	182.47	177.28	173.61	172.01	174.65	173.39	1400.09
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	4961.09	5056.03	5556.65	5238.06	5023.43	4931.26	5083.79	5010.69	40860.99
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	4959.95	5055.86	5549.22	5238.03	5023.41	4931.24	5083.77	5010.68	40852.16
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	1.14	0.16	7.43	0.023	0.023	0.02	0.02	0.01	8.84
<b>Media</b>	28.75	29.03	30.41	29.55	28.93	28.67	29.11	28.89	

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
<b>Tratamiento</b>	7	13.579	1.940	
<b>Error</b>	40	8.837	0.221	8.780
<b>Total</b>	47	22.416		



**Tabla A.2. Comparación de medias para la TS a las 24 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	-0.277	-1.660	-0.795	-0.183	0.083	-0.357	-0.147
<b>T2</b>	0.277	0.000	-1.383	-0.518	0.093	0.360	-0.080	0.130
<b>T3</b>	1.660	1.383	0.000	0.865	1.477	1.743	1.303	1.513
<b>T4</b>	0.795	0.518	-0.865	0.000	0.612	0.878	0.438	0.648
<b>T5</b>	0.183	-0.093	-1.477	-0.612	0.000	0.267	-0.173	0.037
<b>T6</b>	-0.083	-0.360	-1.743	-0.878	-0.267	0.000	-0.440	-0.230
<b>T7</b>	0.357	0.080	-1.303	-0.438	0.173	0.440	0.000	0.210
<b>T8</b>	0.147	-0.130	-1.513	-0.648	-0.037	0.230	-0.210	0.000

**Tabla A.3. Tratamiento de datos para la DA a las 24 h**

<b>Dispersión aceite 24 h</b>									
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	
	8.5	11.5	4.5	12	11.5	11.8	12	12.2	
	8.5	11.5	4.5	12	11.3	12	12	12.2	
	8.7	11	4.5	12	11.2	12	12	12.2	
	8	11.5	11	12	11.6	11.8	12	12.5	
	8	11.5	11	12	12	11.8	12	12.5	
	8	11.5	11.3	12	12	12	12	12.3	
<b>Sum Yij</b>	49.70	68.50	46.80	72.00	69.60	71.40	72.00	73.90	523.90
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	412.19	782.25	430.44	864.00	807.94	849.72	864.00	910.31	5920.85
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	411.68	782.04	365.04	864.00	807.36	849.66	864.00	910.20	5853.99
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	0.51	0.21	65.40	0.00	0.58	0.06	0.00	0.11	66.87
<b>Media</b>	8.28	11.42	7.80	12.00	11.60	11.90	12.00	12.32	

<b>Fuente de variación</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>
<b>Tratamiento</b>	7	135.83	19.40	
<b>Error</b>	40	66.87	1.67	11.61
<b>Total</b>	47	202.70		

**Tabla A.4. Comparación de medias para la DA a las 24 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	-3.133	0.483	-3.717	-3.317	-3.617	-3.717	-4.033
<b>T2</b>	3.133	0.000	3.617	-0.583	-0.183	-0.483	-0.583	-0.900
<b>T3</b>	-0.483	-3.617	0.000	-4.200	-3.800	-4.100	-4.200	-4.517
<b>T4</b>	3.717	0.583	4.200	0.000	0.400	0.100	0.000	-0.317
<b>T5</b>	3.317	0.183	3.800	-0.400	0.000	-0.300	-0.400	-0.717
<b>T6</b>	3.617	0.483	4.100	-0.100	0.300	0.000	-0.100	-0.417
<b>T7</b>	3.717	0.583	4.200	0.000	0.400	0.100	0.000	-0.317
<b>T8</b>	4.033	0.900	4.517	0.317	0.717	0.417	0.317	0.000

**Tabla A.5. Tratamiento de datos para la TS a las 48 h**

Tensión superficial 48h									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
	29.32	29.19	29.45	29.08	28.95	28.66	29.01	28.71	
	29.33	29.15	29.51	29.07	28.93	28.61	28.97	28.74	
	29.26	29.13	29.48	29.06	28.92	28.58	28.92	28.72	
	29.53	29.3	29.11	28.69	29.14	28.75	29.21	28.72	
	29.48	29.28	29.08	28.67	29.06	28.74	29.12	28.71	
	29.49	29.23	29.07	28.64	29.07	28.9	29.03	28.51	
<b>Sum Yij</b>	176.41	175.28	175.7	173.21	174.07	172.24	174.26	172.11	1393.28
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	5186.810	5120.537	5145.316	5000.530	5050.102	4944.504	5061.147	4937.013	40445.959
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	5186.748	5120.513	5145.082	5000.284	5050.061	4944.436	5061.091	4936.975	40445.190
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	0.062	0.024	0.235	0.245	0.041	0.068	0.056	0.037	0.768
<b>Media</b>	29.402	29.213	29.283	28.868	29.012	28.707	29.043	28.685	

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
<b>Tratamiento</b>	7	2.916	0.417	
<b>Error</b>	40	0.768	0.019	21.695
<b>Total</b>	47	3.684		

**Tabla A.6. Comparación de medias para la TS a las 48 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	0.188	0.118	0.533	0.390	0.695	0.358	0.717
<b>T2</b>	-0.188	0.000	-0.070	0.345	0.202	0.507	0.170	0.528
<b>T3</b>	-0.118	0.070	0.000	0.415	0.272	0.577	0.240	0.598
<b>T4</b>	-0.533	-0.345	-0.415	0.000	-0.143	0.162	-0.175	0.183
<b>T5</b>	-0.390	-0.202	-0.272	0.143	0.000	0.305	-0.032	0.327
<b>T6</b>	-0.695	-0.507	-0.577	-0.162	-0.305	0.000	-0.337	0.022
<b>T7</b>	-0.358	-0.170	-0.240	0.175	0.032	0.337	0.000	0.358
<b>T8</b>	-0.717	-0.528	-0.598	-0.183	-0.327	-0.022	-0.358	0.000

**Tabla A.7. Tratamiento de datos para la DA a las 48 h**

Dispersión aceite 48 h									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
	10.5	11.8	7.5	11.8	12	11.5	12.3	12.6	
	10.5	12	7.5	12	12	11.3	12.5	12.5	
	10.3	12	7.5	12	12	11.5	12.5	12.6	
	10.5	12	12	12.3	12	12.3	12.7	12.6	
	10.5	12	11.8	12.3	12	12.5	12.5	12.6	
	11.0	11.8	12.0	12.5	12	12.5	12.5	12.6	
<b>Sum Yij</b>	63.300	71.600	58.300	72.900	72.000	71.600	75.000	75.500	560.200
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	668.090	854.480	595.990	886.070	864.000	855.980	937.580	950.050	6612.240
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	667.815	854.427	566.482	885.735	864.000	854.427	937.500	950.042	6580.427
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	0.275	0.053	29.508	0.335	0.000	1.553	0.080	0.008	31.813
<b>Media</b>	10.550	11.933	9.717	12.150	12.000	11.933	12.500	12.583	

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
<b>Tratamiento</b>	7	42.426	6.061	
<b>Error</b>	40	31.813	0.795	7.620
<b>Total</b>	47	74.239		

**Tabla A.8. Comparación de medias para la DA a las 48 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	-1.383	0.833	-1.600	-1.450	-1.383	-1.950	-2.033
<b>T2</b>	1.383	0.000	2.217	-0.217	-0.067	0.000	-0.567	-0.650
<b>T3</b>	-0.833	-2.217	0.000	-2.433	-2.283	-2.217	-2.783	-2.867
<b>T4</b>	1.600	0.217	2.433	0.000	0.150	0.217	-0.350	-0.433
<b>T5</b>	1.450	0.067	2.283	-0.150	0.000	0.067	-0.500	-0.583
<b>T6</b>	1.383	0.000	2.217	-0.217	-0.067	0.000	-0.567	-0.650
<b>T7</b>	1.950	0.567	2.783	0.350	0.500	0.567	0.000	-0.083
<b>T8</b>	2.033	0.650	2.867	0.433	0.583	0.650	0.083	0.000

**Tabla A.9. Tratamiento de datos para la TS a las 72 h**

Tensión superficial 72 h									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
	29.33	29.13	29.87	29.42	29.17	29.15	28.92	28.29	
	29.35	29.11	29.82	29.4	29.15	29.09	28.91	28.27	
	29.31	29.08	29.79	29.37	29.13	29.06	28.86	28.24	
	30.12	29.26	29.48	28.9	28.62	28.68	28.93	28.32	
	29.97	29.17	29.46	28.88	28.6	28.65	28.91	28.31	
	30.03	29.14	29.42	28.86	28.52	28.61	28.87	28.3	
<b>Sum Yij</b>	178.110	174.890	177.840	174.830	173.190	173.240	173.400	169.730	1395.230
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	5287.964	5097.772	5271.392	5094.657	4999.623	5002.331	5011.264	4801.383	40566.386
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	5287.195	5097.752	5271.178	5094.255	4999.129	5002.016	5011.260	4801.379	40564.164
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	0.768	0.019	0.214	0.402	0.494	0.315	0.004	0.004	2.221
<b>Media</b>	29.685	29.148	29.640	29.138	28.865	28.873	28.900	28.288	

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
<b>Tratamiento</b>	7	8.607	1.230	
<b>Error</b>	40	2.221	0.056	22.139
<b>Total</b>	47	10.828		



**Tabla A.10. Comparación de medias para la TS a las 72 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	0.537	0.045	0.547	0.820	0.812	0.785	1.397
<b>T2</b>	-0.537	0.000	-0.492	0.010	0.283	0.275	0.248	0.860
<b>T3</b>	-0.045	0.492	0.000	0.502	0.775	0.767	0.740	1.352
<b>T4</b>	-0.547	-0.010	-0.502	0.000	0.273	0.265	0.238	0.850
<b>T5</b>	-0.820	-0.283	-0.775	-0.273	0.000	-0.008	-0.035	0.577
<b>T6</b>	-0.812	-0.275	-0.767	-0.265	0.008	0.000	-0.027	0.585
<b>T7</b>	-0.785	-0.248	-0.740	-0.238	0.035	0.027	0.000	0.612
<b>T8</b>	-1.397	-0.860	-1.352	-0.850	-0.577	-0.585	-0.612	0.000

**Tabla A.11. Tratamiento de datos para la DA a las 72 h**

<b>Dispersión aceite 72 h</b>									
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	
	10.8	12	12.3	12	10.8	11.8	12	12.5	
	10.9	12	12.5	12	10.8	11.8	11.8	12.5	
	10.8	12	12.5	12	10.8	11.8	11.8	12.5	
	9	12.5	12	12.4	9.5	12	12.5	12.5	
	9.2	12.5	12.2	12.5	9.3	12	12.5	12.3	
	9.2	12.5	12.5	12.5	9.5	12.2	12.5	12.5	
<b>Sum Yij</b>	59.900	73.500	74.000	73.400	60.700	71.600	73.100	74.800	561.000
<b>Sum Yij<sup>2</sup></b>	602.370	900.750	912.880	898.260	616.910	854.560	891.230	932.540	6609.500
<b>Y<sup>2</sup>/r</b>	598.002	900.375	912.667	897.927	614.082	854.427	890.602	932.507	6600.587
<b>Sum (Yij-Yi)<sup>2</sup></b>	4.368	0.375	0.213	0.333	2.828	0.133	0.628	0.033	8.913
<b>Media</b>	9.983	12.250	12.333	12.233	10.117	11.933	12.183	12.467	

<b>Fuente de variación</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>
<b>Tratamiento</b>	7	43.899	6.271	
<b>Error</b>	40	8.913	0.223	28.143
<b>Total</b>	47	52.812		

**Tabla A.12. Comparación de medias para la DA a las 72 h**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
<b>T1</b>	0.000	-2.267	-2.350	-2.250	-0.133	-1.950	-2.200	-2.483
<b>T2</b>	2.267	0.000	-0.083	0.017	2.133	0.317	0.067	-0.217
<b>T3</b>	2.350	0.083	0.000	0.100	2.217	0.400	0.150	-0.133
<b>T4</b>	2.250	-0.017	-0.100	0.000	2.117	0.300	0.050	-0.233
<b>T5</b>	0.133	-2.133	-2.217	-2.117	0.000	-1.817	-2.067	-2.350
<b>T6</b>	1.950	-0.317	-0.400	-0.300	1.817	0.000	-0.250	-0.533
<b>T7</b>	2.200	-0.067	-0.150	-0.050	2.067	0.250	0.000	-0.283
<b>T8</b>	2.483	0.217	0.133	0.233	2.350	0.533	0.283	0.000

**Anexo III**

**Consumo energético de los equipos utilizados**

Equipo	Consumo energético (W)	Consumo (h)			Costo (\$ / kWh)		
		Energía de punta	Energía intermedia	Energía base	Energía base	Energía de punta	Energía intermedia
Autoclave	2420	0	2	\$ 0.0	\$ 0.0	\$ 0.0	\$6.02
Centrifuga	1300	0	1	\$ 0.0	\$ 0.0	\$ 0.0	\$ 1.62
Bomba reactor	372.85	4	12	25	\$ 4.65	\$ 3.14	\$ 11.59
Calentamiento reactor	1500	4	12	25	\$ 18.71	\$ 12.65	\$ 46.63
Liofilizadora	1334	18	48	6	\$ 8.32	\$ 50.63	\$ 79.62

Energía. punta (\$/KWh)	2.1086	20-22h
Energía. Intermedia (\$/KWh)	1.2435	6-20 h / 22-24h
Energía. base (\$/KWh)	1.0397	0-6 a.m

### Componentes y costos del medio grado reactivo

Reactivo	Cantidad en el medio (mg/L)	Costo (\$/ kg)	Costo en el medio
NaNO <sub>3</sub>	4	\$ 710.00	\$ 2.84
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	\$ 1112.00	\$ 1.11
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	\$ 620.00	\$ 0.31
MgSO <sub>4</sub>	0.2	\$ 676.00	\$ 0.14
KCl	0.1	\$ 578.00	\$ 0.06
FeSO <sub>4</sub>	0.01	\$ 584.00	\$ 0.01
CaCl <sub>2</sub>	0.01	\$ 944.00	\$ 0.01
Levadura	0.01	\$ 2186.67	\$ 0.02
		Total	\$ 4.49

### Componentes y costos del medio grado industrial

Reactivo	Cantidad en el medio (mg/L)	Costo (\$/ kg)	Costo en el medio
NaNO <sub>3</sub>	4	\$5.04	\$0.02016
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	\$93.00	\$0.09300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	\$89.20	\$0.04460
MgSO <sub>4</sub>	0.2	\$5.90	\$0.00118
KCl	0.1	\$7.20	\$0.00072
FeSO <sub>4</sub>	0.01	\$1.60	\$0.00002
CaCl <sub>2</sub>	0.01	\$2.56	\$0.00003
Levadura	0.01	\$ 425.00	\$0.00850
		Total	\$0.16820

Cotizaciones de REPROQUIFIM y SERVICOI en Julio 2015

## Anexo IV Calculo de rendimiento

Parámetro	Unidades	Valor	Rendimiento	Valor
Sustrato (AGC) inicial	mL/L	15	$Y_{X/S}$	0.3212
Sustrato (AGC) inicial	g/L	13.7565	$Y_{P/S}$	0.3357
Densidad AGC	g/mL	0.9171	$Y_{P/B}$	1.0451
Sustrato utilizado	%	89		
Sustrato utilizado	g/L	12.2433	$Y_{\text{otros bioproductos}}$	0.3431
CT en AGC	%	89		
CT en sustrato utilizado	g/L	10.8965		
Biomasa (Proteína)	g/L	3.5		
Proteína microbiana del peso seco de células	%	50		
Biomasa Total (Peso seco)	g/L	7		
CT Biomasa	%	50		
CT Biomasa cepa IMP-P	g/L	3.5		
Biosurfactante producido	g/L	6.2		
CT Biosurfactante*	%	59		
PM biosurfactante	g/mol	650.79		
CT Biosurfactante	g/L	3.658		