

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE DE LOS METABOLITOS
EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR *Sinorhizobium meliloti* UTILIZANDO
DISTINTAS FUENTES DE CARBONO**

**JENNIFER YURANI MONTOYA CARO
LUIS ÁNGEL SALCEDO TELLEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE DE LOS METABOLITOS
EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR *Sinorhizobium meliloti* UTILIZANDO
DISTINTAS FUENTES DE CARBONO**

**JENNIFER YURANI MONTOYA CARO
LUIS ÁNGEL SALCEDO TELLEZ**

**Trabajo de grado para optar el título de
INGENIERO QUÍMICO**

Directora:

**Prof. VIVIANA SANCHEZ TORRES
Ingeniera Química, Ph.D. en Ingeniera Química**

Codirector:

**JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS
Ingeniero Químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

Dedico este trabajo principalmente a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, por darme salud, fortaleza y valor para alcanzar esta meta tan anhelada.

A mi madre, por su amor, esfuerzo y sacrificio en todos estos años, gracias a tí he logrado llegar hasta aquí y convertirme en la persona que soy hoy en día.

A mi hermanita por estar siempre presente, acompañándome y brindame apoyo moral a lo largo de esta etapa de mi vida.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en realización de todos mis sueños y metas.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito, en especial a aquellas personas que me abrieron las puertas y me compartieron sus conocimientos.

Jennífer Yurani Montoya Caro

*Este trabajo está dedicado primero a Dios por darme sabiduría,
salud para poder alcanzar este logro.*

*A mi madre por su gran sacrificio, su amor incondicional, sus
valores, enseñarme a luchar y poder levantarme de cada tropiezo,
por educarme, guiarme en cada paso de mi vida.*

*A mi padre por sus consejos, por nunca dejarme desfallecer, por
hacerme fuerte antes las adversidades ayudándome en cada decisión
difícil.*

*A mis hermanos por su comprensión, sus ánimos y ayudas
constantes.*

*A mi familia, compañeros y amigos de que una forma u otra
hicieron posible este sueño.*

LUIS ANGEL SALCEDO TELLEZ

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Ingeniería Química.

A la Facultad de Ingenierías Físicoquímicas por su apoyo con la auxiliatura de investigación asignada para el desarrollo del proyecto.

Nuestro más amplio agradecimiento a la Doctora Viviana Sánchez Torres, directora de este trabajo de grado, por su valiosa orientación, apoyo y respaldo para la culminación de este.

Al ingeniero Jorge Alberto Albarracín por el interés y la confianza depositada en nuestro trabajo, como codirector de esta tesis.

Al Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente - GIMBA por la disposición de los laboratorios y suministro de materiales y equipos.

A Yury López y Sthefany Espinosa por la orientación en el laboratorio.

A todos nuestros compañeros de laboratorio por las buenas experiencias y brindarnos ánimo en los momentos difíciles y a todas las personas que hicieron parte de este proceso.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 GENERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 SURFACTANTES	18
3.2 BIOSURFACTANTES.....	18
3.3 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	19
3.4 FUENTES DE CARBONO	19
3.4.1. Glucosa.....	19
3.4.2. Glicerol puro.....	20
3.4.3. Residuos agroindustriales.....	20
3.4.3.1. Efluentes de la extracción de aceite de palma.....	20
3.4.3.2. Glicerol crudo.....	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1 MICROORGANISMO.....	22
4.2 PRECULTIVO	22
4.3 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS.....	22
4.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN (E24).....	23

4.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL (TS)	23
4.6 DETECCIÓN DEL BIOSURFACTANTE	24
4.7 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE	24
4.8 CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRASFORMADA DE FOURIER (FTIR)	25
4.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) .	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR	26
5.2 EVALUACIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO	27
5.2.1 Curvas de crecimiento.	27
5.2.2 Ensayo de la gota colapsada.	28
5.2.3 Tensión superficial.	29
5.2.4 Índice de emulsificación (E24).	30
5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES.....	32
5.3.1 Caracterización con espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	32
5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRITICA (CMC) ...	34
6. CONCLUSIONES	37
7. RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	43

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Velocidad específica de crecimiento para todos los medios.....	28
Tabla 2. Prueba de gota colapsada para todos los medios de cultivo.	28
Tabla 3. Porcentajes de índice de emulsificación con cada fuente de carbono.	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de un tensioactivo donde se muestra la cabeza polar y la cola hidrofóbica	188
Figura 2. Tensión superficial de microorganismos evaluados	266
Figura 3. Representación de las curvas de crecimiento en cada uno de los medios evaluados.	277
Figura 4. Prueba de gota colapsada para el mejor tiempo del medio POME + fosfatos + (NH ₄) ₂ SO ₄	299
Figura 5. Porcentaje de disminución de la tensión superficial con todas las fuentes de carbono.	30
Figura 6. Prueba de los medios con mayor %E24.....	31
Figura 7. Espectro FTIR de la fase superior obtenido de los medios POME + fosfatos + (NH ₄) ₂ SO ₄ y glicerol crudo producido por la cepa <i>S. meliloti</i>	32
Figura 8. Espectro FTIR de la fase cloroformo obtenido del medio POME + fosfatos + (NH ₄) ₂ SO ₄ producido por la cepa <i>S. meliloti</i>	33
Figura 9. CMC glicerol crudo	34
Figura 10. CMC POME+Fosfatos+(NH ₄) ₂ SO ₄	35

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Aplicaciones potenciales de los biosurfactantes.	444
Anexo B. Análisis del glicerol crudo.	455
Anexo C. Recetas de todos los medios de cultivo empleados	466
Anexo D. Selección del microorganismo.	499
Anexo E. Representación gráfica de la tensión superficial para todas las fuentes de carbono evaluadas.	50

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SURFACTANTE DE LOS METABOLITOS EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR *Sinorhizobium meliloti* UTILIZANDO DISTINTAS FUENTES DE CARBONO*.

AUTOR: JENNIFER YURANI MONTOYA CARO**, LUIS ANGEL SALCEDO TELLEZ**

PALABRAS CLAVE: Biosurfactantes, POME, glicerol, *Sinorhizobium meliloti*.

CONTENIDO:

Con la finalidad de darle un valor agregado a los residuos agroindustriales: efluentes generados en el proceso de extracción de aceite de palma (POME) y el glicerol crudo, éstos fueron evaluados como fuente de carbono de bajo costo para la producción de biosurfactante de la cepa *Sinorhizobium meliloti*. Se formuló una receta con el POME, en donde se estudió el efecto de emplearlo solo, con adición de fosfatos, o con adición de fosfatos y una fuente de nitrógeno. Se realizó la prueba de la gota colapsada como un ensayo cualitativo para determinar la actividad surfactante lograda por la cepa en cada uno de los medios preparados con las diferentes fuentes de carbono y se corroboró con la medición de la tensión superficial (TS). Se encontró que en el medio con glicerol crudo se logró una mayor reducción en la TS, presentando una disminución del 24,4% de la tensión, además mostró la mejor acción emulsificante con aceite de cocina residual (Índice de emulsificación $E_{24} = 27,6\%$). Se realizó una extracción y purificación de los biosurfactantes secretados en el medio de cultivo con glicerol crudo y POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizando una solución cloroformo: metanol relación 2:1, para la caracterización se empleó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, por último, se determinó la concentración micelar crítica de los dos medios caracterizados, arrojando los valores de 3010 mgL^{-1} para el medio con glicerol crudo y 2620 mgL^{-1} para el medio basado en POME. Se obtuvo una producción de biosurfactante semipurificado de $142,5 \text{ mgL}^{-1}$ con el medio glicerol crudo y de $145,6 \text{ mgL}^{-1}$ con el medio POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Directores: Viviana Sánchez Torres and Jorge Alberto Albarracín.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE SURFACTANT ACTIVITY OF THE EXTRACELLULAR METABOLITES PRODUCED BY *Sinorhizobium meliloti* USING DIFFERENT CARBON SOURCES*.

AUTHORS: JENNIFER YURANI MONTOYA CARO**, LUIS ANGEL SALCEDO TELLEZ**.

KEY WORDS: Biosurfactants, POME, glycerol, *Sinorhizobium meliloti*.

DESCRIPTION:

In order to give an added value to agroindustrial waste: palm oil mill effluent (POME) and crude glycerol, they were evaluated as a low-cost carbon source for the production of biosurfactants by *Sinorhizobium meliloti*. Culture media were formulated with POME, POME with addition of phosphates, and POME with addition of phosphates and a nitrogen source. The drop collapse method was performed as a qualitative test to determine the surfactant activity of the bacterial strain in each of the culture media prepared with the different carbon sources and it was corroborated with the measurement of the surface tension (TS). Using the medium with crude glycerol the bacterial strain had the highest capacity to reduce TS, presenting a decrease of 24,4%, also in this medium it was observed the best emulsifying action with residual cooking oil (emulsification index E24 = 27,6. An extraction and purification of the secreted biosurfactants in the crude glycerol culture medium and POME + phosphates + (NH₄)₂SO₄ was carried out using chloroform: methanol ratio of 2: 1, Fourier-transform infrared spectroscopy was used for the characterization. Finally, the critical micellar concentration of the surfactant produced was determined, yielding the values of 3010 mgL⁻¹ in the medium with crude glycerol and 2620 mgL⁻¹ in the medium based on POME. A semi-purified biosurfactant production of 142,5 mgL⁻¹ was obtained with crude glycerol medium and 145,6 mgL⁻¹ with POME + phosphate + (NH₄)₂SO₄ medium.

* Undergraduate work.

** Industrial University of Santander, Physical and Chemical Engineering's Faculty, Chemical Engineering School, Tutors: Viviana Sánchez Torres and Jorge Alberto Albarracín.

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes o tensoactivos, son compuestos que se vienen produciendo desde civilizaciones antiguas, hoy en día se encuentran en productos como desinfectantes, detergentes, jabones, suavizantes, etc [1]. La versatilidad de este tipo de compuestos no sólo hace que se utilicen como agentes de limpieza sino también forman parte de aplicaciones industriales como aditivos en pinturas, suavizantes de telas, y algunos incluso tienen propiedades antimicrobianas por lo que se utilizan como biocidas [2]. A pesar del gran número de aplicaciones y de las numerosas ventajas que presentan los tensoactivos tanto en el ámbito industrial como económico y sanitario, en muchos casos los productos que contienen surfactantes entran en contacto con la piel, ojos y mucosas y pueden provocar diferentes tipos de reacciones adversas. Además, muchos de estos compuestos proceden del petróleo lo que hace que sean poco biodegradables y perjudiciales para el medioambiente [2].

Los biosurfactantes (tensoactivos biológicos) son moléculas anfifílicas de origen microbiano que se caracterizan por tener interesantes propiedades tales como diversidad estructural, baja toxicidad y biodegradabilidad, por lo que actualmente se están convirtiendo en una excelente alternativa a los surfactantes de origen químico [3]. Las principales razones por las que está limitada la producción de biosurfactantes microbianos a nivel industrial, son el uso de sustratos costosos, así como los altos costos de los procesos de separación y purificación [4].

El uso de fuentes de carbono residuales beneficia la producción de biosurfactantes, ya que de ser posible el uso de estos sustratos se estarían reduciendo los costos de producción, sumado a esto, dichas fuentes de carbono se convertirían en un producto útil y de mayor valor agregado, generando ingresos económicos adicionales para aquellas industrias que los desechan [5].

El costo de los sustratos es un factor importante para la economía del proceso de producción de biosurfactantes dado que representan aproximadamente el 30-50% del costo del producto final [6].

Las centrales de abasto en Colombia y la agroindustria, en la etapa de procesamiento, además de permitir la obtención del producto requerido, generan una gran cantidad de subproductos o residuos que presentan un impacto relevante en el ambiente por su alto contenido de materia orgánica [7]. Gran variedad de residuos agroindustriales está siendo desaprovechados actualmente en el país, tal es el caso de los efluentes del proceso de extracción de aceite palma y del glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel.

La generación de efluentes en el proceso de extracción de aceite de palma se relaciona con la capacidad de procesamiento de la planta, en el país se estimó que se genera 0,84 metros cúbicos de efluente por tonelada de racimo de fruta fresca procesada [8]. Debido a la alta producción y disponibilidad de este residuo se propone evaluarlo como una fuente de carbono de bajo costo.

Por otra parte, el glicerol crudo es considerado como el subproducto principal del proceso de producción del biodiesel, siendo 10% en peso del material de desecho. Anualmente en Colombia se producen 51.600 toneladas de glicerol crudo, lo que hace de este un sustrato económico [9].

Este proyecto propone el aprovechamiento de los efluentes de aceite palma y el glicerol crudo, empleándolos en la preparación de medios de cultivo de bajo costo para la evaluación de la actividad surfactante de los metabolitos extracelulares producidos por la cepa *Sinorhizobium meliloti*, teniendo en cuenta que, hasta el momento en Colombia, dicho microorganismo no se ha investigado en el campo de los tensoactivos.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Evaluar la actividad surfactante de los metabolitos extracelulares producidos por *Sinorhizobium meliloti* utilizando diferentes fuentes de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

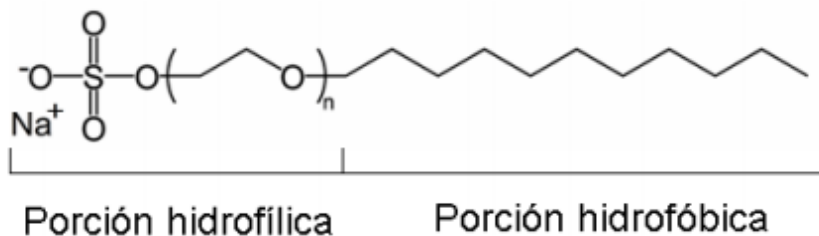
- Evaluar la capacidad de crecimiento de *S. meliloti* en medios de cultivo con efluentes del proceso de extracción de aceite de palma, glicerol crudo, glicerol puro y glucosa como fuentes de carbono.
- Determinar la actividad surfactante de los compuestos secretados por *S. meliloti* en medios de cultivo preparados con distintos sustratos.
- Medir la actividad emulsificante de los metabolitos extracelulares producidos por *S. meliloti*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 SURFACTANTES

Los tensoactivos o surfactantes son compuestos anfifílicos, es decir, que presentan en la misma molécula una porción hidrófoba (o apolar), la cual se encuentra unida covalentemente a una región hidrófila (o polar), que tiene afinidad por disolventes polares (Figura 1). La región apolar tiene afinidad por disolventes apolares y corresponde frecuentemente a una cadena hidrocarbonada, de tipo alquilo o alquil benceno, de longitud variable [3].

Figura 1. Representación esquemática de un tensoactivo donde se muestra la cabeza polar y la cola hidrofóbica



Fuente: Propiedades bioquímicas de tensoactivos biológicos de origen bacteriano [3]

3.2 BIOSURFACTANTES

Los surfactantes biológicos o biosurfactantes son producidos por microorganismos como bacterias y hongos (incluyendo las levaduras). Cada tipo de surfactante biológico es producido por un reducido número de microorganismos. Para los biosurfactantes, el tipo, la calidad, la cantidad y su aplicación, están influenciados por la especie del microorganismo y las condiciones de cultivo. Las ventajas que presenta sobre los de origen químico es que, se pueden generar a partir de materias

primas renovables, son menos tóxicos y se biodegradan fácilmente; por lo que son menos perjudiciales para el medio ambiente [10].

Los biosurfactantes de origen microbiano por sus propiedades emulsificantes y tensoactivas tienen una amplia gama de aplicaciones en sectores industriales diversos (Anexo A).

3.3 *Sinorhizobium meliloti*

Esta bacteria es una α -proteobacteria perteneciente a la familia *Rhizobiaceae* y al género *Sinorhizobium*. Se trata de un bacilo Gram-negativo, aerobio, cuyo tamaño oscila entre 0,5 - 1 μm de ancho y 1,2 - 3 μm de largo [11].

Este microorganismo fue empleado en producción de biosurfactantes en Tailandia utilizando subproductos o desechos agroindustriales de bajo costo, disminuyendo la tensión superficial cuando se usó jugo de manzana anacardo como fuente de carbono y mostrando actividad emulsificante con aceite vegetal residual [6]. La bacteria *Sinorhizobium meliloti* se ha descrito como microorganismo productor de biopelículas y de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) [6]. Sin embargo, hay muy poca información sobre la capacidad de producción de biosurfactantes de esta bacteria.

3.4 FUENTES DE CARBONO

3.4.1. Glucosa. La glucosa (también se llama dextrosa) es un monosacárido con fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Es una aldohexosa: una aldosa porque tiene el grupo carbonilo en un extremo y una hexosa porque tiene seis átomos de carbono. [12]

3.4.2. Glicerol puro. El glicerol es un líquido incoloro e inodoro de alta viscosidad con formula molecular $C_3H_8O_3$, cuyos grupos hidroxilo le dotan de un comportamiento hidrófilo e higroscópico. La gran disponibilidad del glicerol y su bajo precio hacen de él una fuente de carbono idónea en los procesos fermentativos, especialmente si se tiene en cuenta que dado que su grado de reducción (κ) es significativamente superior al de otros azúcares (glicerol: $\kappa = 4,67$, glucosa: $\kappa = 4$) es posible producir a partir de él combustibles y productos reducidos con un mayor rendimiento [13].

3.4.3. Residuos agroindustriales. Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto de interés comercial. Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina [8].

3.4.3.1. Efluentes de la extracción de aceite de palma. Las aguas residuales de plantas de beneficio de aceite de palma o Palm Oil Mill Effluent (POME, por su sigla en inglés), requieren tratamiento antes de su uso en riego o su descarga en aguas superficiales. Las plantas de beneficio de aceite de palma producen grandes cantidades de POME, sobre todo en la esterilización de la fruta y en la clarificación del aceite. En promedio una planta típica produce aproximadamente $0,8 \text{ m}^3$ de POME por cada tonelada procesada de racimos de fruta fresca. Por tanto, una planta extractora mediana con 150.000 toneladas de fruta fresca procesada por año produce aproximadamente 120.000 m^3 de POME al año o 450 m^3 por día [14].

El POME es un líquido de color amarillo-marón que se caracteriza por tener alta carga orgánica, en promedio su demanda química de oxígeno (DQO) es de 55.000 mgL⁻¹, la cantidad de sólidos suspendidos de 20.000 mgL⁻¹ y tiene un pH ácido que se encuentra en el rango de 4-5 [14].

3.4.3.2. Glicerol crudo. En la obtención de biodiesel se forma como subproducto importantes cantidades de glicerol (aproximadamente el 10 % del biodiesel obtenido). El glicerol de desecho constituye una fuente de carbono versátil con múltiples aplicaciones en las fermentaciones industriales. Debido a su bajo costo y su amplia disponibilidad, se ha intentado valorizar el glicerol crudo mediante procesos de fermentación microbiana, la más común valorización de glicerol se refiere a su conversión en 1,3-propanediol. Además, el glicerol crudo se ha empleado como un sustrato para la producción de otros metabolitos microbiales, tales como ácidos orgánicos, polioles, lípidos y masa microbiana en fermentaciones realizadas por especies de levaduras, hongos o algas en operaciones en Batch, continuo y semicontinuo [15]. El glicerol crudo utilizado fue suministrado por la empresa oleoflores.SA., Valledupar, Colombia, este posee 82,32% de glicerol puro (1,2,3 - propanotriol), 4,75% de cloruros, 1,76% de materia orgánica no glicerina (MONG) formada por jabones, ácidos grasos libres y otras impurezas y el resto es residuo consistente en humedad y volátiles, tal como se muestra en el Anexo B.

4. METODOLOGÍA

4.1 MICROORGANISMO

En el grupo de investigación GIMBA, estaban disponibles las cepas bacterianas *Pseudomona putida* y *Sinorhizobium meliloti*. Se realizó una prueba preliminar de tensión superficial, se escogió el microorganismo que presentó mayor disminución de la tensión. El medio de cultivo Luria Bertani "LB" (Anexo C) fue empleado para la conservación del microorganismo, cultivado en cajas Petri a temperatura ambiente durante 24 horas. La cepa fue recultivada cada 20 días y preservada a 4°C.

4.2 PRECULTIVO

Se preparó 25 mL de medio LB en Erlenmeyer de 250 mL y se sometió a 15 bar y 121°C durante 20 minutos en un autoclave. Posteriormente se realizó la inoculación con una colonia individual y se cultivó durante 18 horas a temperatura ambiente y 180 rpm [3]. Se determinó el crecimiento con la densidad óptica (DO) a 600 nm medido en el espectrofotómetro Lambda 25 UV/VIS (Perkin Elmer, Estados Unidos).

4.3 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 250 mL a los cuales se les agregó 35 mL de medio (pH de 7), utilizando por separado cada una de las siguientes fuentes de carbono: glucosa, glicerol crudo (Oleoflores S.A), glicerol puro y efluentes de la extracción de aceite de palma (Palmeras de Puerto Wilches S.A.) (Anexo C). Debido a la gran cantidad de sólidos suspendidos en los efluentes de la extracción del aceite de palma, se hizo un pretratamiento que consistió en centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Los cultivos se inocularon a partir de los precultivos con una DO inicial de 0,1 y como control se utilizó el medio de cultivo sin inocular, los frascos se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas a 180 rpm y se tomaron

muestras del cultivo a las 8, 12, 18, 24 y 48 horas [17]. Cada experimento se hizo por triplicado. Debido a que no se encontró reportado en la literatura ningún medio elaborado a base de POME para el crecimiento del microorganismo, se formuló un medio basado en el POME y se analizó el efecto de los fosfatos y la fuente de nitrógeno, partiendo de la receta utilizada con el glicerol crudo, se elaboraron 3 medios diferentes, el primero sólo contenía POME, el segundo POME + fosfatos y el tercero POME + fosfatos + fuente de nitrógeno. La composición de cada uno de estos medios se encuentra en el Anexo C.

4.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN (E24)

Los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga PLC-025 (GEMMY Industrial Co., Taiwan) y se guardó el sobrenadante [16]. La actividad emulsionante se midió en tubos de ensayo agregando 3 mL de aceite de cocina residual y 3 mL de sobrenadante, seguidamente se agitó en vórtex por un tiempo de 2 minutos. Los tubos se dejan en posición vertical y transcurrida 24 horas se observa si produjo emulsión. El porcentaje de emulsificación se calculó dividiendo la altura de la fase emulsificada entre la altura total [19].

4.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL (TS)

En la determinación de la tensión superficial se utilizó el sobrenadante, la medición de la TS se realizó mediante el principio del anillo de DuNöuy con el tensiómetro modelo 2 (Fisher-Scientific, Estados Unidos) para cada uno de los medios de cultivo en los diferentes tiempos con su respectivo control (cultivo sin bacterias), las lecturas de las muestras se tomaron por triplicado [20].

Se determinó el porcentaje de disminución de la tensión superficial para cada medio con la ecuación 1.

$$\% \text{disminución(TS)} = \frac{T_c - T_m}{T_c} * 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

En donde T_c es la tensión superficial del control (medio sin bacteria) y T_m la tensión de la muestra (medio con cultivo), tomados en los tiempos de 8,12,18,24 y 48 horas.

4.6 DETECCIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Uno de los métodos utilizados para la detección de biosurfactantes en diferentes tipos de bacterias es el método de la gota colapsada. Este método es rápido y se utiliza para detectar biosurfactantes en presencia de medios de cultivo, para esta prueba se tomó 10 μL de sobrenadante y se trasladó a una superficie cubierta de aceite de cocina residual. Las gotas que contenían biosurfactantes colapsaron y las que no tenía presencia de este, permanecieron estables [21]. Esta prueba se realizó para los tiempos de 8, 12, 18, 24 y 48 horas, con cada medio preparado con las diferentes fuentes de carbono.

4.7 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

La extracción se realizó del sobrenadante (pH:7), el cual se acidificó agregando una solución de HCl 6 N hasta alcanzar un pH de 2, posteriormente se mantuvo a 4 °C durante 24 horas, después fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos. El precipitado resultante es purificado utilizando una mezcla de cloroformo: metanol (2:1 v/v), se agitó en vórtex y se dejó en reposo durante 24 horas, para favorecer la separación de fases, posteriormente se extrajo la fase de metanol (superior) y la fase de cloroformo (inferior), los solventes se evaporaron para obtener el surfactante semipurificado seco [22].

4.8 CARACTERIZACIÓN CON ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRASFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Es una de las técnicas más usadas para analizar los grupos funcionales presentes y poder conocer los componentes en una sustancia desconocida.

Los espectros de infrarrojos se llevaron a cabo en el equipo IRTracer-100 (SHIMADZU, Japón), se midieron con un rango de longitud de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} [23].

4.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

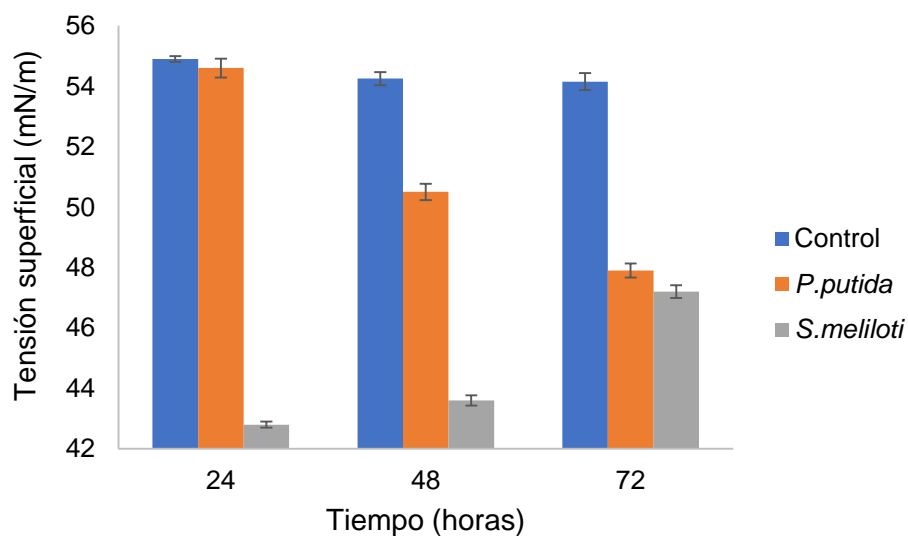
Para el cálculo de este parámetro se elaboró una solución del biosurfactante semipurificado obtenido tanto del medio con POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como del medio con glicerol crudo, se realizaron diluciones en agua destilada para cada uno y se determinó la tensión superficial utilizando el método de anillo de DuNouy. A partir de los datos obtenidos se graficó la concentración de biosurfactante semipurificado vs. logaritmo de la tensión superficial en mN/m. El valor de la CMC se tiene en cuenta cuando ocurre un cambio abrupto en el valor de la tensión superficial que se evidencia en la gráfica que se menciona anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

En la Figura 2 se presenta el comportamiento de la tensión superficial para las bacterias *P. putida* y *S. meliloti* vs. el control sin inocular en el medio mínimo de sales con glicerol crudo para los tiempos de fermentación de 24, 48 y 72 horas. El promedio de los valores de tensión para cada una de las cepas evaluadas se encuentra en el Anexo D.

Figura 2. Tensión superficial de microorganismos evaluados



La bacteria *P.putida* presentó una disminución en la tensión superficial del 0.6 % a las 24 horas, 7% a las 48 horas y 11,5% a las 72 horas, mientras que la *S. meliloti* disminuyó 22% a las 24 horas, 20% a las 48 horas y 13% a las 72 horas.

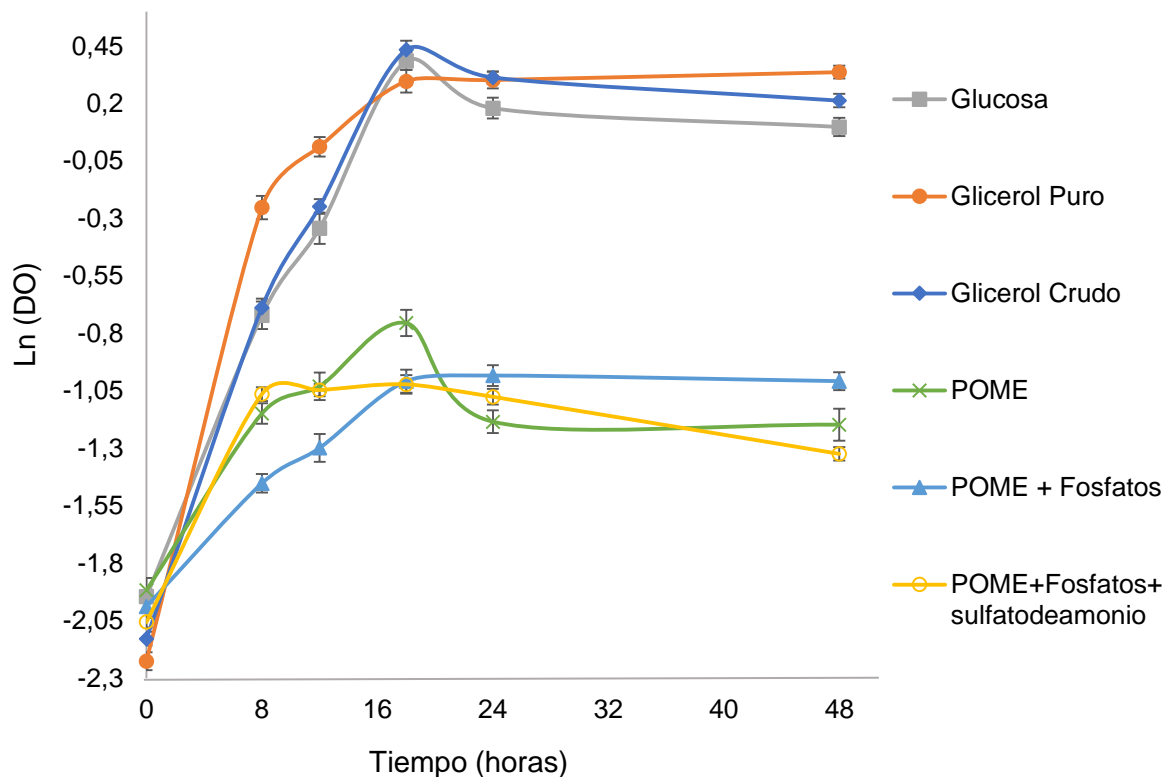
Se escogió la cepa *Sinorhizobium meliloti* debido a que presentó una mayor disminución de la tensión superficial con respecto al control (medio sin bacterias) tanto a las 24 como 48 horas.

5.2 EVALUACIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO

5.2.1 Curvas de crecimiento.

En la Figura 3 se muestran las curvas de crecimiento para *S. meliloti* en los diferentes medios de cultivo, los que contenían POME crecieron aproximadamente 3 veces menos en comparación a los demás. El glicerol crudo como fuente de carbono presentó el valor más alto de densidad óptica a las 18 h lo que indica el mayor crecimiento del microorganismo.

Figura 3. Representación de las curvas de crecimiento en cada uno de los medios evaluados.



En los medios glucosa, glicerol crudo, POME y POME + fosfatos se alcanzó la fase exponencial hasta las 18 horas, para el glicerol puro se logró esta fase a las 12 horas y para el medio POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a las 8 horas.

Se estimó la velocidad específica de crecimiento máxima (Tabla 1), siendo el glicerol puro el que presentó mayor velocidad de crecimiento. Aquellos medios que poseen fuente de nitrógeno en su receta mostraron mayor velocidad de crecimiento con respecto a los medios que no tienen adicción de nitrógeno.

Tabla 1. Velocidad específica de crecimiento para todos los medios.

Fuente de carbono	Velocidad de crecimiento μ [h^{-1}]
Glicerol crudo	0,142
Glicerol puro	0,195
Glucosa	0,129
POME	0,064
POME + fosfatos	0,054
POME + fosfatos + $(NH_4)_2SO_4$	0,124

5.2.2 Ensayo de la gota colapsada.

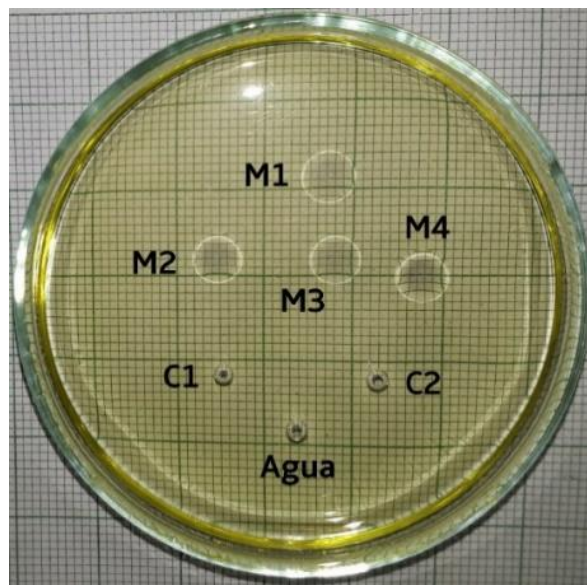
En la Tabla 2 se presentan los resultados de este ensayo para cada uno de los medios evaluados, el signo (+) indica que la prueba dio positiva y por el contrario el signo (-) muestra que la prueba dio negativa.

Tabla 2. Prueba de gota colapsada para todos los medios de cultivo.

Medios de cultivo	Colapso de gota				
	8 horas	12 horas	18 horas	24 horas	48 horas
Glicerol crudo	+	+	-	-	-
Glicerol puro	-	-	-	+	-
Glucosa	-	+	-	-	-
POME	+	-	-	-	-
POME + fosfatos	+	+	-	-	-
POME + fosfatos + $(NH_4)_2SO_4$	-	-	+	+	-

En la Figura 4 se observa el ensayo de gota colapsada para el tiempo de fermentación de 24 horas con el medio preparado con POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en donde M1, M2 M3 y M4 son las muestras tomadas del sobrenadante de los cultivos de *S. meliloti* y C1, C2 corresponden a los controles (medio sin bacterias). Las gotas de los controles y la de agua permanecieron estables, a diferencia de las gotas de las muestras que colapsaron inmediatamente, lo cual se traduce cualitativamente en presencia de biosurfactante.

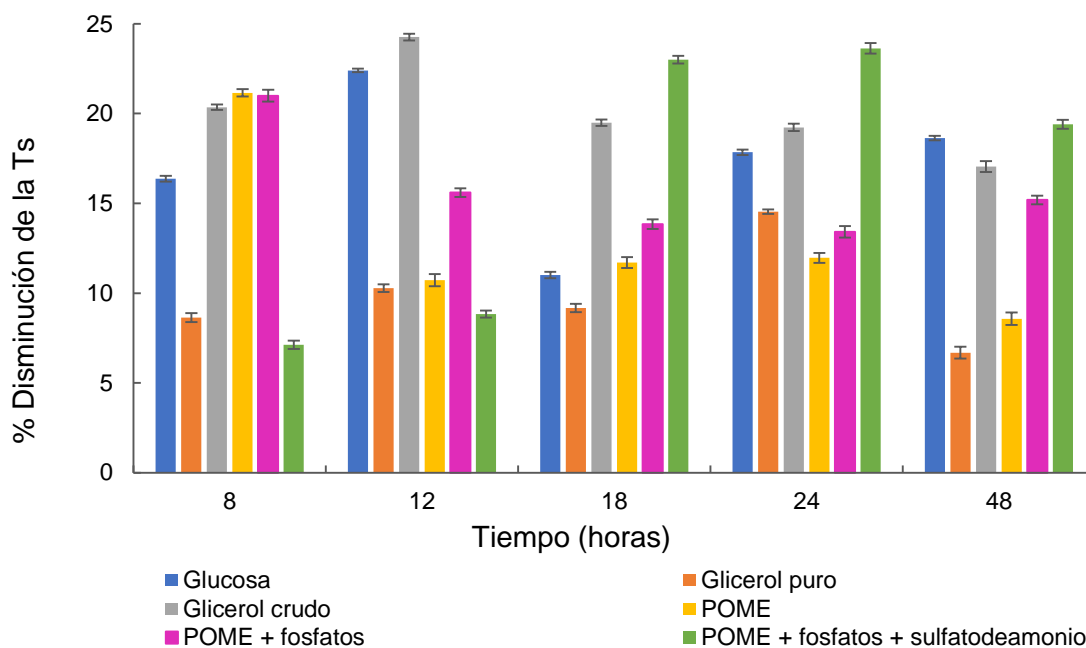
Figura 4. Prueba de gota colapsada para el mejor tiempo del medio POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



5.2.3 Tensión superficial.

En la Figura 5 se observa los tiempos vs %disminución de la TS. Los tiempos en los cuales se dio la mayor disminución de la tensión superficial fueron 8 horas para los medios POME y POME + fosfatos, 12 horas para glicerol crudo y glucosa, y 24 h para POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y glicerol puro.

Figura 5. Porcentaje de disminución de la TS con todas las fuentes de carbono.



Los medios que mostraron mayor disminución de la tensión superficial fueron POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y glicerol crudo, presentando reducción de 23,6 y 24,4%, respectivamente, siendo mejor el medio preparado con glicerol crudo en un tiempo de fermentación de 12 horas, el cual bajó la tensión de 53 mN/m a 40,1 mN/m (Anexo E). SAISA, Kanokrat., *et al*, reportaron que una cepa de *S. meliloti* disminuyó la tensión superficial a 32 mN/m utilizando como fuente de carbono jugo de manzana anacardo [6]; sin embargo, en dicha investigación no se especifica el valor inicial de la tensión superficial y tampoco realizan la caracterización del surfactante.

5.2.4 Índice de emulsificación (E24).

Se produjo emulsión en el medio con glicerol crudo en un tiempo de fermentación de 12 horas y en los medios con glicerol puro y POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a las 24 horas. Los medios con glucosa, POME, y POME + fosfatos no generaron emulsión en ningún tiempo de fermentación.

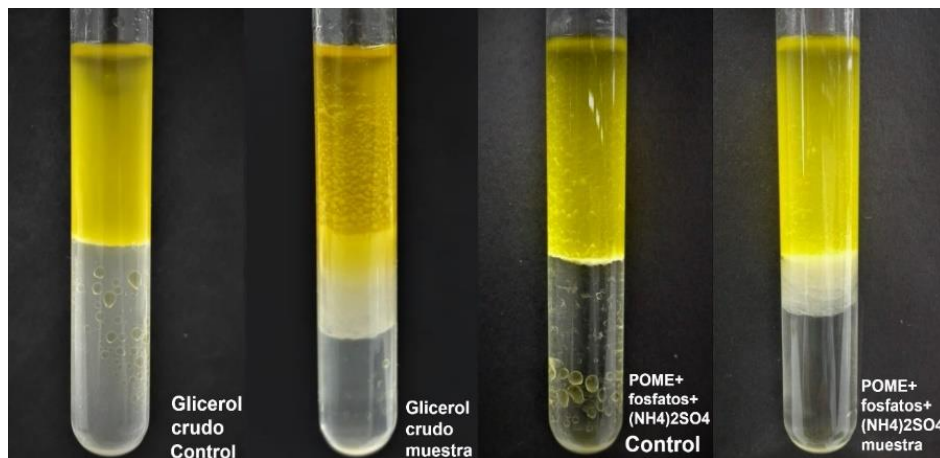
En la Tabla 3, se exhiben los porcentajes de índice de emulsificación en los medios evaluados con los respectivos tiempos en donde se presentó mayor actividad surfactante.

Tabla 3. Porcentajes de índice de emulsificación con cada fuente de carbono.

Fuente de carbono	tiempo [h]	% E24
Glicerol crudo	12	27,6
Glicerol puro	24	17,3
Glucosa	12	-
POME	8	-
POME + fosfatos	8	-
POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24	20

En la Figura 6 se muestra la prueba de índice de emulsificación para los medios que presentaron mayor porcentaje de emulsificación.

Figura 6. Prueba de los medios con mayor %E24.



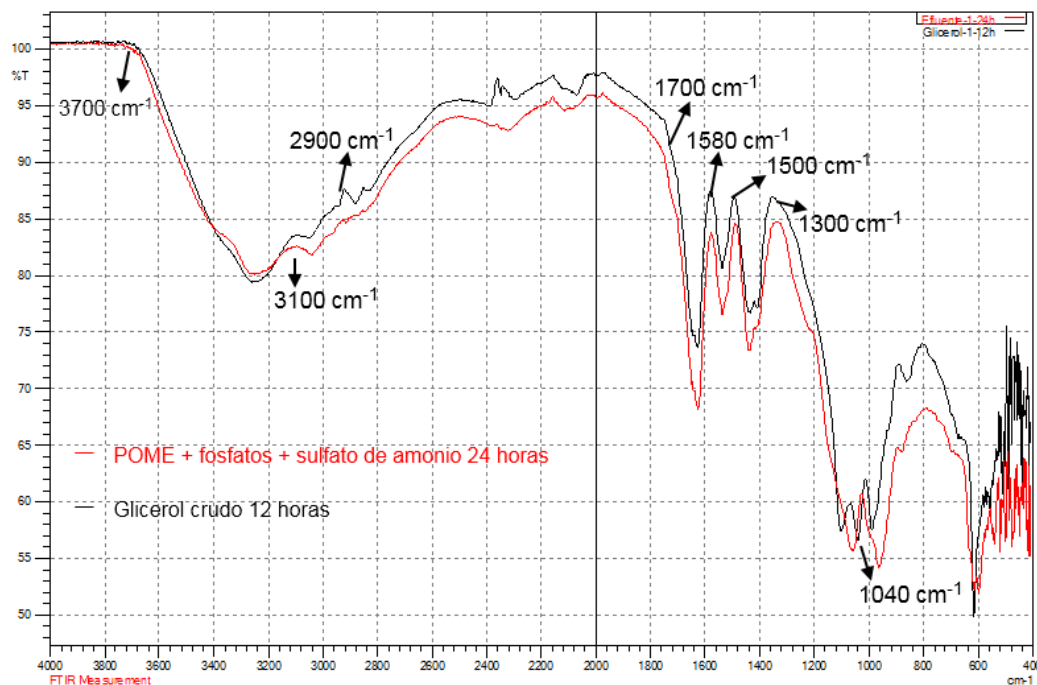
Los índices de emulsificación obtenidos en esta investigación con aceite de cocina usado no se pueden comparar con otros índices reportados en la literatura, debido a que el valor cambia dependiendo la sustancia que se seleccione.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES

5.3.1 Caracterización con espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Debido a que no hay información reportada sobre caracterización de biosurfactantes por la cepa *S. meliloti*, no se tenía conocimiento del tipo de surfactante que esta producía, por esta razón se analizaron las dos fases resultantes del proceso de purificación, para conocer en cuál de ellas se conserva el biosurfactante semipurificado. En la Figura 7 se presenta el espectrograma correspondiente al análisis del resultado de la fase metanol que se obtuvo del proceso de extracción líquido-líquido. En esta figura se muestra los espectros para los medios glicerol crudo y POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tomados en un tiempo de fermentación de 12 y 24 horas respectivamente. No se aprecian diferencias significativas entre los espectros lo que sugiere que el microorganismo produce el mismo compuesto sin importar la fuente de carbono que se le suministre.

Figura 7. Espectro FTIR de la fase superior obtenido de los medios POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y glicerol crudo producido por la cepa *S. meliloti*.

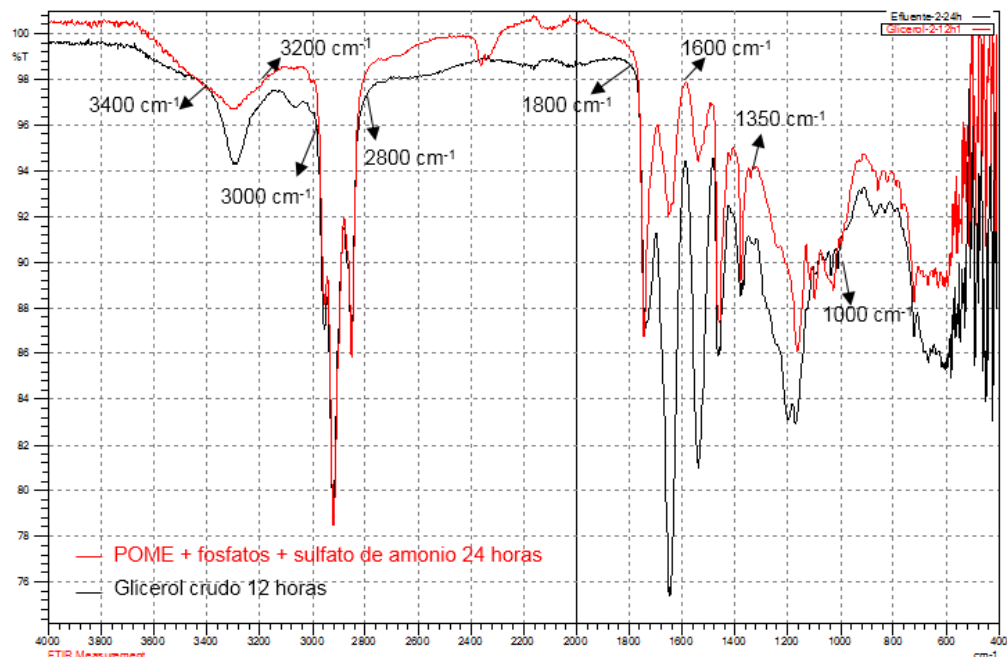


La banda de absorción que se encuentra en el rango de 1040-1200 cm^{-1} indica la existencia del enlace C-O [23]. En la región comprendida entre 1300-1500 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los enlaces C-H saturados [22]. De 1500-1580 cm^{-1} representa al enlace C-N, corresponde al enlace C=O el pico que se forma entre 1580-1700 cm^{-1} [25].

La banda ubicada en el rango de 2900-3100 es asignada a los grupos alifáticos y entre 3100-3700 representa las vibraciones del grupo O-H, C-H y N-H las cuales son características de compuestos que contienen carbono con grupos amino propios de cadenas de péptidos.

En la Figura 8 se muestra el espectrograma de la fase inferior tanto para el medio con glicerol crudo como para POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Figura 8. Espectro FTIR de la fase cloroformo obtenido del medio POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ producido por la cepa *S. meliloti*.



La región comprendida entre 1000-1350 cm^{-1} indica la presencia de grupos C-O, el rango de 1350-1600 cm^{-1} representa las vibraciones de las cadenas alifáticas, de 1600-1800 cm^{-1} corresponde al enlace C=O, la región comprendida entre 2800-3000 cm^{-1} indica los grupos C-H y de 3200-3400 cm^{-1} indica la presencia de aminas secundarias [24].

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC)

La masa seca obtenida de la fase cloroformo tanto para el medio glicerol crudo como para el medio POME+ Fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bajaron el valor de la tensión superficial del agua de 72,8 mN/m a 71,9 mN/m, lo cual indica que en esta fase no queda contenido el biosurfactante semipurificado y la pequeña disminución se debe a trazas de cloroformo. En las Figuras 9 y 10 se muestran los gráficos de la CMC para los dos mejores medios escogidos. Los valores obtenidos de CMC para el biosurfactante producido por el microorganismo *S. meliloti* en los medios de POME + Fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y glicerol crudo fue aproximadamente de 2620 mgL^{-1} (correspondiente a 7,9 en escala logarítmica) y 3010 mgL^{-1} (equivalente a 8,0 en escala logarítmica) respectivamente.

Figura 9. CMC glicerol crudo

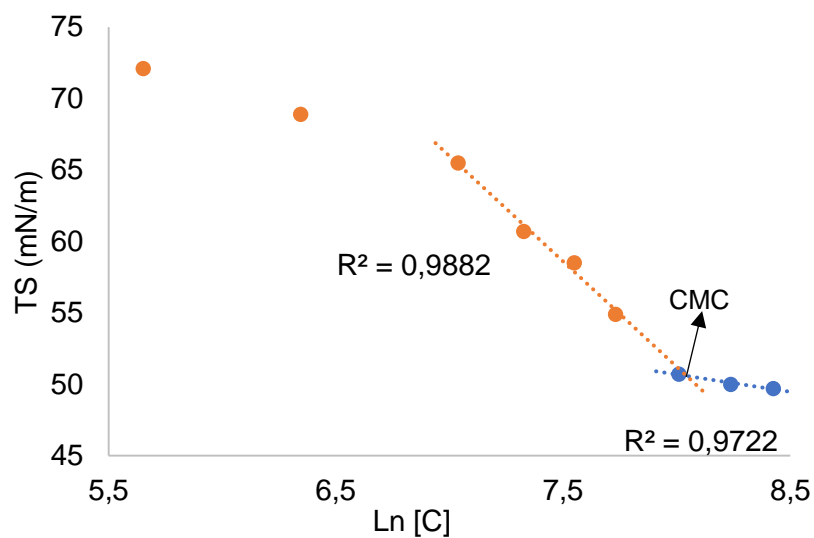
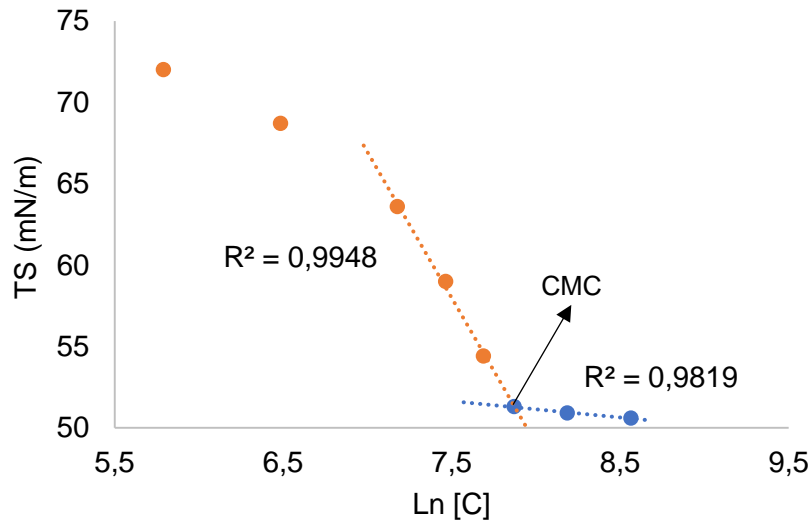


Figura 10. CMC POME + Fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



La producción obtenida de la semipurificación del surfactante con el medio glicerol crudo en el tiempo de fermentación de 12 horas corresponde a $142,5 \text{ mg L}^{-1}$ en la fase metanol, mientras que con el medio POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un tiempo de fermentación de 24 horas se obtuvo $145,6 \text{ mg L}^{-1}$ mg de la fase metanol, en comparación con otros microorganismos productores de biosurfactante en medios de cultivo alternativos [27], el rendimiento reportado es bajo.

El biosurfactante sin purificar obtenido con el medio glicerol crudo mostró una disminución de la TS del 24,4% (13 mN/m) y luego del proceso de semipurificación 31,7% (23,1 mN/m), mientras que con el medio POME+ fosfatos+ sulfato de amonio presentó una reducción del 23,6% (13,4 mN/m) antes de la semipurificación y 30,5% (22,2 mN/m) después de esta, lo cual indica que mejoró la capacidad de reducir la TS.

La mayoría de biosurfactantes purificados tienen una CMC entre 23 mgL^{-1} (surfactina) y 200 mgL^{-1} , (ramnolípidos) [26]. La eficiencia del surfactante semipurificado producido por la *S.meliloti* fue menor que la obtenida con otros

biosurfactantes (puros), posiblemente porque se necesita un fraccionamiento para separar solo la molécula con actividad surfactante.

Frente a los surfactantes de origen sintético empleados a nivel industrial, como el Cloruro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB) con un valor de CMC de 5500 mgL^{-1} (8,6 en la escala logarítmica), el biosurfactante obtenido en esta investigación mostró que necesita menor cantidad de masa para alcanzar la máxima reducción de tensión superficial [23], por lo que se presenta como sustituto a los de origen sintético.

6. CONCLUSIONES

La cepa bacteriana *Sinorhizobium meliloti* tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo preparados con efluentes del proceso de extracción de aceite de palma, glicerol crudo, glicerol puro y glucosa a las condiciones establecidas.

Los metabolitos extracelulares producidos por la cepa *S. meliloti* muestran actividad tensoactiva con cada una de las fuentes de carbono evaluadas. El medio de cultivo que presentó mayor actividad surfactante fue el Glicerol crudo, logrando una reducción en la tensión superficial de 13 mN/m con el biosurfactante crudo y de 23,1 mN/m con el surfactante semipurificado.

El medio que contenía glicerol crudo exhibió mayor actividad emulsificante arrojando un valor de índice de emulsificación de 27,6%.

7. RECOMENDACIONES

Profundizar en la estructura química del biosurfactante con otras técnicas como espectrometría de masas en sus modalidades inyección directa, espectroscópica de resonancia magnética nuclear, espectrometría MALDI-TOF, cromatografía líquida de alta eficacia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] REBELLO, Sharrel, *et al.* Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. En: Environmental Chemistry Letters. Junio, 2014. vol.12, no.2, p. 275-287.
- [2] IVANKOVIC, Tomislav. HRENOVIC, Jasna and GUDELJ, Ivana. Toxicity of commercial surfactants to phosphate-accumulating bacterium. En: Acta Chimica Slovenica. Enero, 2009.vol. 56,no.4, p. 1003-1009.
- [3] ZARAGOZA, Ana. Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano. Universidad de Murcia. Departamento de bioquímica y biología molecular.2012. p. 15-16.
- [4] YAÑEZ, Gustavo y WONG, Arnoldo. Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. BioTecnología. 2013, Vol. 17, no. 3, p. 21.
- [5] ROLDÁN, Teresa, *et al.* Estudio comparativo de sustratos convencionales y residuales para la producción de biosurfactantes con aplicación en la industria del petróleo.2016,p.1.
- [6] SAISA, Kanokrat., MANEERAT, Suppasil and SAIMMAI, Atipan. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. En: BioTechnologia. Octubre,2014. vol. 94, no.3. p. 275-284.
- [7] PEÑARANDA, Laura., MONTENEGRO, Sandra y GIRALDO, Paula. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. En: RIAA.2017. vol.8, no. 2.p.1.

[8] MALACATUS, Paul., GUERRERO, Byron y LLERENA, Gerardo. Generación de efluentes en el proceso de extracción de aceite crudo de Palma en el Ecuador. En: Dominio de las ciencias. 2017. vol. 3, no.4, p.459.

[9] SAVAL, Susana. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. Instituto de Ingeniería. UNAM. Ciudad Universitaria. México, D.F. 2012. p.15-16.

[10] VALDÉS, Luisa. Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por *Bacillus subtilis* en fermentación en medio sólido. Universidad autónoma metropolitana unidad Iztapalapa. 2016. p.28.

[11] CALATRAVA, María. 2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas. Universidad de granada. Posgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas Tesis Doctoral.2017. p.9.

[12] ESPINEL, Alberto. Estudio de la represión catabólica por glucosa en *Candida utilis*. Universidad complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas departamento de microbiología III.1996. p.7.

[13] CEBALLOS, Álvaro. Mutagénesis dirigida en *E.coli* para la mejora genética en la producción de biocombustibles. Universidad de Cádiz. Biotecnología. 2015. p.8.

[14] ALTHAUSEN, Markus. Tratamiento de Efluentes de la Planta de Beneficio Convertir un residuo en un recurso. En: Revista Palmas.2016. vol. 37, no. especial, p. 31-37.

- [15] LOANGO, Nelsy. Utilización del glicerol proveniente de la industria del biodiesel como fuente de carbono para la producción de lipasas recombinantes en *Pichia pastoris*. Mayo, 2015.p.29-31.
- [16] NÚÑEZ, Ariana, *et al*, Selección de una cepa bacteriana y un medio de cultivo industrial para la producción de poli 3hidroxibutirato., En: ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Agosto,2012. vol. 46, no. 2. p. 49-54.
- [17] CABALLERO, David y CASTILLO, maría. Producción de biosurfactantes a partir de residuos agroindustriales utilizando *Bacillus subtilis*. Tesis pregrado. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander.2015. p.27.
- [18] ALBARRACÍN, Jorge y CARVAJALINO Juan . Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de *Bacillus subtilis* a partir de glicerol crudo. Tesis de pregrado. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander.2016. p. 26.
- [19] PÉREZ, Josefina, *et al*. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos., En: Revista CENIC. Ciencias Químicas. 2010. vol. 41, p. 1-9.
- [20] BECERRA, Lizzie y HORNA, María. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. En: Scientia Agropecuaria. Marzo, 2016 Vol. 7, p. 23-31.
- [21] COOPER, David y Goldenberg, Beena. Surface active agents from two *Bacillus* species. En: Appl. Environ. Microbiol. Febrero, 1987.vol. 53, p. 224-229.

[22] MARTÍNEZ, Maricelly. Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo. Magister en Ingeniería de Petróleos. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p.46.

[23] MONDRAGON, Laura. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor. Maestro en ciencias con especialidad en geociencias y administración de recursos naturales. D. F., México. Instituto Politécnico Nacional.p.72.

[24] PEMMARAJO,Suma. Production of Microbial Surfactants from Oily Sludge-Contaminated Soil by *Bacillus subtilis* DSVP23. En: *Appl Biochem Biotechnol*. Marzo,2012. Vol. 167. p. 1119-1131.

[25] JIANG, Yuan, etall. Characterization, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. En: *International Journal of Biological Macromolecules*. Septiembre, 2014. Vol. 70. P 92-99.

[26] Raiger, Laura y LÓPEZ, Nancy. Los biosurfactantes y la industria petrolera. En: *Química Viva*. Diciembre, 2009. Vol. 8, no. 3, p. 146-161.

[27] MUKHERJEE, Soumen., DAS, Palashpriya y SEN, Ramkrishna. Towards commercial production of microbial surfactants. En: *TRENDS in Biotechnology*. Septiembre, 2006. Vol. 24. no. 11, p. 509-515.

BIBLIOGRAFIA

CALATRAVA, María. 2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas. Universidad de granada. Posgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas Tesis Doctoral.2017. p.9.

JIANG, Yuan, etall. Characterization, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. En: International Journal of Biological Macromolecules. Septiembre, 2014. Vol. 70. P 92-99.

MARTÍNEZ, Maricelly. Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo. Magister en Ingeniería de Petróleos. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p.46.

MONDRAGON, Laura. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autoctónas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor. Maestro en ciencias con especialidad en geociencias y administración de recursos naturales. D. F., México. Instituto Politécnico Nacional.p.72.

SAISA, Kanokrat., MANEERAT, Suppasil and SAIMMAI, Atipan. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. En: BioTechnology. Octubre,2014. vol. 94, no.3. p. 275-284.

ZARAGOZA, Ana. Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano. Universidad de Murcia. Departamento de bioquímica y biología molecular.2012. p. 15-16.

ANEXOS

Anexo A. Aplicaciones potenciales de los biosurfactantes.

Tabla A1. Aplicaciones industriales y potenciales de los biosurfactantes.

INDUSTRIA	APLICACIÓN Y FUNCIÓN DEL BIOSURFACTANTE
Petrolera	Recuperación mejorada del petróleo. Mejora el drenaje de aceite en pozo; estimula la liberación de petróleo atrapado; humectación de superficies sólidas; reducción de la viscosidad del aceite; disminución de la tensión interfacial.
Minería	Agentes secuestrantes, espumantes y flotantes de metales
Ambiental	Biorremediación. Emulsificación de hidrocarburos; disminución de la tensión interfacial; agente dispersante y espumoso; proceso de lavado de suelo. Tratamiento de lodos de aguas residuales en residuos aceitosos
Alimenticia	Emulsionante, solubilizante, desemulsionante. Suspensión, agente humectante espumoso; espesante, agente lubricante. Ingrediente funcional agente protector que interactúa con lípidos, proteínas y carbohidratos.
Farmacéutica	Antibacteriales. Anti fúngicos; agentes antivirales; agentes adhesivos; moléculas inmunomoduladoras; vacunas
Agrícola	Biocontrol Mecanismos de biocontrol de parásitos, plagas
Bioprocesamiento	Elaboración secundaria. Biocatalisis en sistemas acuosos de dos fases y microemulsiones, biotransformaciones, recuperación de productos intracelulares; mayor producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación
Cosmética	Productos de salud y belleza. Emulsionantes, agentes espumosos, solubilizantes, agentes humectantes, productos de limpieza, agente antimicrobiano.

Fuente: Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas [4].

Anexo B. Análisis del glicerol crudo.

INFORME DE ANALISIS		Código:	FI-AL-001																							
		Versión:	01																							
		Pag.	1 de 1																							
		Fecha:	2012-10-08																							
Laboratorio de Ensayo de Oleoflores S.A. Km 5 vía Codazzi - Valledupar gestionlaboratorio@haciendalasflores.com sheredia@haciendalasflores.com																										
No de informe	NA	Fecha de Recepción de muestra:	26-ene-15																							
Cliente:	LUIS FERNANDO CASTRO	Fecha de Ejecución de Análisis:	26-ene-15																							
Dirección Cliente:	N.A																									
Entidad / Area:	laboratorio	Tiempo total de ensayo:	2 1/2 horas																							
Punto de Muestreo [1]:	N.A	Técnica de Muestreo [2]:	ISO 5555																							
Volumen observado [3]:	NA																									
CONDICIONES DE PRUEBA:																										
NOMBRE DE LA MUESTRA: glicerina cruda		CODIGO:																								
DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA MUESTRA: LIQUIDA																										
Los siguientes resultados son validos únicamente para las muestras identificadas con anterioridad. El laboratorio																										
CARACTERISTICA	UNIDAD	METODO	ESPECIFICACION		RESULTADO	CUMPLE																				
			MINIMO	MAXIMO																						
pH		I-GL-196	>0		4,45	SI																				
Glicerol		EA6-51	79		82,32	SI																				
Cloruros		GTC-3		5,5	4,78	SI																				
humedad y volatiles		CA2C-25		13,500	11,24	SI																				
MONG				4,00	1,76	SI																				
Cenizas	%	CA11-55		5,5	4,68	SI																				
Declaraciones y Observaciones: [1], [2], [3]: E																										
Comentarios del cliente:																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Nombre</th> <th>Cargo</th> <th>Firma</th> <th>Fecha (AAAA-MM-)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Realizado por:</td> <td>YESID ARGOTE</td> <td>analista</td> <td>YCA</td> <td>26/01/2015</td> </tr> <tr> <td>Aprobado por:</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Recibido por:</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>								Nombre	Cargo	Firma	Fecha (AAAA-MM-)	Realizado por:	YESID ARGOTE	analista	YCA	26/01/2015	Aprobado por:					Recibido por:				
	Nombre	Cargo	Firma	Fecha (AAAA-MM-)																						
Realizado por:	YESID ARGOTE	analista	YCA	26/01/2015																						
Aprobado por:																										
Recibido por:																										
Este informe no se puede reproducir de forma parcial, ni se debe reproducir en su totalidad sin la previa autorización del																										
----- FIN DEL INFORME -----																										
Oleoflores S.A. Barranquilla: Cra 58 No. 64 - 82 PBX: 3441086 serviciocliente@haciendalasflores.com																										

Anexo C. Recetas de todos los medios de cultivo empleados.

Tabla C1. Medio luria bertani (LB)

Componente	Concentración [g L ⁻¹]
Cloruro de sodio	10
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Agar bacteriológico (sólo par medio sólido)	15

Tabla C2. Medio mínimo de sales con glicerol crudo.

MSM Glicerol Crudo	
Componente	Concentración
Glicerol crudo	12,5 [g L ⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 [mM]
MgSO ₄	0,8 [mM]
KH ₂ PO ₄	30 [mM]
Na ₂ HPO ₄	40 [mM]
Na ₃ -Citrato	0,008 [mM]
CaCl ₂	0,007 [mM]
FeSO ₄	0,004 [mM]
MnSO ₄	0,001 [mM]

Fuente: Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de biosurfactantes de *bacillus subtilis* a partir de glicerol crudo [18].

Tabla C3. POME.

POME	
Componente	Concentración
POME	12,5 [g L ⁻¹]

Tabla C4. POME + Fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

POME + Fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
Componente	Concentración
POME	12,5 [g L ⁻¹]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 [mM]
KH_2PO_4	30 [mM]
Na_2HPO_4	40 [mM]

Tabla C5. POME + Fosfatos.

POME + Fosfatos	
Componente	Concentración
POME	12,5 [g L ⁻¹]
KH_2PO_4	30 [mM]
Na_2HPO_4	40 [mM]

Tabla C6. Medio mínimo de sales con glicerol puro.

MSM Glicerol puro	
Componente	Concentración
Glicerol puro	12,5 [g L ⁻¹]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 [mM]
MgSO_4	0,8 [mM]
KH_2PO_4	30 [mM]
Na_2HPO_4	40 [mM]
$\text{Na}_3\cdot\text{Citrato}$	0,008 [mM]
CaCl_2	0,007 [mM]
FeSO_4	0,004 [mM]
MnSO_4	0,001 [mM]

Tabla C7. Medio mínimo de sales con glucosa.

MSM Glucosa	
Componente	Concentración
Glucosa	12,5 [g L ⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 [mM]
MgSO ₄	0,8 [mM]
KH ₂ PO ₄	30 [mM]
Na ₂ HPO ₄	40 [mM]
Na ₃ -Citrato	0,008 [mM]
CaCl ₂	0,007 [mM]
FeSO ₄	0,004 [mM]
MnSO ₄	0,001 [mM]

Anexo D. Selección del microorganismo.

Tabla D1. Tensión superficial de los microorganismos evaluados.

Microorganismo	Tiempo [h]	Tensión muestra [mN/m]	Tensión control [mN/m]
<i>P. putida</i>	24	54,6	56,9
	48	50,5	56,4
	72	47,9	55,9
<i>S.meliloti</i>	24	42,8	52,9
	48	43,6	52,1
	72	47,2	52,4

Anexo E. Tensión superficial de los sobrenadantes de cultivos de *S. meliloti* con diferentes fuentes de carbono.

Figura E1. Tensión superficial glicerol crudo

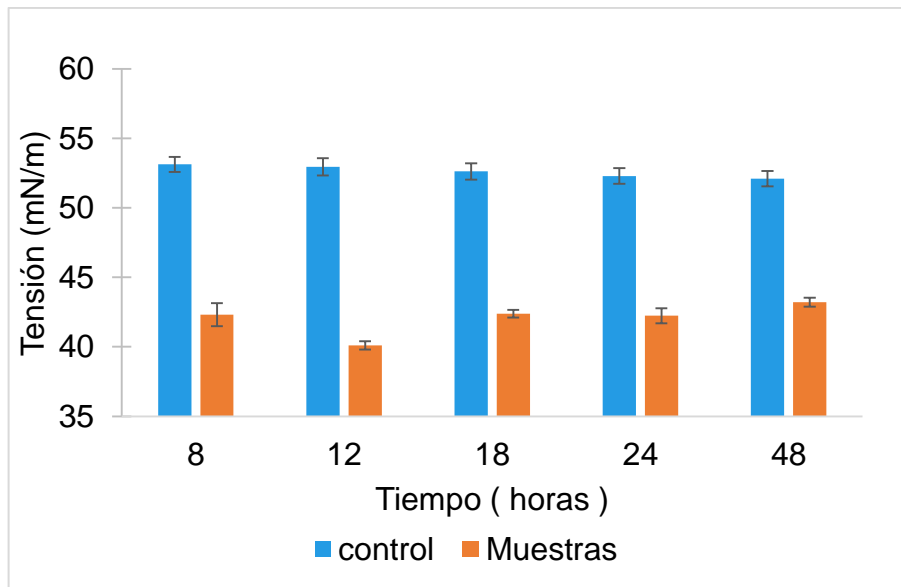


Figura E2. Tensión superficial glicerol puro.

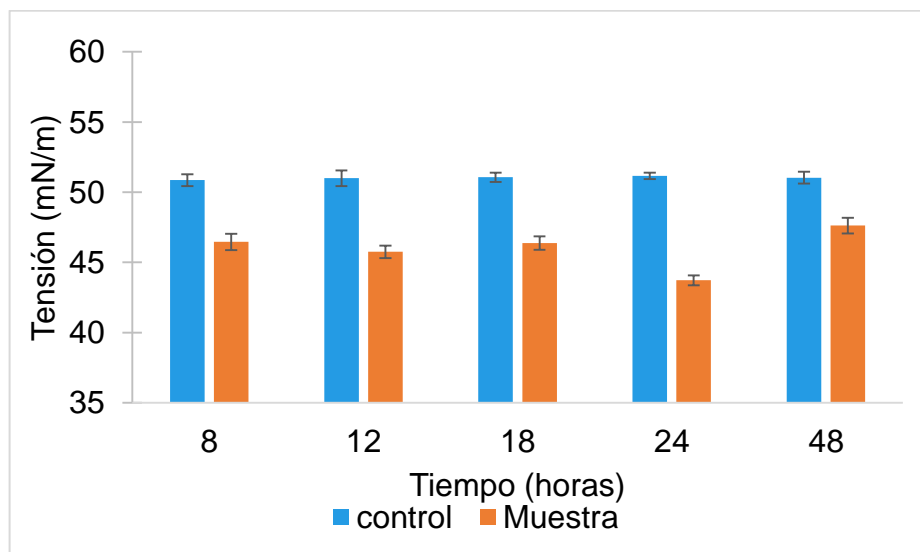


Figura E3. Tensión superficial glucosa.

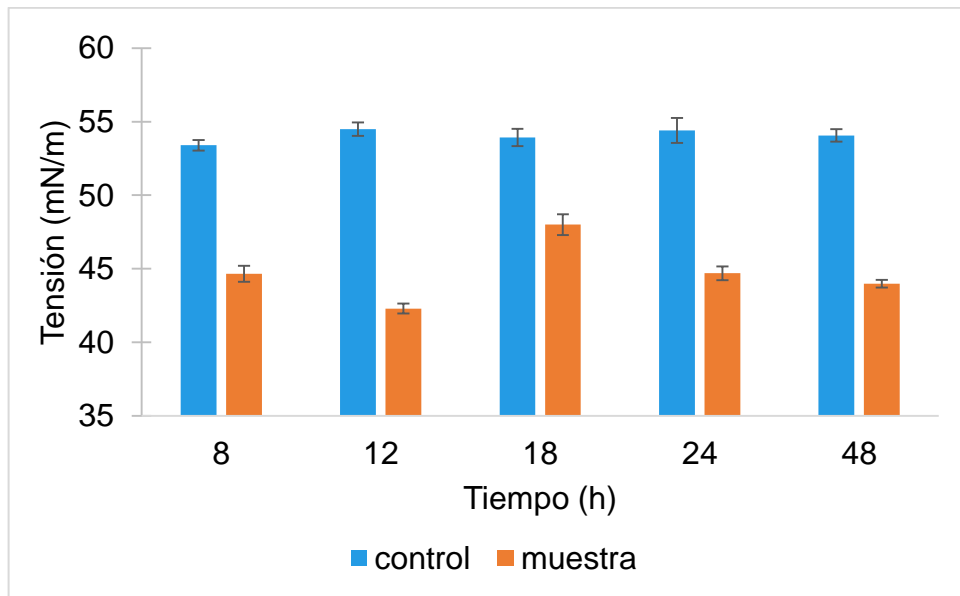


Figura E4. Tensión superficial POME + fosfatos

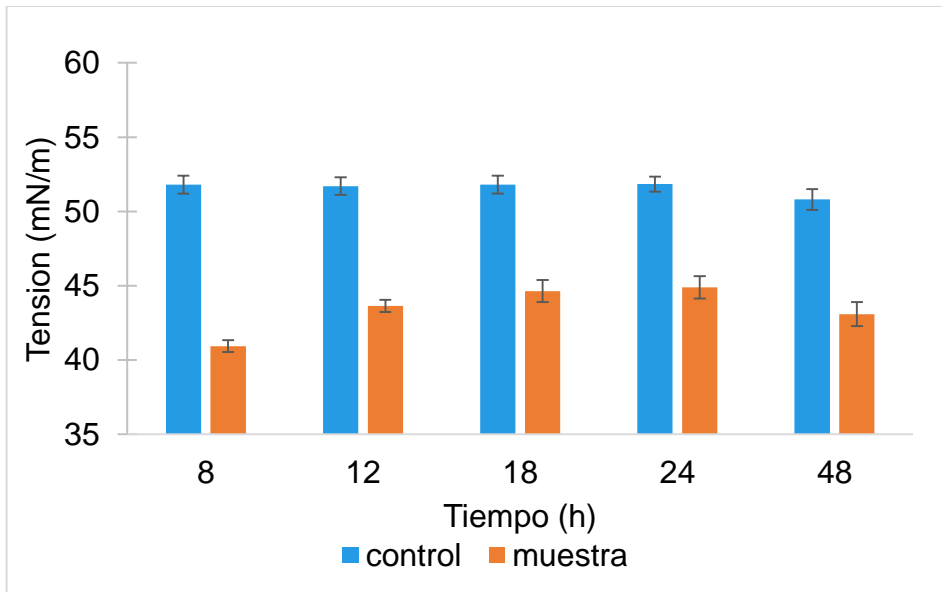


Figura E5. Tensión superficial POME.

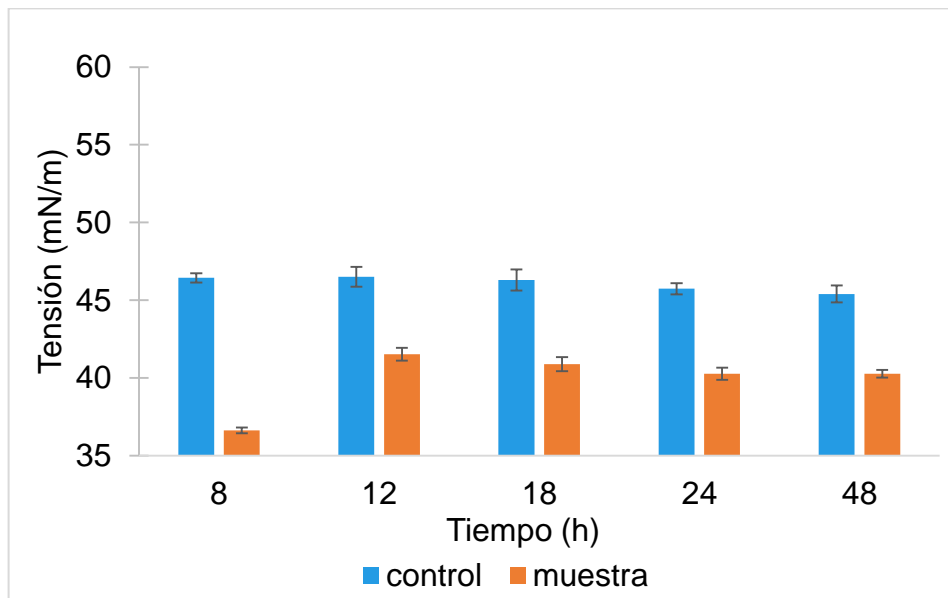


Figura E6. Tensión superficial POME + fosfatos + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

