

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES DE *BACILLUS SUBTILIS* A PARTIR
DE GLICEROL CRUDO**

**JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS
JUAN DIEGO CARVAJALINO OLAVE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES DE *BACILLUS SUBTILIS* A PARTIR
DE GLICEROL CRUDO**

**JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS
JUAN DIEGO CARVAJALINO OLAVE**

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

Director:

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

**Prof. JULIO ANDRES PEDRAZA AVELLA
Ingeniero Químico, Químico, M.Sc., Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Ingeniería Química por su orientación y apoyo para la realización del proyecto.

A los Doctores Viviana Sánchez Torres y Julio Andrés Pedraza Avella por la confianza depositada en nuestro trabajo, colaboración y respaldo en cada etapa como directores de esta tesis.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CINBIN y al Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente - GIMBA por la disposición de los laboratorios y suministro de materiales y equipos.

A Oriana Serna y Yury López por la orientación, paciencia y tiempo invertido en nuestra formación durante el trabajo.

A todas las personas que hicieron parte de este proceso.

*A mi familia por brindarme cariño y apoyo incondicional.
A mis profesores por su dedicación en la docencia y ser ejemplos de
vida.*

*A mis compañeros y colegas que hicieron parte de mi formación
como persona.*

Juan Diego Carvajalino Olave

A Dios y familia por ser el motor de vida.

*A mi Madre por el sacrificio diario para que mi hermano y yo
seamos excelentes personas.*

*A mi Padre por el esfuerzo que ha realizado toda su vida para salir
adelante.*

A mis compañeros de carrera por hacer parte del proceso formativo.

*A cada docente que de alguna u otra manera contribuyó en mi
desarrollo como profesional.*

Jorge Alberto Albarracín Arias

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVO GENERAL	16
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 BIOSURFACTANTES.....	17
2.2 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES.....	19
2.3 SURFACTINA.....	19
2.4 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> COMO MICROORGANISMO PRODUCTOR	22
3. ESTADO DEL ARTE	23
3.1 VARIABLES RELEVANTES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE .	25
4. METODOLOGÍA	26
4.1 MICROORGANISMO	26
4.2 PREINÓCULO	26
4.3 ELECCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN	26
4.4 VARIABLES Y NIVELES EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS	27
4.5 EXTRACCIÓN DE SURFACTINA.....	27
4.6 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL.....	28
4.7 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN E_{24}	28
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS	29
5.1 ELECCIÓN DE TIEMPO DE FERMENTACIÓN.....	29
5.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	31
5.3 COMPARACIÓN DEL MSMCG RESPECTO A UN MSM CON GLUCOSA.....	36

6. CONCLUSIONES39

7. RECOMENDACIONES40

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS41

BIBLIOGRAFÍA.....46

ANEXOS.....48

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Acumulación de biosurfactante en la interfase agua-aire..	17
Figura 2: Molécula de surfactina	20
Figura 3: Sectores de aplicación de la surfactina.....	21
Figura 4: Prueba de la gota colapsada	29
Figura 5: Curva de crecimiento de B.subtilis en el medio mínimo de sales con glicerol crudo.....	30
Figura 6. Proporción de las contribuciones lineales en el modelo con base a los efectos de primer orden.	35
Figura 7. Efectos lineales en la tensión superficial.	35
Figura 8. Prueba del índice E_{24}	37
Figura 9. Diagrama de barras para la prueba de E_{24}	38

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Rendimientos reportados con medios optimizados para la producción de surfactina	24
Tabla 2. Sales fijas en el medio mínimo de sales para la fermentación	27
Tabla 3. Variables y niveles para el diseño de experimentos	27
Tabla 4. Velocidades de crecimiento para los medios de cultivo evaluados.....	30
Tabla 5. Ensayos del diseño factorial de experimentos 2^{6-2}_{IV}	32
Tabla 6. Mejor ensayo obtenido del diseño de experimentos	33
Tabla 7. Contribuciones relevantes en el modelo de aproximación.....	34
Tabla 8. Rendimientos de biosurfactante semipurificado de diferentes cultivos.	36

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Aplicaciones de los biosurfactantes.	48
Anexo B. Composiciones para los diferentes medios utilizados	49
Anexo C. Prueba de la gota colapsada.....	51
Anexo D. Análisis de variabilidad (ANOVA) del diseño de experimentos.	52
Anexo E. Perfil de tensión superficial a diferentes concentraciones de surfactina	56
Anexo F. Rendimientos de producción de surfactina reportados en la literatura. ..	57
Anexo G. Análisis de la muestra de glicerol residual utilizado en la investigación.	59

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACION DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis* A PARTIR DE GLICEROL CRUDO*.

AUTOR: JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS**, JUAN DIEGO CARVAJALINO OLAVE**

PALABRAS CLAVE: Biosurfactantes, glicerol, *Bacillus subtilis*, surfactina.

CONTENIDO:

Con el objetivo de encontrarle un uso a un residuo industrial como lo es el glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel, se evaluó este sustrato como fuente de carbono para la producción de un biosurfactante de la cepa *Bacillus subtilis*.

Se realizó un diseño factorial de experimentos utilizando las composiciones de un medio mínimo de sales con glicerol crudo "MSMCG" con el fin de identificar las variables que influyen en la producción de biosurfactantes. Usando como variable de respuesta la tensión superficial, se encontró que las sales de magnesio ($MgSO_4$), manganeso ($MnSO_4$) y potasio (KH_2PO_4) son las más influyentes en la producción de biosurfactante con mejor acción tensoactiva. Con el ensayo del diseño factorial que reportó la tensión superficial más baja, se comparó el rendimiento y acción emulsificante de este medio junto con un medio mínimo de sales con glucosa como fuente de carbono. Se encontró que el medio de glicerol presentó buena acción emulsificante (Índice de emulsificación $E_{24} = 70\%$) y rendimiento de producción ($1,1980 \text{ g L}^{-1}$) comparado con el medio de glucosa ($E_{24}=86\%$ y $R_{to}=1,1400 \text{ g L}^{-1}$), lo que indica que el glicerol puede ser una alternativa viable en la producción de biosurfactantes de *Bacillus subtilis*.

Se ajustó un modelo de segundo orden la región de concentraciones en las que se evaluaron los componentes del medio. Sin embargo, la curvatura en la región es la mayor contribuyente en el modelo (45,45%), indicando la existencia de un punto óptimo local en los intervalos escogidos. Una posterior optimización requeriría de la medición de la concentración de biosurfactante como variable de respuesta en un diseño de superficie de respuesta.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Directores: Viviana Sánchez Torres and Julio Andrés Pedraza Avella

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF DIFFERENT CULTURE MEDIA FOR THE PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS OF *Bacillus subtilis* FROM RAW GLYCEROL*.

AUTHORS: JORGE ALBERTO ALBARRACÍN ARIAS**, JUAN DIEGO CARVAJALINO OLAVE**

KEY WORDS: Biosurfactants, glycerol, *Bacillus subtilis*, surfactin.

DESCRIPTION:

This study was aimed to find a suitable use for raw glycerol from biodiesel industry as a cheap carbon source for the production of biosurfactants of *Bacillus subtilis*.

A factorial experimental design was carried out varying the composition of a minimal salt medium with crude glycerol (MSMCG), using surface tensions as the response variable. Magnesium (MgSO_4), manganese (MnSO_4) and potassium (KH_2PO_4) salts were the most influential variables on biosurfactant production with better tensoactive properties.

Then, the best composition arrangement from the DOE (with the lowest surface tension) was selected to be compared to a minimal salt medium using glucose as a carbon source. The comparison criteria were the yield (R_{to} , as semipurified biosurfactant mass per liter of culture medium) and the emulsification index (E_{24}).

It was found that MSMCG presented good emulsification activity (index $E_{24} = 70\%$) and production yield ($1,1980 \text{ g L}^{-1}$) compared to MSMGlu ($E_{24}=86\%$ y $R_{to}=1,1400 \text{ g L}^{-1}$), indicating that glycerol could be a feasible alternative for the production of *Bacillus subtilis*'s biosurfactants.

A second order model was fitted to find contributions of components media to surface tension. However, curvature was the most significant contribution in the model (45,45%), indicating the existence of an optimal point with lowest surface tension into the region evaluated. A later optimization could require direct biosurfactant concentration measurement as a response variable for surface response modeling.

* Undergraduate work

** Industrial University of Santander, Physical and Chemical Engineering's Faculty, Chemical Engineering School, Tutors: Viviana Sánchez Torres and Julio Andrés Pedraza Avella

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes de energía renovable se ha convertido en un tema de gran interés a nivel mundial, debido al calentamiento global que generan los gases de efecto invernadero que producen los combustibles de origen fósil. La producción y consumo de bioetanol y biodiesel presentan menores emisiones de CO₂ que los combustibles fósiles.

En Colombia se registró un aumento en la producción y venta anual de bioetanol del 7% en el 2015 (455,22 millones de litros). Por otro lado, la producción nacional de biodiesel como producto de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales se ha triplicado en los últimos 6 años (2009-2015)¹. El glicerol es un subproducto de la industria del biodiesel; por cada 10 kg de biodiesel producido, se obtiene 1 kg disponible de glicerol. Por lo tanto la cantidad de glicerol crudo resultante se convierte en un problema de almacenamiento debido a que la disposición final requiere de la remoción de impurezas presentes en él, como metanol, ácidos grasos y sales [1]. Por esta razón el glicerol crudo es tratado para utilizarlo en diferentes industrias como la farmacéutica, alimenticia, cosméticos, resinas y precursores poliméricos. Sin embargo, su refinación conlleva a costos que pueden ser evitados si se encuentran alternativas al uso del glicerol crudo. En Colombia la mayoría del glicerol residual del biodiesel se utiliza como alimento de engorde para ganado².

A pesar de los usos que se le da al glicerol en la actualidad, la oferta de este residuo supera la demanda de las industrias mencionadas, por lo que su precio se mantendrá bajo mientras existan grandes cantidades disponibles. El glicerol es abundante en la naturaleza, ya que es componente estructural de muchos lípidos y es por eso que muchos microorganismos lo utilizan como fuente de carbono y

¹ (FedeBiocombustibles, 2016)

² Ibid

energía en su metabolismo, por lo tanto se convierte en una alternativa viable como sustrato en procesos biotecnológicos.

En la actualidad se investiga la conversión del glicerol residual en compuestos de alto valor por medio de la fermentación microbiana. Algunos de dichos productos son: propilenglicol, dihidroxiacetona, ácido succínico, ácido propiónico, etanol, ácido cítrico, pigmentos como prodigiosina y astraxantina, polihidroxialcanoatos y biosurfactantes [2], siendo estos últimos el foco de este trabajo.

La bacteria *Bacillus subtilis* produce una serie de lipopéptidos cuando es cultivada en un medio con glicerol crudo como única fuente de carbono [3]. Estos compuestos que se componen de al menos una parte hidrofóbica y otra hidrofílica se les llama anfifílicos, son biosurfactantes de excelentes características que además son útiles para aplicaciones antivirales y antimicrobianas. La familia de las surfactinas contienen un ciclo heptapeptídico unido a una cadena de ácido graso de 12 a 15 carbonos [4].

La utilización de residuos agroindustriales o subproductos como el glicerol residual orientado a la producción de surfactina soluciona dos problemas; los altos costos de materia prima debido a que reduce el costo del medio de cultivo entre un 60-80% [9] y agrega valor a la línea de producción del biodiesel, utilizando el principal subproducto de este proceso, evitando la acumulación y/o la mala disposición de grandes cantidades de esta sustancia.

Sin embargo la producción de surfactina utilizando glicerol crudo como fuente única de carbono tiene bajos rendimientos, así que se hace necesario el mejoramiento de este proceso para que sea viable a escala comercial. Se probaron diferentes formulaciones de medio de cultivo, tomando como base el medio mínimo de sales [6] utilizando un diseño de experimentos exploratorio, donde la variable de salida fue la tensión superficial de una solución de biosurfactante producido. Además se realizó una caracterización del producto con la formulación del medio que permitió obtener la mejor actividad tensoactiva.

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de glicerol crudo como sustrato promisorio en la producción del biosurfactante de *B.subtilis*.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

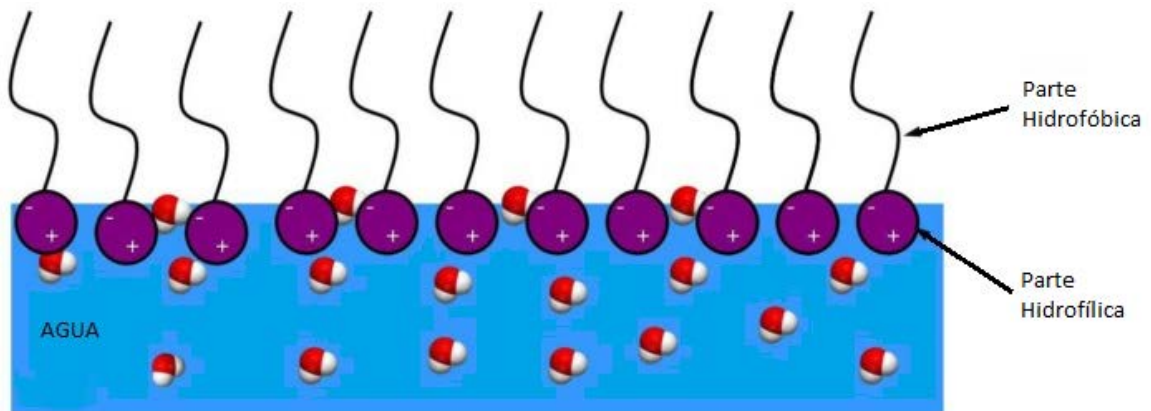
- Encontrar una formulación del medio mínimo de sales que permita obtener una baja tensión superficial en la solución de producto extraído.
- Comparar la actividad tensoactiva de biosurfactante de *B.subtilis* obtenido con glicerol y glucosa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BIOSURFACTANTES

Los surfactantes o agentes tensoactivos (Figura 1) son compuestos que tienen en un extremo de su molécula una parte hidrofílica y en el otro una parte hidrofóbica, lo cual hace que se ubiquen preferiblemente en interfaces entre un medio polar como el agua y no polar como los aceites. Los surfactantes al ubicarse en las interfaces hacen que disminuyan las fuerzas de repulsión entre las diferentes fases, lo que permite el mezclado y una interacción más fácil entre ellas. De acuerdo a esto, los surfactantes reducen la tensión superficial (líquido-gas) o interfacial (líquido-líquido) [7].

Figura 1. Acumulación de biosurfactante en la interfase agua-aire.



Fuente: Adaptado de Pacwa-Płociniczak et al, 2011 [8].

Muchos de los procesos celulares requieren de la presencia de sustancias anfifílicas como por ejemplo los fosfolípidos que son el componente principal de la mayoría de membranas biológicas. Además se conocen compuestos específicos que hacen parte del metabolismo celular que reducen la tensión interfacial y que son secretados hacia el medio de cultivo o integrados a la pared celular por algunos

microorganismos para permitir el proceso de crecimiento y consumo de sustratos hidrofóbicos [9], dichos metabolitos microbianos son designados como “biosurfactantes”. Entre la familia de lípidos libres que poseen estas características están; glicolípidos, lipopolisacáridos, lipopéptidos y proteínas. En los biosurfactantes, los grupos funcionales que componen la parte hidrofóbica pueden ser; los ácidos grasos saturados e insaturados, ácidos grasos hidroxilados o alcoholes grasos, con otras cuantas estructuras como isoprenoides, todos estos con cadenas carbonadas de entre 8 y 18 átomos, mientras que en la parte hidrofílica de la molécula existen grupos éster, hidroxilos, fosfatos, carboxilos, carbohidratos (como mono, oligo y polisacáridos), péptidos y proteínas [9].

Las principales ventajas que presentan los biosurfactantes son:

- Gran diversidad estructural
- Baja eco-toxicidad
- Efectos antibióticos y bioactivos
- Completa biodegradabilidad
- Producción a partir de recursos renovables

Moléculas con características surfactantes también son producidas de manera sintética, donde su diversidad y disponibilidad en el mercado sobrepasa en gran cantidad al mercado de biosurfactantes (poliglicósido alquilo, por ejemplo) [9], sin embargo algunas de estas moléculas generan toxicidad y presentan baja biodegradabilidad. En algunas industrias como la cosmética y de alimentos, es indispensable que el surfactante no sea tóxico para el hombre, mientras que en otras como la industria petrolera, aunque es más flexible, los efectos que puedan traer a los ecosistemas vienen cobrando importancia. Otras desventajas que presentan los surfactantes sintéticos son sus procesos de producción ya que además de provenir mayoritariamente de derivados del petróleo, requieren temperaturas de operación mayores a 100 °C y presiones que van desde los 0.02 a 50 bar [9].

2.2 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES

En general, estas moléculas son utilizadas según su actividad surfactante y emulsificante para la bioremediación, preparación de emulsiones en la industria de alimentos y cosméticos, biocontrol entre otros (Anexo A).

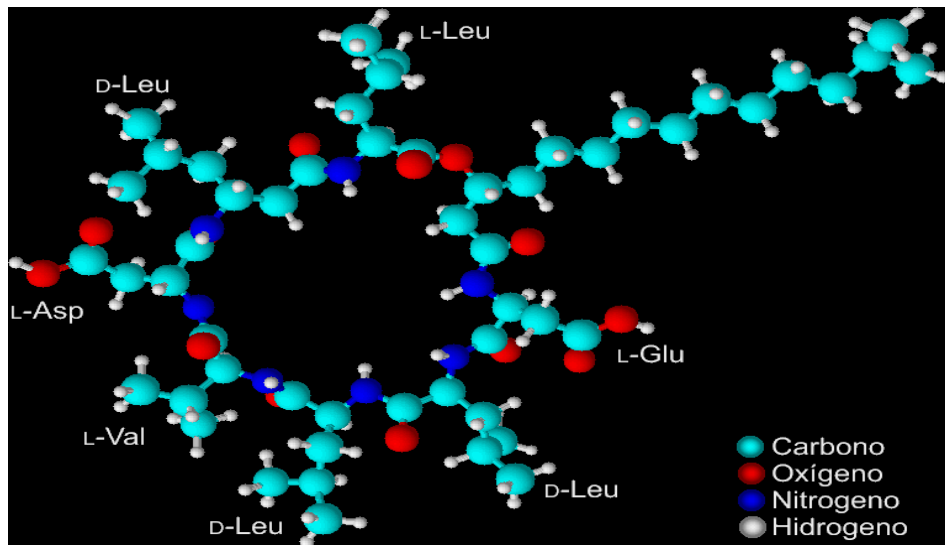
Los biosurfactantes presentan diferente acción tensoactiva según su peso molecular. Siendo así los de bajo peso molecular como la surfactina [10] útiles principalmente para disminuir las tensiones superficiales e interfaciales de los medios en los que se encuentra, favoreciendo la movilidad de los microorganismos y la solubilización de la fase hidrofóbica en agua. Esto en contraste a los surfactantes de alto peso molecular, que son útiles especialmente en la formación de emulsiones en sistemas aceite-agua [8].

2.3 SURFACTINA

La familia de moléculas referidas a este nombre se compone por 20 diferentes tipos de lipopéptidos aniónicos³, caracterizados por tener un anillo cíclico de siete aminoácidos (L-asparagina, L-leucina, ácido glutámico, L-leucina, L-valina y dos D-leucinas) que corresponden a la parte hidrofílica, unidos a una cadena de ácido graso con 12-15 átomos de carbono en ella (parte hidrofóbica) [4] (Figura 2).

³ Bonmatin et al. 2003

Figura 2. Molécula de surfactina.



Fuente: Elaborada en software ChemSketch®

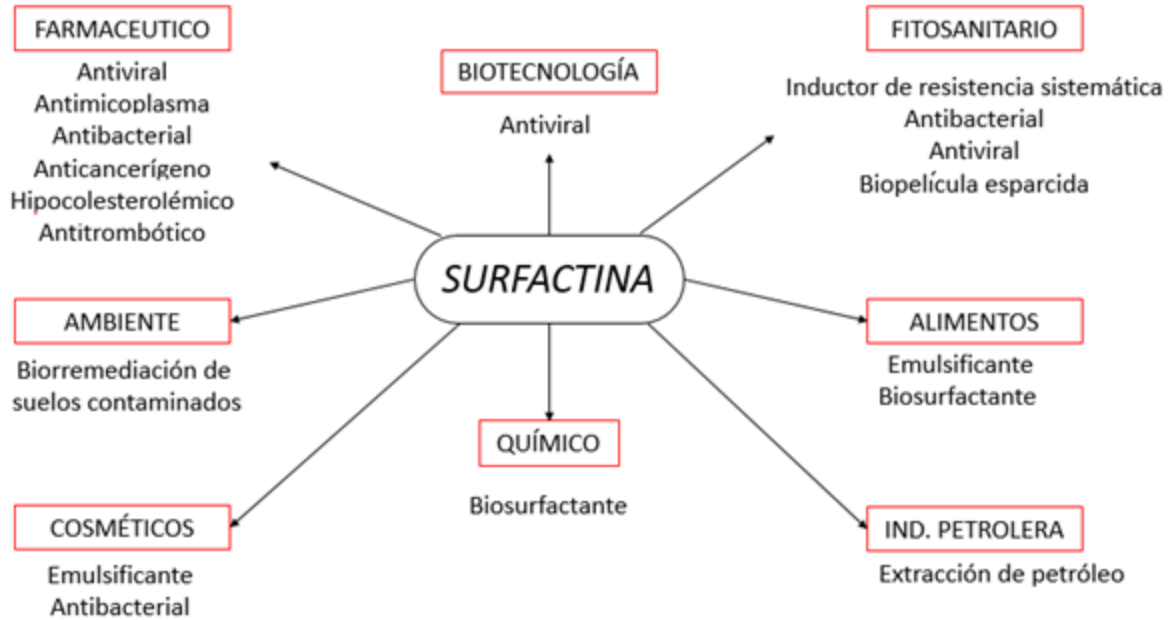
Este tipo de lipopéptidos identificados como metabolitos de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* que se producen principalmente durante la fase de crecimiento exponencial, poseen alta actividad surfactante y antibiótica. Su nombre es debido a su poderosa acción surfactante, capaz de reducir la tensión superficial del agua desde $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ hasta $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a concentraciones de $10 \mu\text{M}$, mucho menores que la concentración a la cual se forman estructuras micelares (CMC) de $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y hasta dos órdenes de magnitud menor que la mayoría de surfactantes [12]. Además muestra mejor actividad superficial que el lauril sulfato de sodio, uno de los surfactantes sintéticos más utilizados en la industria actualmente.

Todas estas características que ofrece la molécula, la ubica en una posición muy atractiva para muchas aplicaciones industriales dentro de diversos campos, así, las aplicaciones de la surfactina se pueden resumir en la Figura 3.

Hoy en día se ha encontrado que la surfactina es útil en la medicina como antibiótico del *mycoplasma*, anti-inflamatorio, anti-adhesivo de bacterias que inhibe la formación de biopelículas en el intestino. En el aspecto ambiental para facilitar el

recobro de crudos pesados y retirar de los suelos metales e hidrocarburos. En la agricultura se utiliza como bactericida de fitopatógenos [13].

Figura 3. Sectores de aplicación de la surfactina.



Fuente: Modificada de Soberón-Chávez, 2010 [7].

La surfactina es un metabolito de bajo rendimiento de producción como muchos otros lipopéptidos, pero que presenta una de las mayores actividades surfactantes reflejado en su bajo CMC [15]. En la actualidad, la producción de surfactina a gran escala no es viable debido a que es más económico producir surfactantes sintéticos, esto se debe a dos principales aspectos: costos de materia prima y bajos rendimientos obtenidos en laboratorio [14]. Es por eso que el glicerol como fuente de carbono es una alternativa para hacer más viable el proceso.

Con el objetivo de relacionar los costos con la actividad tensoactiva de un surfactante, se plantea el siguiente caso. Es mejor un surfactante 'A' que cuesta 3 \$ g⁻¹ y requiere 1 g L⁻¹ para bajar la tensión superficial del agua hasta 30 mN m⁻¹ a un surfactante 'B' que cuesta tres veces menos que 'A' (1 \$ g⁻¹) pero se requieren

10 g L⁻¹ para alcanzar la misma tensión superficial en el agua. Teniendo en cuenta que la surfactina presenta una buena actividad tensoactiva, es el rendimiento la variable a maximizar con objetivo de lograr un proceso de producción competitivo a nivel industrial.

2.4 *Bacillus subtilis* COMO MICROORGANISMO PRODUCTOR

Varias bacterias como *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Serratia* y *Actinoplanes* tienen la capacidad de producir biosurfactantes lipopeptídicos [16], pero las más investigadas a lo largo de los años han sido los miembros del género *Bacillus*, ya que estas cepas contienen en su genoma un operón (*surfA*) que es responsable de la síntesis de lipopéptidos que interactúan con péptido-sintetasas no ribosómicas [9]. *B.subtilis* es una bacteria ubicua, Gram-positiva en forma de bastón, encontrada en el agua, suelos y aire, la cual contribuye en los ciclos de los diferentes nutrientes en el ambiente y es la cepa más importante en la producción de surfactina. La bacteria crece a pH= 7 y en el rango de temperatura mesofílica de 25 a 37 °C, esta característica la convierte en un microorganismo capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas y en limitación de sustrato.

Los componentes nutricionales como las condiciones ambientales y el proceso de fermentación pueden afectar la producción de biosurfactante de *B.subtilis*, ya que la producción de este metabolito está ligada al requerimiento de sustrato por parte de la célula. *B.subtilis* segrega surfactina al medio para ayudar a las moléculas traspasar la membrana celular y así puedan servir como alimento, por lo tanto, una breve modificación en el medio de cultivo conlleva a aumentar o disminuir el requerimiento de sustrato por parte de la célula y por supuesto a la producción del biosurfactante de interés.

3. ESTADO DEL ARTE

La surfactina fue descubierta en 1968 e identificada como un lipopéptido producido por el microorganismo *B.subtilis*, útil para inhibir la coagulación por fibrina en la sangre [11], y hasta la fecha se ha venido investigando este tipo de biosurfactante debido a que es uno de los más potentes surfactantes producidos biológicamente.

Se han realizado estudios para mejorar el rendimiento en la producción de surfactina. Se han estudiado las condiciones ambientales en las cuales la producción de surfactina se ve favorecida. Se ha determinado $T= 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}= 6,7$ como los valores óptimos de producción [17], agitación entre 200-300 rpm [18] [20] y aireación de 1,5 vvm [20].

También se han probado diferentes composiciones del medio. La glucosa se ha determinado como la fuente de carbono que produce mayores rendimientos [14] y la adición de iones de manganeso y hierro como elementos que favorecen el consumo de nitrógeno [22]. La adición de 2% (v/v) de aceites o hidrocarburos favorece la producción de biosurfactante [21].

Se ha determinado que la acumulación de surfactina en el medio inhibe su producción [22]. Se han investigado diversas soluciones para este problema como la remoción continua de espuma (rica en surfactante) [23] [24] [20], la adición de sólidos acarreadores como carbón activado [18] y cultivo en dos fases líquidas [25].

La mayoría de los rendimientos reportados hasta el momento se centran en el uso de glucosa como fuente de carbono. Algunos de los mejores resultados (reportados como masa de surfactante en litro de cultivo) fueron obtenidos por Yu-Hong Wei *et al.* con una producción de 3340 mg L^{-1} mediante la optimización de diferentes sales en el medio [26]; y por Mao-Sung Yeh *et al.* donde alcanzaron una producción de $6450\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante un complejo sistema *fed-batch* que incluyó un colector de espuma y reciclaje de células, adición de carbón activado, un medio de sales rico en hierro con control de pH y oxígeno disuelto. [20]. Ruey-Shin Juang Chang *et al.*

realizaron una recopilación de los rendimientos de diferentes autores hasta el 2015 [13] donde los mayores rendimientos obtenidos son presentados en la Tabla 1.

Cabe notar que la mayoría de investigaciones se centran en optimizar los parámetros de operación, encontrar diferentes técnicas de cultivo y composiciones del medio, tomando como fuente de carbono la glucosa. Las investigaciones que utilizan sustratos de bajo costo como glicerol, aguas residuales de yuca entre otros (Anexo F), han arrojado resultados prometedores pero que no han sido optimizados para poder competir con los rendimientos obtenidos en el uso de glucosa.

Tabla 1. Rendimientos reportados con medios optimizados para la producción de surfactina.

Fuente de carbono	Cepa	Rto (mg L⁻¹)	Referencia
Glicerol	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	158	(de Sousa et. al., 2014)
Glucosa	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	6450	(Yeh, Wei, & Chang, 2006)
	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	3000	(Wei & Chu, 1998)
	<i>B. subtilis</i> DSM 3256	2750	(Sen & Swaminathan, 1997)
	<i>B. subtilis</i> LB5a	3000	(Nitschke & Pastore, 2006)

3.1 VARIABLES RELEVANTES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE

VARIABLES como la temperatura, pH y agitación son fundamentales para la producción de surfactina. Basados en los valores reportados por Sen & Swaminathan, 1997 [17] se decidió parametrizar estas variables en valores cercanos a los reportados con el objetivo de orientar el esfuerzo de este trabajo a encontrar los valores de los componentes del medio de cultivo con mayor producción.

Estudios previos han permitido establecer los componentes más significativos del medio que favorecen la producción de surfactina usando *B. subtilis*. Willenbacher *et al.* 2015 [6] optimizaron el medio mínimo de sales de Cooper, reportando así los componentes del medio más relevantes para la producción de surfactina (Anexo B).

En el presente estudio se utilizó el glicerol crudo como fuente de carbono en lugar de glucosa. Se han encontrado que las sales de hierro [27] y manganeso [28] son fundamentales para obtener buena producción de surfactina y crecimiento celular, por lo tanto no pueden ser omitidas en el medio de cultivo. Sin embargo, en presencia de estos componentes se ha encontrado que los iones de potasio y magnesio tienen un aporte más significativo en la producción de surfactina [26].

Por otra parte, las concentraciones de glicerol deben ser variadas debido a que es un nuevo sustrato a evaluar.

4. METODOLOGÍA

4.1 MICROORGANISMO

La cepa *B.subtilis* ATCC6633 fue obtenida del Biofilms and Biotechnology Laboratory en Pennsylvania State University. Esta cepa se cultivó en cajas de Petri con medio Luria Bertani “LB” (Anexo B) a 37 °C por 24 h. Las cajas de Petri fueron conservadas a 4 °C y recultivadas cada 20 días.

4.2 PREINÓCULO

El medio usado para el preinóculo fue LB con las mismas composiciones para la conservación de la cepa. Se vertió 50 mL de dicho medio en frascos Erlenmeyer de 250 mL y se sometió al autoclave a 15 bar, 121 °C por 20 min y se tomó una colonia del plato de agar para realizar el sembrado. Este procedimiento se realizó por duplicado. Se dejó bajo agitación de 180 rpm a 37 °C por 24 h.

4.3 ELECCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Se evaluaron 3 medios para el cultivo de *B.subtilis* y la producción de surfactina, utilizando como única fuente de carbono el glicerol crudo obtenido de la empresa Oleoflores S.A., Valledupar, Colombia. Los medios de cultivo fueron: a) “LB”, b) *Glicerol-Peptona*, “GP” y c) *Medio Mínimo de Sales con Glicerol Crudo* “MSMCG” (Anexo B). Se hicieron cultivos en 100 mL de cada uno de los tres medios en frascos Erlenmeyer de 250 mL con una densidad óptica (DO_{600}) inicial de 0,1 y se dejaron en agitación a 180 rpm a 37 °C por 72 horas, tomando muestras a las 2, 4, 6, 24, 48 y 73 horas. Los valores de DO fueron calculados con diluciones de 1/5 con el fin de obtener mediciones proporcionales de la densidad celular con la DO. La velocidad de crecimiento μ fue calculada con la pendiente entre el logaritmo base 10 de la DO y el tiempo [32]. Por medio de la prueba cualitativa de gota colapsada

[33] se analizó la actividad surfactante. Sobre una lámina de vidrio se vertieron 2 μL de aceite de motor y 5 μL de sobrenadante de cultivo, luego de 10 minutos se comparó el colapso de la interfase aceite-medio acuoso.

4.4 VARIABLES Y NIVELES EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El medio utilizado para la fermentación fue el medio MSMCG con concentraciones fijas de Na_2HPO_4 , $\text{Na}_3\text{-Citrato}$ y CaCl_2 (Tabla 2) y las concentraciones de los compuestos restantes varió según la Tabla 3. Los cultivos se inocularon con una DO inicial de 0,1, se colocaron en una incubadora a 180 rpm y 37 °C durante 48 h.

Tabla 2. Sales fijas en el medio mínimo de sales para la fermentación

Sal	[mM]	[g L ⁻¹]
Na_2HPO_4	40,000	5,678
$\text{Na}_3\text{-Citrato}$	0,008	$2,352 \cdot 10^{-3}$
CaCl_2	0,007	$1,029 \cdot 10^{-3}$

Tabla 3. Variables y niveles para el diseño de experimentos

Variable	Nivel inferior (-1)	Nivel central (0)	Nivel superior (1)	Unidades
Glicerol crudo	5	12,5	20	g L ⁻¹
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	6	9	g L ⁻¹
MgSO_4	1	2	3	mM
KH_2PO_4	10	25	40	mM
FeSO_4	0,4	0,6	0,8	mM
MnSO_4	0,007	0,0535	0,1	mM

4.5 EXTRACCIÓN DE SURFACTINA

Para la extracción del biosurfactante, se retiró la biomasa en una centrífuga a 4160 g y 4 °C durante 10 minutos con la centrífuga Kubota modelo 6500. Se recolectó el

sobrenadante y se acidificó con HCl hasta un pH= 2, luego se dejó en reposo durante 24 h para favorecer la precipitación del biosurfactante. Posteriormente se retiró el sobrenadante por centrifugación a 4160 g y 4 °C durante 10 minutos y a la torta obtenida se vertió 5 mL de una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 y 3 mL de agua destilada con el fin de extraer los lípidos presentes por la fase orgánica de cloroformo. Se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 24 h para permitir la separación de las fases. Se descartó la fase inorgánica (superior) y la fase orgánica resultante se evaporó en una cabina extractora. Luego de 24 h se obtuvo una masa seca de biosurfactante que fue diluida en 30 mL de una solución de TRIS-HCl de pH= 8 para su consecuente caracterización.

4.6 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Se utilizó la tensión superficial de la solución semipurificada de biosurfactante producido como variable de respuesta de cada experimento, ya que a mayor concentración de biosurfactante, se espera menor tensión superficial. Esta propiedad fue medida mediante el principio del anillo de DuNöuy con el tensiómetro Fisher-Scientific modelo 20.

4.7 ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN E_{24}

En tubos de ensayo se vertieron 5 mL de solución de producto y 5 mL de sustrato hidrofóbico. Se agitó en vortex por 2 min y se dejó reposar por 24 horas. Para calcular el índice se mide la altura que tiene la fase emulsificada y se divide entre la altura total (ecuación 1).

$$\% E_{24} = \frac{\text{Altura de la emulsión } (H_e)}{\text{Altura total } (H_T)} * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS

5.1 ELECCIÓN DE TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Para determinar cuál es el tiempo adecuado de cultivo para producir surfactina, se evaluaron los sobrenadantes de LB, GP y MSMCG cultivados con *B.subtilis* por medio del ensayo de la gota colapsada. En la Figura 4 se muestra la actividad tensoactiva de cada cultivo libre de células a 24 h y 48 h y en la Figura 5 la curva de crecimiento para los diferentes medios. Cuando una gota de aceite es cubierta por una alícuota de sobrenadante, el colapso de la interfase indica la presencia de biosurfactantes, de otra forma si no hay biosurfactante la interfase continuará definida. A las 48 h el colapso de la gota es mayor (Figura 4) mientras la cepa se encuentra en la fase estacionaria (Figura 5). De acuerdo a la literatura, la producción de surfactina ocurre en la fase de crecimiento [22], y puede extenderse hasta la fase transitoria [34]. También se corroboró lo que en trabajos previos se concluye, que después de las 48 h de cultivo, la concentración de surfactante es constante [2] ya que el colapso de la gota es similar después de 48 h, (Anexo C), - Lo anterior indica que dos días es tiempo suficiente para producir el surfactante.

Figura 4. Prueba de la gota colapsada a las 24 h (a) y a las 48 h (b)

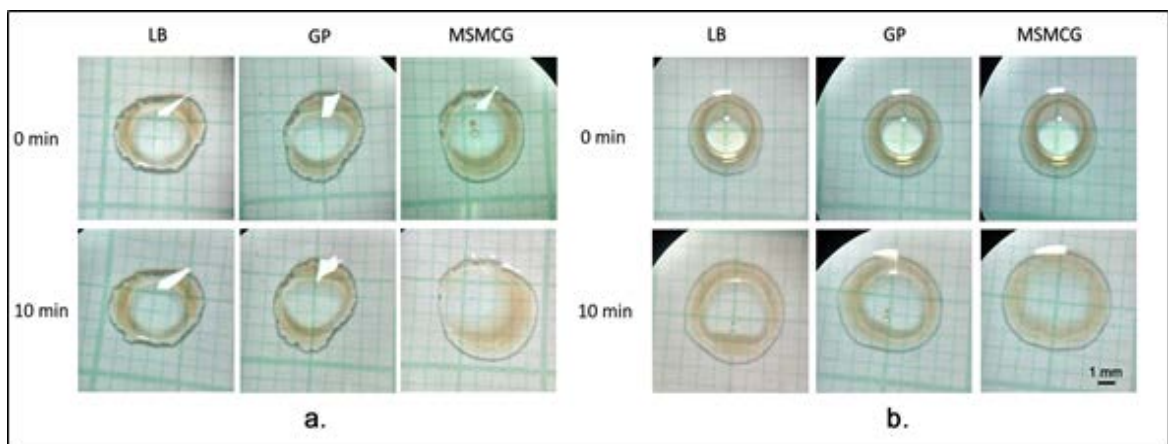
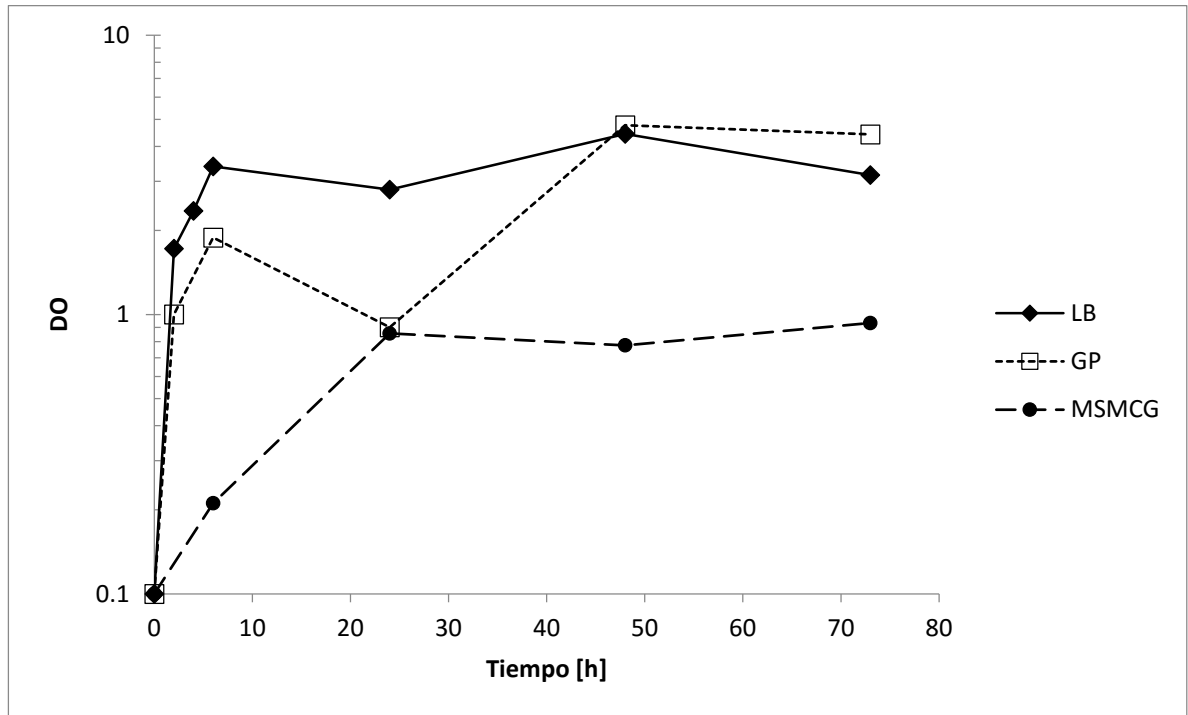


Figura 5. Curvas de crecimiento de *B.subtilis* en diferentes medios.



Para cada medio se encontró la velocidad específica de crecimiento con la pendiente de la fase de crecimiento en su respectiva curva (Tabla 4).

Tabla 4. Velocidades de crecimiento para los medios de cultivo evaluados.

Medios de cultivo	Velocidad de crecimiento μ [h ⁻¹]
LB	0,24
GP	0,19
MSMCG	0,04

La velocidad de crecimiento para el medio mínimo de sales fue menor principalmente a que los medios LB y GP los cuales son ricos en nutrientes comparados con el medio MSMCG el cual es un medio mínimo (con pocos

nutrientes). La acción tensoactiva reflejada en la gota colapsada fue mayor en MSMCG, indicando que la producción de surfactante no está solamente ligada al crecimiento celular sino también a la composición del medio. Se han reportado estudios en los cuales se obtiene menor cantidad de biomasa y mayor producción de surfactante, gracias a una limitación nutricional [35] [36].

5.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Como primera aproximación a la mejor composición de un medio basado en glicerol crudo como fuente de carbono, se eligió un diseño de experimentos fraccionado en un cuarto de 6 factores y dos niveles (2^{6-2}_{IV}). Este tipo de experimento es útil para determinar primeramente cuáles factores son más influyentes que otros y si existe curvatura en la región en las que se evalúan dichos factores [30]. Se realizaron 16 puntos factoriales y 4 centrales para un total de 20 ensayos, para los cuales las combinaciones de concentración de los factores y sus respectivas tensiones superficiales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Ensayos del diseño factorial de experimentos 2⁶⁻²_{IV}.

std	Glicerol [g L ⁻¹]	(NH ₄) ₂ SO ₄ [g L ⁻¹]	MgSO ₄ [mM]	KH ₂ PO ₄ [mM]	FeSO ₄ [mM]	MnSO ₄ [mM]	Tensión superficial [mN m ⁻¹]
1	1	-1	-1	1	1	1	50,0
2	0	0	0	0	0	0	34,1
3	1	-1	1	-1	-1	1	65,1
4	1	1	-1	-1	-1	1	54,4
5	1	1	1	-1	1	-1	50,2
6	-1	1	1	1	-1	1	51,3
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	42,0
8	-1	1	1	-1	-1	-1	52,0
9	-1	-1	1	1	1	-1	51,0
10	1	1	-1	1	-1	-1	41,0
11	0	0	0	0	0	0	37,8
12	0	0	0	0	0	0	44,6
13	-1	1	-1	1	1	-1	50,0
14	1	-1	-1	-1	1	-1	48,3
15	1	-1	1	1	-1	-1	49,4
16	1	1	1	1	1	1	44,8
17	-1	1	-1	-1	1	1	47,5
18	-1	-1	-1	1	-1	1	48,5
19	0	0	0	0	0	0	37,2
20	-1	-1	1	-1	1	1	52,1

Para el análisis del diseño de experimentos se utilizó el software Minitab® 17.1.0.

Como se observa en la Tabla 5, la combinación de factores con la menor tensión superficial corresponde a los ensayos del punto central siendo el No.2 el mejor entre ellos. De esta manera, la mejor combinación (Tabla 6) fue utilizada para las siguientes etapas de la metodología.

Tabla 6. Mejor ensayo obtenido del diseño de experimentos

Componente	Concentración
Glicerol	12,5 [g L ⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 [g L ⁻¹]
MgSO ₄	2 [mM]
KH ₂ PO ₄	25 [mM]
FeSO ₄	0,6 [mM]
MnSO ₄	0,054 [mM]
Na ₂ HPO ₄	40 [mM]
Na ₃ -Citrate	0,008 [mM]
CaCl ₂	0,007 [mM]

Del análisis de varianza arrojado por el Minitab® (Anexo D) se muestra un modelo ajustado de segundo orden (ecuación 2) y se tabulan en la Tabla 7 las contribuciones más relevantes para éste.

$$\begin{aligned}
 T = & 25,84 + 1,547 [Gly] + 1,477 [N] + 2,41 [Mg] + 0,240 [K] + 9,24 [Fe] \\
 & + 47,1 [Mn] - 0,0819 [Gly] * [N] - 0,021 [Gly] * [Mg] \\
 & - 0,02224 [Gly] * [K] - 0,980 [Gly] * [Fe] + 3,80 [Gly] * [Mn] \\
 & - 0,0114 [N] * [K] - 9,10 [N] * [Mn] - 11,43 Ct Pt
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

Tabla 7. Contribuciones relevantes en el modelo de aproximación.

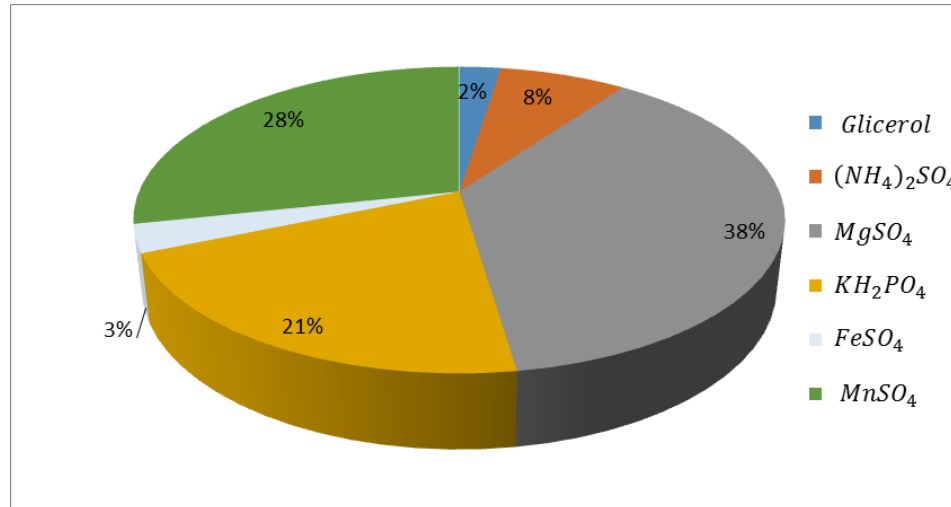
Contribución [%]			
Lineales		Interacciones de segundo orden	
Magnesio*	7,99	Magnesio-Hierro*	5,91
Potasio*	4,46	Glicerol-Potasio*	10,89
Manganeso*	6,02	Acumulado(*)	80,72
Glicerol+Nitrógeno+Hierro	2,75	Falta de ajuste	0,02
Curvatura*	45,45	Error	6,39

El error reportado es debido a la dispersión de los puntos centrales que se replicaron, puesto que los puntos factoriales no tuvieron réplicas debido a la cantidad de ensayos requeridos al utilizar 6 factores.

El criterio del valor $p < 0,05$ para encontrar variables significantes es útil en diseños de experimentos de pocos factores, pero en este caso, el uso de 6 factores requiere flexibilidad en el criterio. Entre los efectos lineales, las sales de magnesio y manganeso reportan valores- p cercanos a 0,05 (0,055 y 0,083 respectivamente), sin embargo, en la Figura 6 se destaca también la contribución de la sal de potasio con un valor $p = 0,121$.

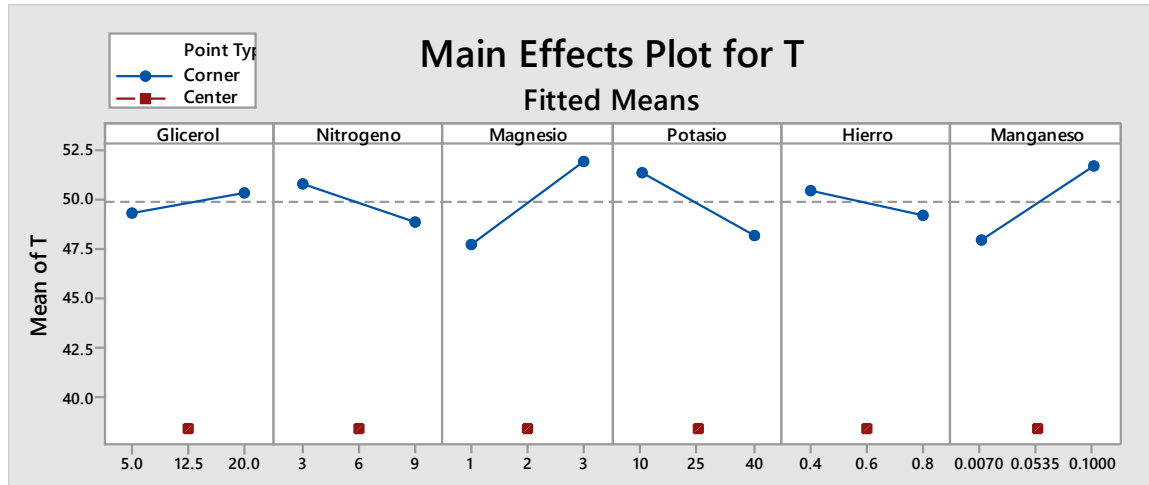
Como se muestra en la Figura 6, las variables más significativas son las sales de manganeso, magnesio y potasio.

Figura 6. Proporción de las contribuciones lineales en el modelo con base a los efectos de primer orden.



La curvatura del modelo es consecuencia de la desviación del punto central respecto a los puntos factoriales ubicados en un plano. Se muestra a continuación en la Figura 7 lo alejado que resultó la respuesta del punto central de las respuestas de los puntos factoriales, explicando así la alta contribución de la curvatura en el modelo (valor-p= 0,002). Esto demuestra que en los intervalos escogidos, los factores encierran por lo menos un punto óptimo local del proceso. Sin embargo, el modelo presentado no es útil para hacer predicciones puesto que no se cuentan con puntos axiales que completen un diseño de superficie de respuesta. La Figura 7 además nos permite confirmar que los factores más importantes son magnesio, manganeso y potasio, por sus respectivas pendientes. El análisis de varianza y las gráficas de las interacciones de los pares de cada uno de los factores puede ser revisado con detalle en el Anexo D.

Figura 7. Efectos lineales en la tensión superficial.



5.3 COMPARACIÓN DEL MSMCG RESPECTO A UN MSM CON GLUCOSA

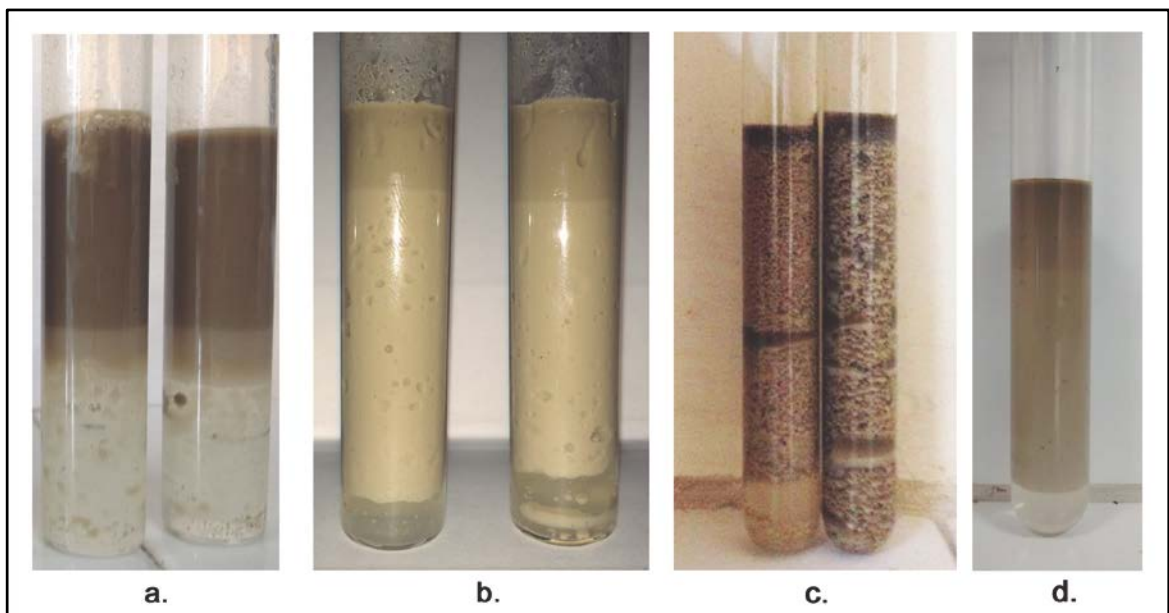
Se comparó la acción emulsificante del ensayo central (mejor resultado) obtenido previamente en el diseño de experimentos, frente a un cultivo de igual concentración de sales pero utilizando glucosa como fuente de carbono (MSMGlu). Se registraron rendimientos máxicos de torta de biosurfactante semipurificado por litro de medio de cultivo (Tabla 8) y se realizó la prueba de índice de emulsificación E₂₄ (Figura 8). En la prueba de E₂₄, inicialmente hay una fase acuosa y una fase de aceite de motor usado, después de agitarlo y dejar en reposo se presenta una emulsión entre las dos fases, así, cuanto más grande sea la emulsión, arrojará un valor del índice más grande que a su vez se traduce en una alta acción emulsificante del biosurfactante evaluado.

Tabla 8. Rendimientos de biosurfactante semipurificado de diferentes cultivos.

Cultivo	Rendimiento [g L ⁻¹]
MSMCG	1,1980 ± 0,17
MSMGlu	1,1400 ± 0,23
W-Glu	1,2620

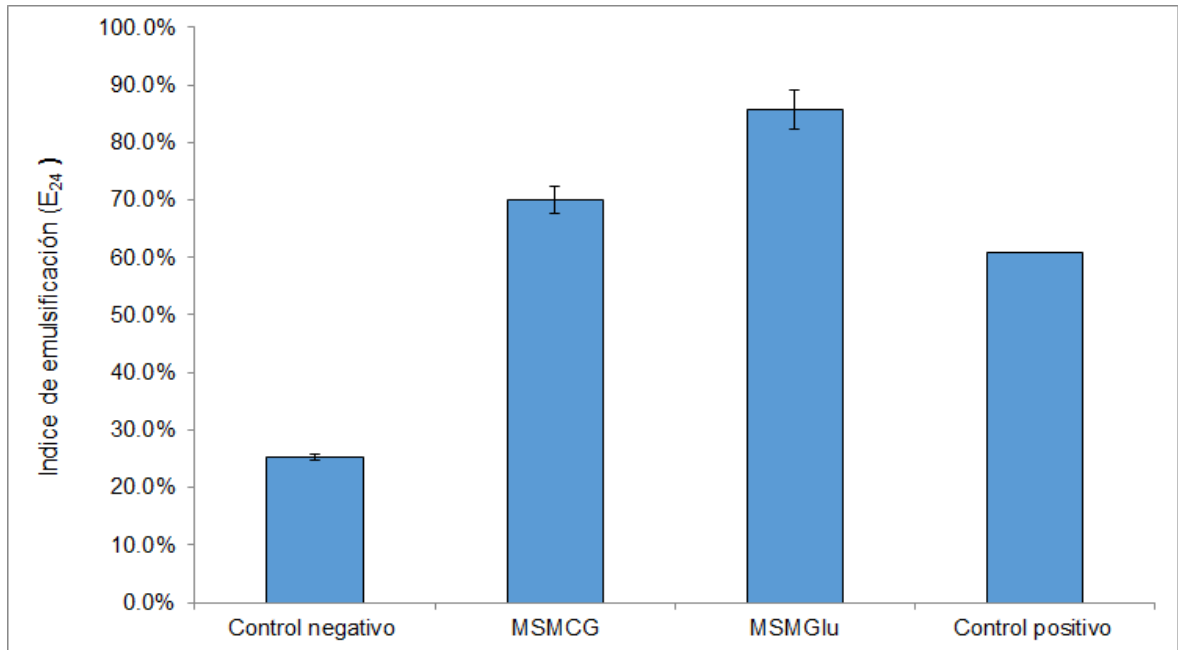
Se realizó un tercer ensayo de un medio de sales optimizado por Willenbacher *et al.* 2015 [6], con el propósito de comparar los rendimientos obtenidos con el medio definido en este trabajo (Tabla 6).

Figura 8. Prueba del índice E_{24} para; a) control negativo (solución de producto resultado de cultivo sin inocular), b) solución de biosurfactante producido con MSMCG, c) solución de biosurfactante producido con MSMGlu y d) control positivo (SDS 0,4 g L⁻¹).



Se evidencian las fases formadas con los diferentes biosurfactantes obtenidos, en cada ensayo se midió la altura de la emulsión y los resultados del índice obtenido se muestran en la Figura 9.

Figura 9. Diagrama de barras para la prueba de E₂₄.



Los rendimientos registrados (Tabla 8) se encuentran dentro del orden de magnitud reportado en la literatura (Anexo F). No se encontró diferencia significativa entre los ensayos de MSMCG y MSMGlu comparando sus rendimientos e índices de emulsificación. Sin embargo, si se encontró un aumento significativo del índice de emulsificación de los medios MSMCG y MSMGlu respecto al control negativo, indicando la presencia de un agente surfactante en el medio (Ver pruebas de Tukey en Anexo D).

Los índices de emulsificación obtenidos en el presente trabajo con aceite de motor usado no pueden ser evaluados directamente con otros índices reportados en la literatura puesto que el valor de estos varía con la sustancia escogida. Sin embargo se muestran algunos resultados del E₂₄ para diferentes hidrocarburos (Anexo H)

6. CONCLUSIONES

Fue posible producir biosurfactantes a partir de glicerol residual utilizando *B. subtilis*.

Dentro de la región de concentraciones evaluadas en glicerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , FeSO_4 y MnSO_4 se encuentra por lo menos un punto óptimo local donde la tensión superficial es mínima.

Se encontró que las tres variables más importantes para la producción de surfactante en MSMCG son las sales de Mg, Mn y K en la región evaluada.

El surfactante obtenido presentó alto porcentaje de emulsificación en un aceite de motor usado, por lo que podría ser útil en la remoción de hidrocarburos en cuerpos de agua.

7. RECOMENDACIONES

Para una optimización más rigurosa del medio, podría realizarse un análisis de superficie de respuesta en la misma región evaluada en este trabajo. Para esto, se podrían añadir puntos axiales para completar un diseño central compuesto (DCC).

Partiendo de que las tensiones superficiales en la superficie de respuesta estarán alrededor del valor más bajo obtenido en este trabajo (34 mN cm^{-1}) se debe cambiar la variable de respuesta, puesto que la tensión superficial es una medida indirecta de la concentración de surfactina y útil solo en la región anterior al punto del CMC, donde las moléculas de surfactina se aglomeran para formar micelas [31]. Cuando la concentración de surfactante se acerca a este punto, la relación lineal entre esta variable y la tensión superficial se pierde, la variación de la tensión superficial se acerca a cero. Este comportamiento se muestra en el Anexo E. Se propone la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) como técnica a utilizar para la cuantificación de surfactante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHATZIFRAGKOU, A., DIETZ, D., KOMAITIS, M., ZENG, A. P., and PAPANIKOLAOU, S. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. En: Biotechnology Bioengineering. Vol. 107, No. 1, (2010), p. 76 – 84.
- [2] DA SILVA, G. P., MACK, M. y CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En: Biotechnology Advances. Vol. 27, No. 1 (2009); p. 30–39.
- [3] DE FARIA, A. F., TEODORO-MARTINEZ, D. S., DE OLIVEIRA BARBOSA, G. N., GONTIJO VAZ, B., SERRANO SILVA, Í., GARCIA, J. S., TÓTOLA, M. R., EBERLIN, M. N., GROSSMAN, M., ALVES, O. L. y REGINA DURRANT, L. Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. En: Process Biochemistry. Vol. 46, No. 10 (2011); p. 1951–1957.
- [4] KLUGE, B., VATER, J., SALNIKOW, J. y ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. En: FEBS letters. Vol. 231, No. 1 (1988); p. 107–110.
- [5] CAMEOTRA, S. S. y MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. En: Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 50, No. 5 (1998); p. 520–529.
- [6] WILLENBACHER, J., YEREMCHUK, W., MOHR, T., SYLDATK, C. y HAUSMANN, R. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. En: *AMB Express*, Vol. 5, No. 1 (2015); p. 5-14.
- [7] SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Biosurfactants: from genes to applications. México: Springer, 2010.
- [8] PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. y

- CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. En: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 12, No. 1 (2011); p. 633–654.
- [9] KOSARIC, N. y SUKAN, F. V. BIOSURFACTANTS: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. En: BIOSURFACTANTS: Biosurfactants Production Applications, Vol. 159. 2014.
- [10] ROSENBERG, E. y RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 52, No. 2 (1999); p. 154–162.
- [11] ARIMA, K., KAKINUMA, A. y TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. En: Biochemical and biophysical research communications. Vol. 31, No. 3 (1968); p. 488–494.
- [12] SEYDLOVÁ G. y SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. En: Open Medicine. Vol. 3, No. 2 (2008); p. 123–133.
- [13] CHEN, W. C., JUANG, R. S. y WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 103, No. February (2015); p. 158–169.
- [14] DAS, K. y MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. En: Process Biochemistry. Vol. 42, No. 8 (2007); p. 1191–1199.
- [15] CHEN, W. C., JUANG, R. S. y WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 103 (2015); p. 158–169.

- [16] LIU, J. F., MBADINGA, S., YANG, S. Z., GU, J. D. y MU, B. Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. En: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 16, No. 3 (2015); p. 4814–4837.
- [17] SEN, R. y SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 47, No. 4 (1997); p. 358–363.
- [18] YEH, M., WEI, Y. y CHANG, J. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. En: Biotechnology Progress. Vol. 21, (2005); p. 1329–1334.
- [19] AMANI, H., HAGHIGHI, M. y KESHTKAR, M. J. Production and Optimization of Microbial Surfactin by *Bacillus subtilis* for Ex Situ Enhanced Oil Recovery. En: Petroleum Science and Technology. Vol. 31, No. 12 (2013); p. 1249–1258.
- [20] YEH, M. S., WEI, Y. H. y CHANG, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. En: Process Biochemistry. Vol. 41, No. 8 (2006); p. 1799–1805.
- [21] GHRIBI, D. y ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. En: Biotechnology Research International. Vol. 2011, (2011); p. 1–6.
- [22] COOPER, D. G., MACDONALD, C. R., DUFF, S. J. B. y KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 42, No. 3 (1981); p. 408–412.
- [23] SANTOS DA SILVA, M. T., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S. y SANTANA, C. C. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001

- by semi-batch foam fractionation. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 104, (2015); p. 91-97.
- [24] CHENIKHER, S., GUEZ J. S., COUTTE, F., PEKPE, M., JACQUES, P. y CASSAR, J. P. Control of the specific growth rate of *Bacillus subtilis* for the production of biosurfactant lipopeptides in bioreactors with foam overflow. En: Process Biochemistry. Vol. 45, No. 11 (2010); p. 1800–1807.
- [25] DROUIN, C. M. y COOPER, D. G. Biosurfactants and Aqueous Two-Phase Fermentation. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 40, No. 1 (1992); p. 86–90.
- [26] WEI, Y., LAI, C.C. y CHANG, J. S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. En: Process Biochemistry. Vol. 42, No. 1 (2007); p. 40–45.
- [27] WEI, Y., WANG, L.F. y CHANG, J. S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. En: Biotechnology Progress. Vol. 20, No. 3 (2004); p. 979–983.
- [28] WEI Y. y CHU, Y I. Mn²⁺ + improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. En: Biotechnology Letters. Vol. 24, (2002); p. 479–482.
- [29] HUANG, X., LIU, J., WANG, Y., LIU, J. y LU, L. The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. En: Biotechnology & Biotechnological Equipment. Vol. 29, No. 2 (2015) p. 381–389.
- [30] MONTGOMERY, D. C. Diseño Y Análisis De Experimentos. México: Limusa, 2004.
- [31] RAIGER, L. y LÓPEZ, N. Los biosurfactantes y la industria petrolera”. *QuímicaViva*, Vol. 3, (2009); p. 145–209.

- [32] SUTTON, S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. En: *Journal Validation Technology*. Vol 17, (2011); p 46–49.
- [33] JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H. y TREVORS, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. En: *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 13, No. 4 (1991); p. 271–279.
- [34] SHEPPARD J. D. y MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 27, (1987); p. 110–116.
- [35] CHEN, C.-Y., BAKER, S. C. y DARTON, R. C. Continuous production of biosurfactant with foam fractionation. En: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 81, (Mayo 2006); p. 1915–1922.
- [36] ETCHEGARAY, A. y ZORZETO, R. H. Coprodução de biomassa e biosurfactantes de *bacillus subtilis* reciclando alimentos , resíduos de biomassa e da síntese de biodiesel, En: *Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica*, 2012.

BIBLIOGRAFÍA

- CHEN, W. C., JUANG, R. S. y WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 103, No. February (2015); p. 158–169.
- COLLINS, C., LYNE, P., GRANGE, J. y FALKINHAM III, J. O. Collins and Lyne's microbiological methods. 8 ed. London: Arnold, 2004.
- COOPER, D. G., MACDONALD, C. R., DUFF, S. J. B. y KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 42, No. 3 (1981); p. 408–412.
- KOSARIC, N. y SUKAN, F. V. BIOSURFACTANTS: Production and Utilization Processes, Technologies, and Economics. En: BIOSURFACTANTS: Biosurfactants Production Applications, Vol. 159. 2014.
- MONTGOMERY, D. C. Diseño Y Análisis De Experimentos. México: Limusa, 2004.
- MULLIGAN, C. N., SHARMA, S. K. y MUDHOO, A. Biosurfactants: Research Trends and Applications. Boca Raton: CRC Press, 2014
- PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. y CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances.

En: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 12, No. 1 (2011); p. 633–654.

- SEN, R. Biosurfactants. En: Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 672, USA: Springer, 2010; p. 331.
- _____ y SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 47, No. 4 (1997); p. 358–363.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Biosurfactants: from genes to applications. México: Springer, 2010.
- WEI, Y., LAI, C.C. y CHANG, J. S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. En: Process Biochemistry. Vol. 42, No. 1 (2007); p. 40–45.
- WILLENBACHER, J., YEREMCHUK, W., MOHR, T., SYLDATK, C. y HAUSMANN, R. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. En: *AMB Express*, Vol. 5, No. 1 (2015); p. 5-14.

ANEXOS

Anexo A. Aplicaciones de los biosurfactantes.

Tabla A1. Diferentes aplicaciones para los biosurfactantes.

Campo	Aplicación	Mecanismo de acción
Petróleo	Recobro mejorado	Reduciendo la viscosidad del crudo, y tensiones superficiales lo que permite un mayor fenómeno de capilaridad. Mejorando la solubilidad en otros fluidos para su fácil extracción.
Ambiental	Bioremediación	Emulsificación de hidrocarburos, disminuyendo la tensión interfacial y permitiendo su mayor biodisponibilidad para ser utilizado como sustrato para microorganismos. Actuando como agente secuestrante de metales. Extrayendo contaminantes del suelo, al solubilizarse en soluciones acuosas.
Alimentos y cosméticos	Emulsificantes y demulsificantes	Forma emulsiones estables que mejora el tratamiento de materias primas, lubricación, formación/reducción de espuma. Solubiliza los aceites esenciales y eliminan radicales libres (antioxidante).
Biológico	Farmacéutica	Desestabiliza membranas celulares, perjudicando la integridad de las células (antifúngico y antibacterial), evitan la formación de biopelículas. Forman microemulsiones para el acarreo de compuestos activos.
Agricultura	Biocontrol	Control por parasitismo gracias al daño a las membranas celulares de los hongos que perjudican los cultivos. Formación de canales para la transferencia de iones K ⁺ a los que se le atribuye la actividad antifúngica.

Fuente: Extraída y modificada de Kosaric & Sukan, 2014 [9].

Anexo B. Composiciones para los diferentes medios utilizados.

Tabla B1. Medio mínimo de sales con glucosa

Componente	Concentración
Glucosa	8 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: Willenbacher et al. 2015 [6]

Tabla B2. Medio Luria Bertani

LB	
Componente	Concentración [g L⁻¹]
Triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Agar Bacteriológico (sólo para medio sólido)	15

Tabla B3. Medio Glicerol-Peptona



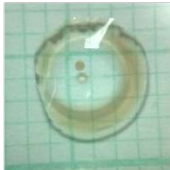
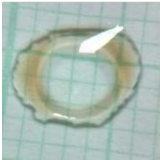

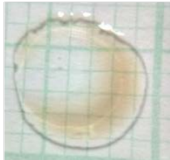

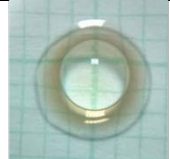
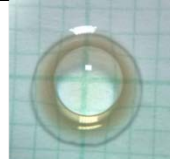
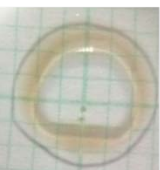
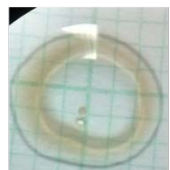
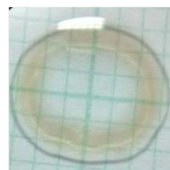
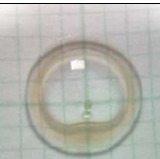
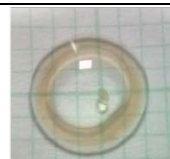
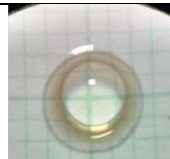
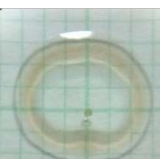
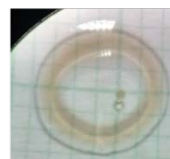
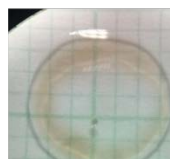
GP	
Componente	Concentración [g L⁻¹]
Glicerol crudo	10
Peptona	10

Tabla B4. Medio mínimo de sales con glicerol crudo

MSMSCG	
Componente	Concentración
Glicerol crudo	10 [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 C. Prueba de la gota colapsada

Tabla C 1. Prueba de gota colapsada en diferentes tiempos de cultivo

Tiempo de cultivo	Tiempo de la prueba	LB	GP	MSMCG
24 h	0 min			
	10 min			
48 h	0 min			
	10 min			
73 h	0 min			
	10 min			

Anexo D. Análisis de variabilidad (ANOVA) del diseño de experimentos.

Tabla D1. Codificación de las variables

Factor	Nombre
A	Glicerol crudo
B	Nitrógeno [(NH ₄) ₂ SO ₄]
C	Magnesio [MgSO ₄]
D	Potasio [KH ₂ PO ₄]
E	Hierro [FeSO ₄]
F	Manganeso [MnSO ₄]

Estructura de alias

I + ABCE + ADEF + BCDF

A + BCE + DEF + ABCDF

B + ACE + CDF + ABDEF

C + ABE + BDF + ACDEF

D + AEF + BCF + ABCDE

E + ABC + ADF + BCDEF

F + ADE + BCD + ABCEF

AB + CE + ACDF + BDEF

AC + BE + ABDF + CDEF

AD + EF + ABCF + BCDE

AE + BC + DF + ABCDEF

AF + DE + ABCD + BCEF

BD + CF + ABEF + ACDE

BF + CD + ABDE + ACEF

Los siguientes términos están confundidos con otros términos y fueron removidos del análisis. Para más información ver la estructura de alias.

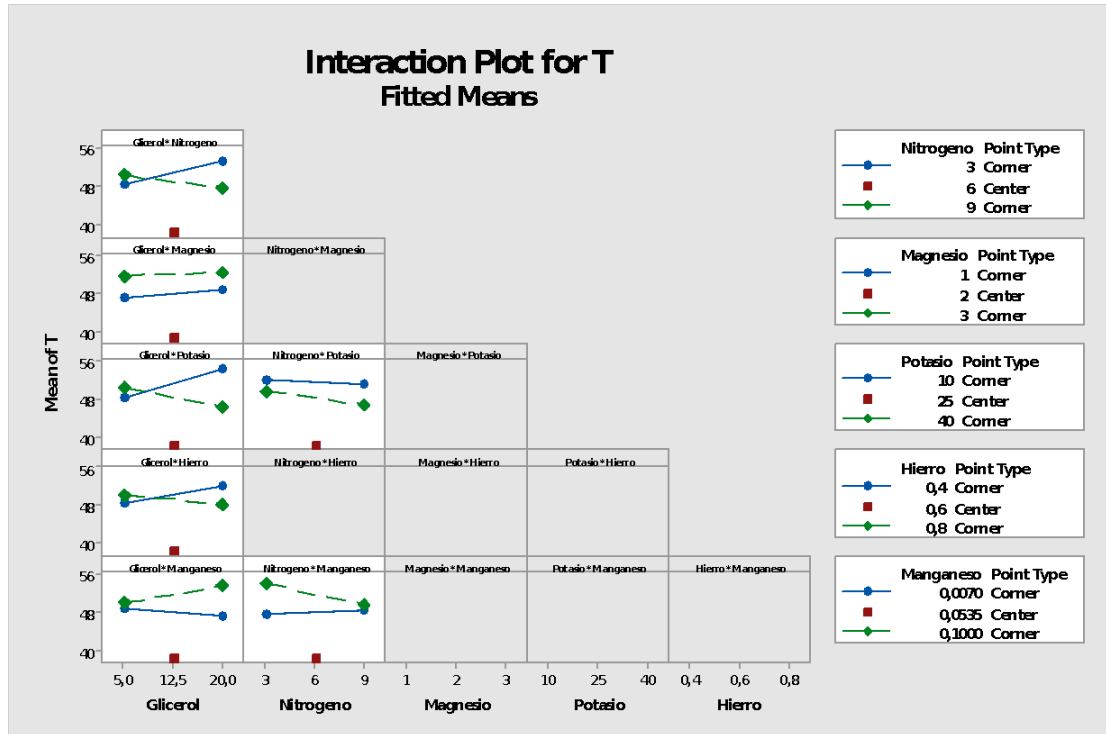
Nitrogeno*Magnesio, Nitrogeno*Hierro, Magnesio*Potasio, Magnesio*Hierro, Magnesio*Manganeso, Potasio*Hierro, Potasio*Manganeso, Hierro*Manganeso

Figura E1. Análisis de varianza.

Analysis of Variance							
Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	14	861,039	93,59%	861,039	61,503	5,21	0,039
Linear	6	195,198	21,22%	195,198	32,533	2,76	0,143
Glicerol	1	4,749	0,52%	4,749	4,749	0,40	0,554
Nitrogeno	1	14,726	1,60%	14,726	14,726	1,25	0,315
Magnesio	1	73,531	7,99%	73,531	73,531	6,23	0,055
Potasio	1	41,013	4,46%	41,013	41,013	3,48	0,121
Hierro	1	5,800	0,63%	5,800	5,800	0,49	0,515
Manganeso	1	55,378	6,02%	55,378	55,378	4,69	0,083
2-Way Interactions	7	247,687	26,92%	247,687	35,384	3,00	0,122
Glicerol*Nitrogeno	1	54,391	5,91%	54,391	54,391	4,61	0,085
Glicerol*Magnesio	1	0,396	0,04%	0,396	0,396	0,03	0,862
Glicerol*Potasio	1	100,167	10,89%	100,167	100,167	8,49	0,033
Glicerol*Hierro	1	34,565	3,76%	34,565	34,565	2,93	0,148
Glicerol*Manganeso	1	28,134	3,06%	28,134	28,134	2,38	0,183
Nitrogeno*Potasio	1	4,237	0,46%	4,237	4,237	0,36	0,575
Nitrogeno*Manganeso	1	25,798	2,80%	25,798	25,798	2,19	0,199
Curvature	1	418,155	45,45%	418,155	418,155	35,44	0,002
Error	5	59,000	6,41%	59,000	11,800		
Lack-of-Fit	2	0,209	0,02%	0,209	0,104	0,01	0,995
Pure Error	3	58,792	6,39%	58,792	19,597		
Total	19	920,040	100,00%				
Model Summary							
	S	R-sq	R-sq(adj)	PRESS	R-sq(pred)		
	3,43513	93,59%	75,63%	117,867	87,19%		

Fuente: Obtenido del análisis de Minitab

Figura D2. Efectos de las interacciones de segundo orden sobre la tensión superficial.



Prueba de significancia de Tukey para los rendimientos obtenidos con glicerol y glucosa. (Minitab)

Comparaciones de pares de la prueba de Tukey.

Información de los grupos usando el método de Tukey con nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Mean	Grouping
Glicerol	2	1,198	A
Glucosa	2	1,140	A

Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferente.

Prueba de significancia de Tukey para los índices de emulsificación obtenidos con glicerol y glucosa. (Minitab)

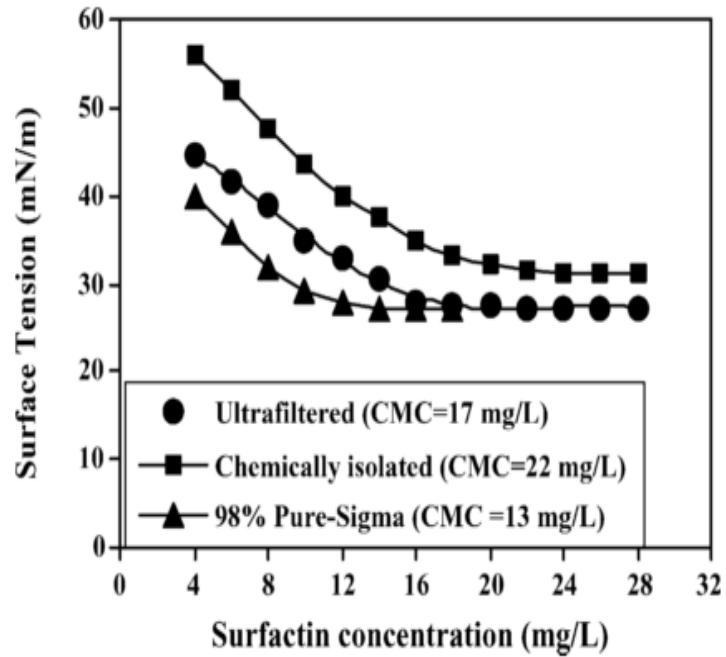
Comparaciones de pares de la prueba de Tukey.

Información de los grupos usando el método de Tukey con nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Mean	Grouping
MSMGlu	2	86,00	A
MSMCG	4	69,97	A
Control negative	3	25,267	B

Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferente.

Anexo E. Perfil de tensión superficial a diferentes concentraciones de surfactina



Obtenido de Sen & Swaminathan, 2005. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin

Anexo F. Rendimientos de producción de surfactina reportados en la literatura.

Figura F 1. Rendimientos de producción de surfactina.

Fermentation cultivation media for surfactin production by microorganisms.

Strains	Media types	Surfactin production (mg/L)
Medium compositions and characteristics		
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Complex medium-Nutrient broth	100
<i>B. subtilis</i> MZ-7	Defined medium-Optimized medium	280
<i>B. subtilis</i> MZ-7	Complex medium-Brain heart infusion media	280
<i>B. subtilis</i> MZ-7	Complex medium-Pharmamedia medium	220
<i>B. subtilis</i> MZ-7	Semidefined medium-Pharmamedia medium plus Fe ²⁺	300
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Defined medium plus Fe ²⁺	1500
Nitrogen sources		
<i>B. subtilis</i> BS5	Mineral Salt Medium (MSM) plus ammonium oxalate	190
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus urea	250
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus yeast extract	0
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus peptone	20
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus tryptone	210
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus corn steep liquor	250
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus sodium nitrate	540
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus potassium nitrate	340
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ammonium nitrate	440
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ammonium chloride	400
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ammonium bromide	230
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ammonium carbonate	60
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ammonium sulfate	160
Trace elements		
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	MSM plus Fe ²⁺ cation	3000
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	MSM plus Mn ²⁺ cation	2600
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus ZnSO ₄	1750
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus FeSO ₄	400
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus FeCl ₃	1000
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus MnCl ₂	700
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus MnSO ₄	2000
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus NiCl ₂	480
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus BaCl ₂	510
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus Na ₂ MoO ₄	200

Figura F 1. (Continuación)

Carbohydrate		
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus D-glucose	800
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus D-fructose	480
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus sucrose	700
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus maltose	500
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus lactose	130
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus galactose	140
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus D(+)-mannose	520
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus D-sorbitol	720
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus glucose syrup	520
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus molasses	1120
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus malt extract	450
Hydrocarbons and fatty acids		
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus 2% Soybean oil	380
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus 2% Olive oil	310
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus 2% Glycerol	250
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus 2% Hexadecane	370
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus 2% Paraffin oil	370
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Olive oil	1000
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Corn oil	1100
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Sunflower oil	1100
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Kerosene	1700
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Paraffine	1300
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Diesel	1500
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Benzene	1000
<i>B. subtilis</i>	MSM plus 2% Heptane	1200
Precursors of surfactin		
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus D,L-leucine	310
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus L-aspartic acid	300
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus L-valine	400
<i>B. subtilis</i> BS5	MSM plus Glutamate	410
Renewable-resources		
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	MSM plus cassava wastewater	2200
<i>B. subtilis</i> LB5a	MSM plus cassava wastewater	3000
<i>B. subtilis</i> LB5a	MSM plus cassava wastewater	2600
<i>B. subtilis</i> LAMI008	MSM plus cashew apple juice	3.5
<i>B. subtilis</i> LAMI005	MSM plus cashew apple juice	123
<i>B. subtilis</i>	MSM plus potato process effluent	900
<i>B. subtilis</i>	MSM plus potato process effluent	400

Fermentation strategies for production of surfactin by microorganisms.

Strains	Fermentation strategies	Surfactin production (mg/L)
<i>B. subtilis</i> YRE207	Batch cultivation by carbon/nitrogen	46%
<i>B. subtilis</i>	Batch cultivation by carbon/nitrogen	900
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Batch cultivation by adding trace elements	3000
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Batch cultivation by adding trace elements	2600
<i>B. subtilis</i>	Batch cultivation by adding hydrocarbons	1700
<i>B. subtilis</i>	Batch cultivation by adding vegetable oils	1100
<i>B. subtilis</i> BS5	Batch cultivation by adding precursors	410
<i>B. subtilis</i>	Batch cultivation by renewable-resources	900
<i>B. subtilis</i> ATCC 55,033	Batch cultivation by genetic engineering	4
<i>B. subtilis</i> E8	Batch cultivation by genetic engineering	10.26
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Continuous culture	350
<i>B. subtilis</i>	Continuous culture	900
<i>B. subtilis</i>	Continuous culture	1100
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Continuous culture	6450
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Continuous culture	393
<i>B. subtilis</i> ATCC 21,332	Batch culture with immobilization	3600
<i>B. subtilis</i> DSM 3256	Statistical optimization	CMC ⁻¹ = 45.1 ^a
<i>B. subtilis</i>	Statistical optimization	132.4

^a Surfactin production was presented as CMC⁻¹ according to the original article.

Fuente: Extraído de Chen, Juang, & Wei, 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms.

Anexo G. Análisis de la muestra de glicerol residual utilizado en la investigación.

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]: ☐																									
Comentarios del cliente: _____																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <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 H. Índice de Emulsificación (E₂₄) de biosurfactante para diferentes hidrocarburos

Tabla H1. Índice de Emulsificación (E₂₄) de biosurfactante para diferentes hidrocarburos

Emulsification index EI ₂₄ (%)	
Hydrocarbons	Surfactin (C ₁₄ /Leu ₇)
Tridecane	56.8 ± 0.6
Pristane	55.6 ± 1.9
Diesel	55 ± 0.3
Kerosene	59.1 ± 0.4
Hexadecene	55 ± 0.8
Toluene	49.6 ± 1.4
Heptane	52.8 ± 1.6
Benzene	53.2 ± 2.2
Tetradecane	58 ± 0.3
Crude oil	67.6 ± 1.0

Fuente: De Faria *et. al.*, 2011 [3].