

BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN HIDROCARBUROS
PARA DETERMINAR EL POTENCIAL PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTES Y
DETERMINACIÓN DE EQUIPOS PRINCIPALES PARA SU PRODUCCIÓN.

SEBASTIAN NIÑO OSSA

UNIVERSIDAD EAN

BOGOTÁ D.C., 14 JUNIO DE 2019

UNIVERSIDAD EAN

FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE PROCESOS

BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN HIDROCARBUROS
PARA DETERMINAR EL POTENCIAL PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTES Y
DETERMINACIÓN DE EQUIPOS PRINCIPALES PARA SU PRODUCCIÓN.

AUTOR
SEBASTIAN NIÑO OSSA
Ingeniero Químico

Tesis presentada como requisito para optar por el título de:
Magíster en Ingeniería de Procesos

DIRECTOR
PAOLA ANDREA BAUTISTA DUARTE
Microbióloga M.Sc

BOGOTÁ D.C., 14 JUNIO DE 2019

FIRMA DE LOS JURADOS Y DIRECTOR

DIRECTOR

JURADO 1

JURADO 2

DEDICATORIA

*A Dios,
a mi papá Humberto, a mi mamá Nubia y a mi hermana Catalina,
por estar ahí siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A Paola Andrea Bautista Duarte por brindarme su tiempo y conocimientos los cuales fueron parte fundamental en el desarrollo del proyecto y haber aceptado la participación como Directora del Proyecto.

A Mónica Amado por brindarme su colaboración y conocimientos para realizar revisiones al documento.

A Karem Ruiz y Camilo Castillo por facilitarme las instalaciones de los laboratorios de biología y realizar el acompañamiento en los ensayos realizados.

A Javier Velandia por brindarme su tiempo y colaboración para el desarrollo de las pruebas con equipo especializado en las instalaciones del laboratorio.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General.	14
2.2 Objetivos Específicos.	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
3.1 Hipótesis	16
4. MARCO TEÓRICO	17
4.1 Surfactantes	17
4.1.1 Efectos de los surfactantes	21
4.2 Biosurfactantes	22
4.2.1 Clasificación de los biosurfactantes	23
4.2.2 Propiedades de los biosurfactantes	29
4.2.3 Caracterización de biosurfactantes.	30
4.2.4 Biosíntesis de biosurfactantes	30
4.3 Bioprospección de microorganismos.	31
4.4 Curva de crecimiento	32
4.5 Producción de biosurfactantes	34
4.5.1 Producción industrial	35
4.6 Diseño conceptual	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 Metodología	42
5.2 Muestras de crudo	43
5.3 Medios de cultivo	43
5.3.1 Medios de cultivo para aislamiento de microorganismos	43
5.4 Tinción de Gram	45
5.5 Producción de biosurfactante	46
5.5.1 Cultivo para producción de biosurfactante.	46
5.5.2 Etapas experimentales	47

5.6	Curva de crecimiento _____	48
5.7	Centrifugación ácida. _____	49
5.8	Caracterización del biosurfactante por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). _____	49
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	50
6.1	Aislamiento microorganismos de las muestras de crudo _____	50
6.2	Tinción de Gram _____	53
6.3	Producción de biosurfactante _____	54
6.3.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). _____	59
7.	DISEÑO CONCEPTUAL _____	62
7.1	Nivel 0: Información de Referencia. _____	62
7.2	Nivel 1: Tipo de operación _____	63
7.3	Nivel 2: Estructura de entradas y salidas _____	64
7.3.1	Primera línea – Inoculación del microorganismo: _____	64
7.3.2	Segunda línea – Bioproceso _____	67
7.4	Nivel 3: Estructura de separación _____	68
7.5	Nivel 4: Estructura de Recirculaciones. _____	68
8.	CONCLUSIONES _____	70
9.	BIBLIOGRAFÍA _____	71
	ANEXO 1. DIAGRAMA DE BLOQUES _____	76

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Toxicidad Colectiva _____	22
Figura 2: Rutas metabólicas de la psuedomonas aeruginosas para producir ramnolípidos _____	31
Figura 3: Curva de crecimiento de microorganismos _____	34
Figura 4: Clasificación de los procesos de separación sólido-líquido. _____	40
Figura 5: Metodología implementada para el desarrollo del proyecto. _____	42
Figura 5: Siembra de crudos en medido mínimo de sales _____	50
Figura 6: Siembra muestras líquidas y crudo en agar Nutritivo y King B _____	51
Figura 7: Siembra selectiva de microorganismos en agar Agar King B y Agar Nutritivo	52
Figura 8: Tinción de Gram. (Izquierda: Bacilos gram positivos esporulados. Derecha: bacilos cortos gram negativos) _____	54
Figura 9: Ensayo de producción de biosurfactantes _____	55
Figura 10: Curva de crecimiento microorganismos _____	57
Figura 11: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de Ramnolípidos _____	59
Figura 12: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de Producto obtenido ____	60
Figura 13: Entradas y salidas general para producción biomasa. _____	65
Figura 14: Escalamiento crecimiento biomasa. _____	66
Figura 15: Entradas y salidas producción biosurfactante. _____	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de surfactantes _____	17
Tabla 2: Usos de los surfactantes sintéticos _____	18
Tabla 3: Clasificación y uso de los biosurfactantes _____	24
Tabla 4: Etapas del diseño conceptual de procesos _____	38
Tabla 5: Composición Medio Mínimo de Sales _____	44
Tabla 6: Listado de cultivos _____	44
Tabla 7: Composición Agar Nutritivo y Agar King B _____	45
Tabla 8: Composición Caldo Nutritivo _____	46
Tabla 9: Composición Medio de Cultivo con Inductores de producción de biosurfactantes _____	46
Tabla 10: Dosificaciones para ensayo de producción de biosurfactante _____	48
Tabla 11: Resultados cualitativos de las siembras _____	50
Tabla 12: Resultados tinción de gram _____	53
Tabla 13: Resultados disminución de anillo de aceite _____	55
Tabla 14: Resultados Producción _____	58
Tabla 15: Selección del tipo de operación. _____	63
Tabla 16: Volúmenes requeridos para producción _____	65
Tabla 17: Concentración en peso producción lote de biosurfactante _____	68

RESUMEN

El desarrollo biotecnológico de los biosurfactantes comienza a tomar interés en los investigadores, gracias a sus características de baja toxicidad y biodegradabilidad. Sin embargo, los procesos de bioprospección en el país son escasos enfocados en la búsqueda de microorganismos que a partir del aprovechamiento de sustancias oleosas como fuente de carbono tenga la habilidad fisiológica de producir sustancias como los ramnolípidos que permita degradar la sustancia oleosa para su consumo. En este trabajo se presenta el proceso de bioprospección de microorganismos nativos en tres muestras puntuales de hidrocarburos de los departamentos del Casanare y Boyacá, enfocado a la búsqueda de *Pseudomonas sp.*, por ser un grupo reportado en otros países para la producción de ramnolípidos y propone los equipos mínimos necesarios para iniciar un proceso de producción en el país de biosurfactantes a nivel de ingeniería conceptual para entrar como competencia dentro del mercado nacional, ofreciendo un producto que minimiza los impactos en el ambiente.

PALABRAS CLAVES: Bioprospección, Biosurfactantes, Ingeniería conceptual, *Pseudomonas sp.*, Ramnolípidos

ABSTRACT

The biotechnological development of biosurfactants begins to take interest in the researchers, thanks to its characteristics of low toxicity and biodegradability. However in the country, bioprospecting processes are scarce focused on search for microorganisms that from oily substances as a carbon source have the physiological ability to produce substances such as rhamnolipids that allow degrading the oily substance for consumption. This work presents the process of bioprospecting native microorganisms in three samples of hydrocarbons from departments of Casanare and Boyaca, focused on searching *Pseudomonas sp.*, reported in other countries as a rhamnolipids producer and propose the minimum equipment necessary to start a production process in the country of biosurfactants at engineering conceptual level to enter as competition within the national market, offering a product that minimizes environmental impacts.

KEYWORDS: Bioprospecting, Biosurfactants, Conceptual Engineering, *Pseudomonas sp.*, Rhamnolipids

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de recursos naturales como suelo, agua, aire con sustancias peligrosas o tóxicas, es más frecuente a nivel mundial y se ha convertido en uno de los principales retos para brindar alternativas por parte del sector industrial. Para la solución de los impactos que se han generado por la presencia de sustancias xenobióticas en los ecosistemas, estrategias como la biorremediación *in situ* o *ex situ*, permite el aprovechamiento de los organismos o de sus metabolitos para que se lleve a cabo la mineralización total o parcial de los contaminantes (Boopathy, 2000), y de esta forma, se minimice el impacto de los contaminantes presentes en los ecosistemas

Dentro de los microorganismos reportados para uso de las técnicas de biorremediación se encuentran bacterias aerobias como *Pseudomonas sp*, *Sphingomonas sp*, *Rhodococcus sp* y *Mycobacterium sp*; se han usado para la degradación de pesticidas e hidrocarburos, utilizando el contaminante como fuente de carbono (Kumar , Bisht, Joshi, & Dhewa, 2011). También se ha reportado bacterias anaerobias para la biorremediación de policlorobifenilos (PCBs) y declorinación en sedimentos de ríos (Kumar , Bisht, Joshi, & Dhewa, 2011). Hongos de producción de raíz blanca como *Phanaerochaete hrysosporium* tiene reporte de degradación de compuestos aromáticos policíclicos (Kumar , Bisht, Joshi, & Dhewa, 2011).

Dentro de las estrategias que producen los organismos para mineralizar compuestos xenobióticos o hidrocarburos, se encuentran los biosurfactantes y bioemulsificantes sustancias que son producidas por bacterias capaces de crecer en ambientes que contienen hidrocarburos. Estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes contaminados con hidrocarburos, como el estudio realizado por Grossman. et .al (1999) en Ártico Noruego, concluyen que existe abundancia de γ -*Protobacterias*, en especial las pertenecientes a los grupos *Pseudomonas sp* y *Cycloclasticus sp*.

El interés de la producción de biosurfactantes se basa en característica de baja toxicidad y biodegradabilidad por su origen biológico, lo cual hace con su uso la disminución de impactos ambientales (Khadydja , Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo , 2016) (Marchant & Banat, 2012).

Este trabajo realiza el aislamiento de los microorganismos presentes en tres muestras de hidrocarburos líquidos, obtenidas de los campos Tigana, Carmentea y Moriche, los cuales se encuentran ubicados en los departamentos de Casanare y Boyacá en la República de Colombia y evaluar su habilidad para la producción de biosurfactantes que podrán ser aprovechados en futuros estudios para su producción a escala industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General.

Determinar el potencial productor de biosurfactantes por microorganismos aislados de hidrocarburos y los equipos principales requeridos para su producción industrial a nivel de ingeniería conceptual.

2.2 Objetivos Específicos.

- Realizar el aislamiento de microorganismos potenciales productores de biosurfactantes presentes en las muestras de hidrocarburo.
- Realizar la evaluación del producto obtenido por los microorganismos aislados de las muestras de hidrocarburos.
- Determinar los equipos principales requeridos para la producción del biosurfactante a nivel de ingeniería conceptual.

3. JUSTIFICACIÓN

El direccionamiento industrial hacia la búsqueda de la sostenibilidad, ha estimulado el interés en los biosurfactantes como agentes sustitutos de los surfactantes sintéticos (Marchant & Banat, 2012). Los surfactantes sintéticos son moléculas orgánicas, obtenidos de fuentes petroquímicas o fuentes oleoquímicas (Álvarez C, 2004), utilizadas como detergentes, para cuidado personal o como productos de limpieza. Al igual han sido usados en las industrias de producción y extracción de hidrocarburos, textil, alimentos, farmacéuticos (Lewis, 1991). Tienen características de baja degradación y alta toxicidad. Su uso llevan intrínseco la generación de impactos tales como incremento de la toxicidad en vida acuática la cual ocurre a concentraciones mayores de 0,1mg/l de surfactantes aniónicos y no-aniónicos (Lewis, 1991), y genera toxicidad en los microorganismos que habitan en el suelo teniendo efecto adverso en el crecimiento de plantas (Ying, 2006) .

Los biosurfactantes por ser obtenidos de manera biológica, son productos que tienen alta biodegradabilidad y baja toxicidad (Vijayakumar & Saravana, 2015). Estudios concluyen que microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas sp* tienen la facultad de sintetizar biosurfactantes (Khadydja , Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo , 2016) (K.S.M Rahman, Pasirayi, Auger, & Ali, 2010) (Lang & Wullbrandt, 1999).

Los usos encontrados para los biosurfactantes se encuentran en recobro mejorado de petróleo (Martínez, 2014), en biorremediación como factores emulsificantes de substratos no solubles en agua para aumentar su biodisponibilidad (Ron & Rosenberg, 2002) (Banat, Makkar, & Cameotra, 2000), al igual que ser indispensables en la biorremediación de suelos con hidrocarburos líquidos, tratados con *Pseudomonas sp* y en procesos conocidos como lavado de suelos para la eliminación de compuestos de baja solubilidad (Pacwa Plociniczak, Plaza, Piotrowska Seget, & Cameotra , 2011).

3.1 Hipótesis

Existe presencia de microorganismos en hidrocarburos líquidos, con la habilidad de producir biosurfactantes, como estrategia para el aprovechamiento de sustancias complejas como fuente de carbono.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Surfactantes

Los surfactantes son moléculas orgánicas, obtenidos de fuentes petroquímicas o fuentes oleoquímicas (Álvarez C, 2004), utilizadas como detergentes, para cuidado personal o como productos de limpieza. Al igual han sido usados en las industrias de producción y extracción de hidrocarburos, textil, alimentos, farmacéuticos (Lewis, 1991). Generalmente consisten en moléculas que poseen una terminación polar (cargada o no cargada), la cual es soluble en agua y una terminación no polar insoluble en agua (Ying, 2006).

Los surfactantes se clasifican principalmente en tres clases: aniónicos, no-aniónicos y catiónicos (Ying, 2006). En la Tabla 1 se presenta la estructura de los principales surfactantes utilizados

Tabla 1: Clasificación de surfactantes

NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA	ANACRÓNIMO
SURFACTANTES ANIÓNICOS		
Jabones	$\text{R}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{ONa}$	
Sulfonatos de alquilbenceno	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$	LAS
Sulfonatos de alcanos	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{SO}_3\text{Na} \\ \diagup \\ \text{R}_2 \end{array}$	SAS
α -Sulfo ácido graso metil éster	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{SO}_3\text{Na} \quad \quad \quad \text{OCH}_3 \end{array}$	SES
Alquilsulfatos	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3\text{Na}$	FAS
Alquil éter sulfatos	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{SO}_3\text{Na} \end{array}$	FES
SURFACTANTES CATIÓNICOS		
Cloruro tetraalquil de amonio	$\left[\begin{array}{c} \text{R}^1 \quad \quad \text{R}^3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}^2 \quad \quad \text{R}^4 \end{array} \right] \text{Cl}^-$	QAC

NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA	ANACRÓNIMO
SURFACTANTES NO-ANIÓNICOS		
Alcohol graso poli etilenglicol éter	$\begin{array}{c} R' \\ \\ R-CH-CH_2-O-(CH_2-CH_2-O)_nH \end{array}$	AEO
Alquilfenol polietilenglicol éter	$R-C_6H_4-O-(CH_2-CH_2-O)_nH$	APEO
Amidas de ácidos grasos y alcohol	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-N \begin{cases} (CH_2-CH_2-O)_nH \\ (CH_2-CH_2-O)_mH \end{cases} \end{array}$	FAA
Alcohol graso poli-poliglicol éter	$RO-(CH_2-CH_2-O)_n-(CH_2-\overset{\overset{CH_3}{ }}{CH}-O)_mH$	FEP
Óxido de etileno / óxido de propileno bloques de polímeros	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ H(O-CH_2-CH_2)_m-O-CH-CH_2-O \\ \left(\begin{array}{c} CH_2 \\ \\ H_3C-CH \\ \\ O \\ \\ H(O-H_2C-CH_2)_n \end{array} \right) \end{array}$	EPE

Fuente: Elaborado a partir de *Surfactants in Consumer Products: Theory, Technology and Application* (Falbe, 2012).

En la Tabla 2 se presentan los principales usos en diferentes sectores industriales, al igual que se listan los principales surfactantes utilizados y su tipo según la Tabla 1.

Tabla 2: Usos de los surfactantes sintéticos

SECTOR	USOS	NOMBRE QUÍMICO	CLASE
ALIMENTOS	<ul style="list-style-type: none"> * Limpiadores * Emulsificantes Aceite/Agua: (Sustitutos de la leche, helado, mayonesa, salsas) * Emulsificantes Agua/Aceite: margarinas y sus derivados. * Generación o inhibición de formación de espuma. * Estabilización de emulsiones de grasa. 	Esteres de ácidos grasos basados en polipropilenglicol, sorbitol, poliglicerina o azúcar	No-aniónicos

SECTOR	USOS	NOMBRE QUÍMICO	CLASE
FARMACÉUTICO	<ul style="list-style-type: none"> * Emulsificación de cremas y ungüentos * Agente dispersante en tabletas 	Sulfatos de alcohol graso, alcohol graso poliglicol éter. Además de ésteres de ácidos grasos de glicerina o sorbitol	No-aniónicos
INSECTICIDAS HERBICIDAS	<ul style="list-style-type: none"> * Adecuada preparación de licores dispersos para aplicación de sustancias activas dentro de la planta. * En concentrados emulsificados, el surfactante es un ingrediente activo para solubilizar los productos insolubles. * Principalmente como agente humectante que solubiliza los compuestos insolubles en el momento de la preparación de insecticidas y herbicidas cuya presentación debe mezclarse en un medio líquido sea agua o aceite. 	Sulfonatos de alquilbenceno, lignosulfonatos, alquilfenol poliglicol éter, alcohol graso poliglicol éter	Aniónicos y No-aniónicos
AGRICULTURA	<ul style="list-style-type: none"> * Hidrofilizante de suelos pesados. * Prevención de solidificación de las mezclas de fertilizantes y obtención de aplicación uniforme de fertilizantes * Dilución de agentes insolubles. * Procesos de limpieza y humectación de frutas y vegetales 	Ácidos carboxílicos poliméricos, sulfonatos de alcanos, alcohol graso poliglicol éter, Sulfonatos de alquilbenceno, ésteres de ácidos grasos	Aniónicos y No-aniónicos
TEXTILES	<ul style="list-style-type: none"> * Limpieza de las fibras naturales que viene. * Procesos de blanqueamiento de algodón. * Preparación de las mezclas de tintura 	Sulfonatos de alcanos, sulfonatos de alquilbenceno, alquil poliglicol éter, alquilfenol poliglicol éter, ácidos grasos poli glicol éster, alcohol graso poliglicol éter.	Aniónicos y No-aniónicos

SECTOR	USOS	NOMBRE QUÍMICO	CLASE
QUÍMICOS	* Su uso primordial es en procesos donde se tiene componentes inmiscibles, se utiliza la propiedad humectante y dispersante para mejorar la miscibilidad y con ello aumentar las velocidades de reacción	Sulfonatos de alcanos, sulfonatos de alquilbenceno, alquil poliglicol éter, alquilfenol poliglicol éter, ácidos grasos poliglicol éster, alcohol graso poliglicol éter.	Aniónicos y No-aniónicos
PLÁSTICOS	* Preparación de la dispersión del plástico como en el proceso de espumas de poliuretano. * En los procesos de polimerización el surfactante se encuentra en concentraciones mayores a la concentración crítica micelar y con ello se mejora la solubilidad del monómero insoluble. Estabiliza el tamaño de gota del monómero, hace la polimerización posible y estabiliza el compuesto final polimerizado	Jabones de ácidos grasos, sulfonatos de alquilos, alquilfenol poliglicol éter, ésteres de ácidos grasos	Aniónicos y No-aniónicos
OIL & GAS	* En fluidos de perforación para control de las propiedades reológicas del fluido. * Agentes dispersantes en fluidos de perforación. * Aumentando la permeabilidad de la roca en recobro mejorado de petróleo * Emulsificantes o rompedores de emulsiones, en especial para la separación de crudo y agua.	Lignosulfonato, sulfonatos provenientes del petróleo, polímero óxido de etileno/óxido de propileno.	Aniónicos

Fuente: Elaborado a partir de Surfactants in Consumer Products: Theory, Technology and Application (Falbe, 2012).

4.1.1 Efectos de los surfactantes

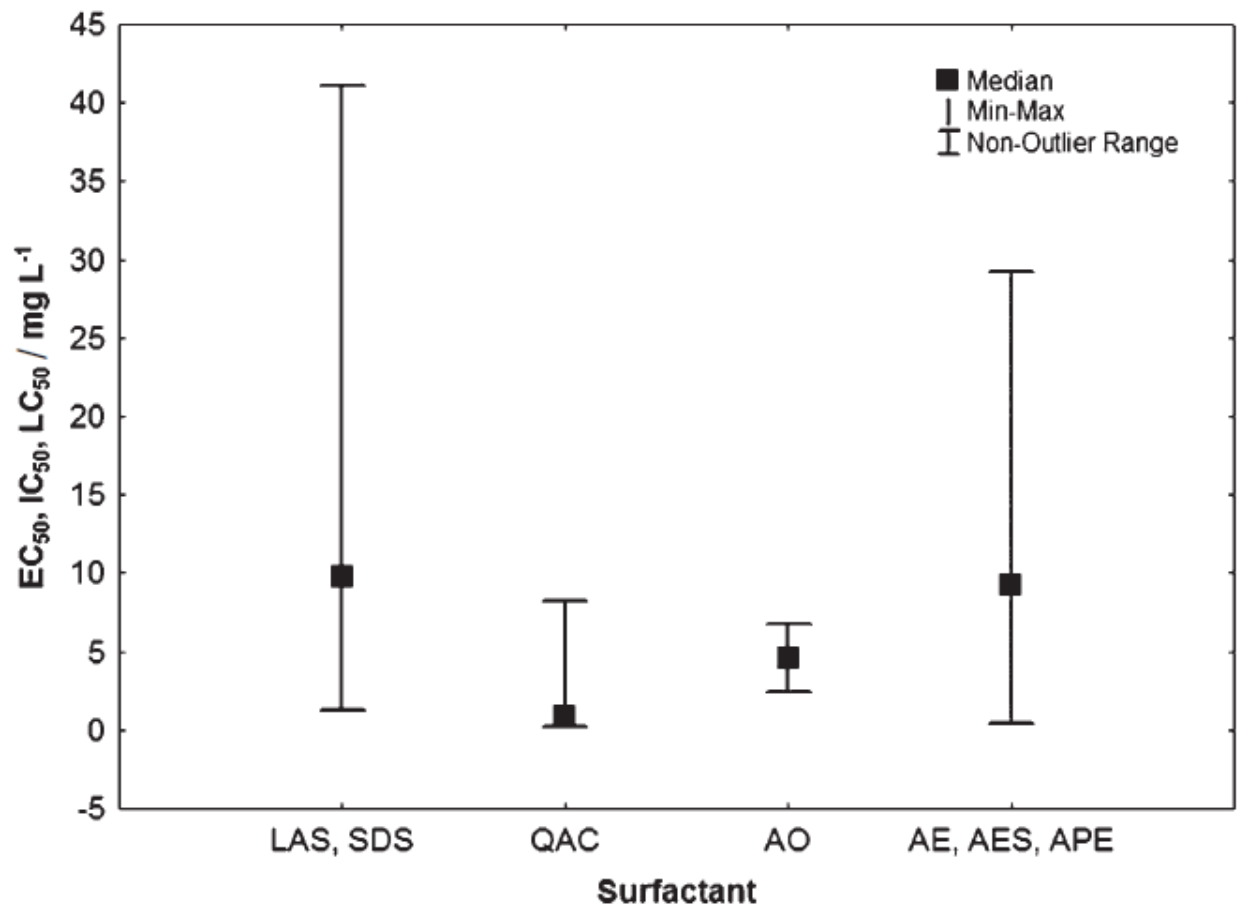
Los surfactantes entran en el ambiente a través de los efluentes de agua y se acumulan en las fuentes de agua superficiales. La toxicidad de los surfactantes sintéticos es una de las características negativas de su uso. Toxicidad crónica se presenta en vida acuática a concentraciones superiores de 0,1mg/l de surfactantes aniónicos y no-aniónicos (Lewis, 1991).

Efectos en los humanos y animales como modificación de cadenas de proteínas y mal funcionamiento de encimas y membranas fosfolipídicas causan síntomas de intoxicación, al igual que irritación de mucosas, ojos y piel (Cserháti, Forgács, & Oros, 2002), igualmente se han reportado daños en linfocitos humanos (Antoni & Szabo, 1982).

Altas concentraciones de surfactantes acumulados en aguas residuales dificulta su tratamiento en plantas donde son utilizados microorganismos para remover los contaminantes (Ivanokovic & Hrenovic, 2010). Por uso excesivo se pueden presentar daños en los ecosistemas, razón por la cual se encuentran reguladas las emisiones de surfactantes a los cuerpos de agua (Ivanokovic & Hrenovic, 2010). En general las concentraciones permitidas son inferiores a la concentración tóxica efectiva para organismos acuáticos (Ivanokovic & Hrenovic, 2010). En la Figura 1 se presentan los límites de efectos tóxicos (concentración media máxima efectiva EC_{50} , concentración media máxima de inhibición IC_{50} y concentración media máxima letal LC_{50}) elaborado por Ivanovic et. Al. (2010), basado en las especies analizadas en la revisión de Ying (2006).

Los surfactantes catiónicos son de mayor toxicidad que los surfactantes aniónicos o no-aniónicos (Roberts, y otros, 2013) y son los de mayor riesgo (Ivanokovic & Hrenovic, 2010). Se observa en la Figura 1 que los límites de los QAC's son inferiores que los demás tipos de surfactantes aniónicos o no-aniónicos.

Figura 1: Toxicidad Colectiva



Fuente: Tomado de *Surfactants in Environment*. (Ivanokovic & Hrenovic, 2010).

4.2 Biosurfactantes

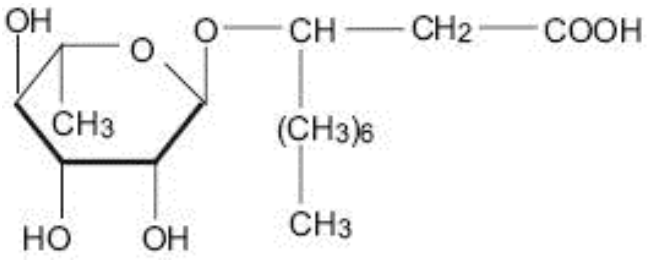
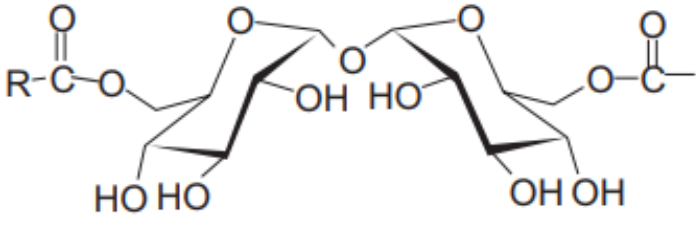
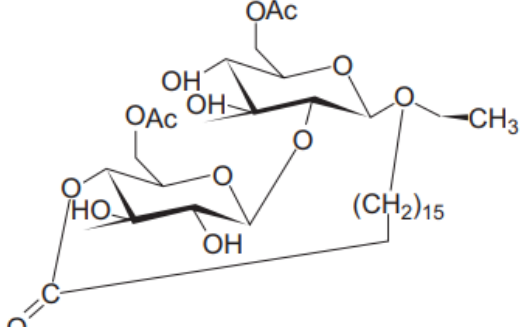
Los biosurfactantes son producidos por biosíntesis por diferentes tipos de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (Roy, 2018). Se clasifican en glicolípidos, lipoproteínas y o lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos o lípidos naturales, surfactantes poliméricos o surfactantes particulados, siendo los ramnolípidos perteneciente a los glicolípidos y producido por las *Pseudomonas sp* los que mayormente han sido estudiados y reportado usos industriales (Varjani & Upasani, 2017). Los biosurfactantes buscan desplazar los surfactantes sintéticos debido a sus propiedades de biodegradabilidad, baja toxicidad y resistencias a altas temperaturas y altos valores de pH (Vijayakumar & Saravana, 2015). Sin embargo, esto será posible siempre y

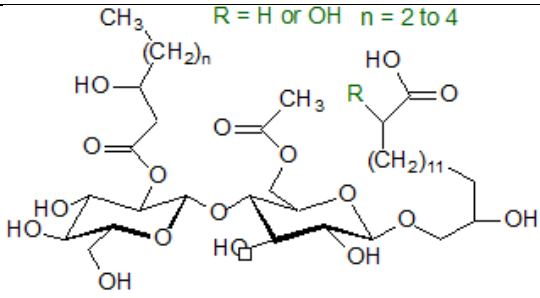
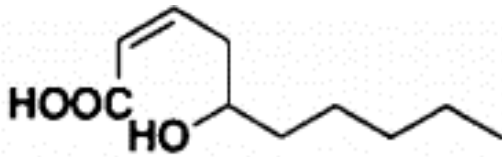
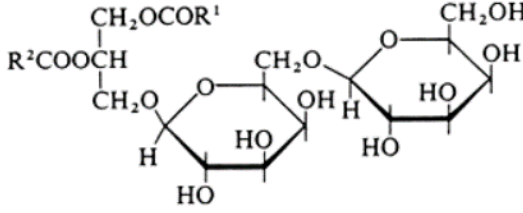
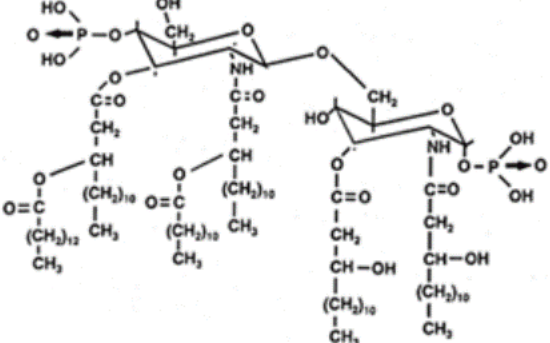
cuando la producción de biosurfactantes sea económicamente similar a la producción de los surfactantes sintéticos, para reducir costos de producción, se busca que la materia prima utilizable sean residuos aprovechables de diferentes industrias (Maneerat , 2005) o la mejora tecnológica de los procesos *downstream* (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Los biosurfactantes son clasificados dentro de los tenso-activos por ser moléculas anfipáticas que reduce la tensión en la inter-fase. Los tenso-activos en medio acuoso incrementan la solubilidad en agua de los compuestos orgánicos (Becerra & Horna , 2016).

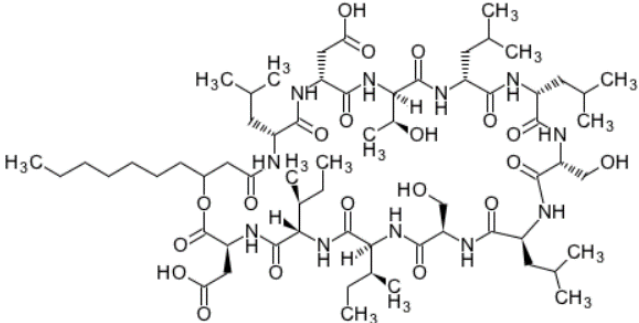
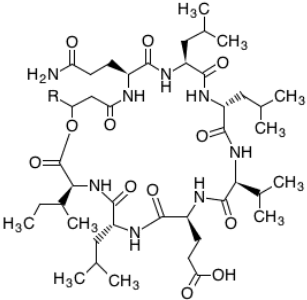
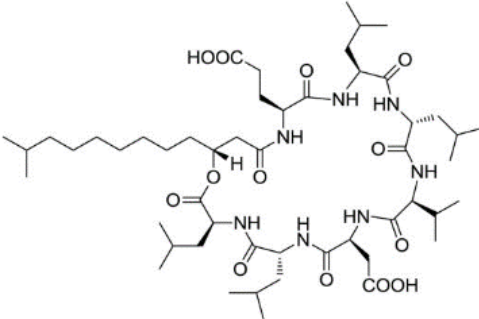
4.2.1 Clasificación de los biosurfactantes

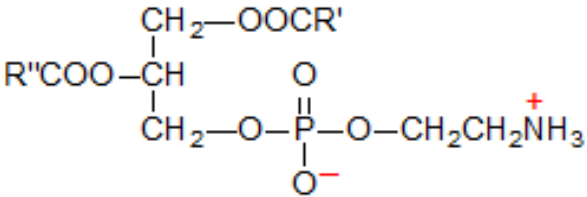
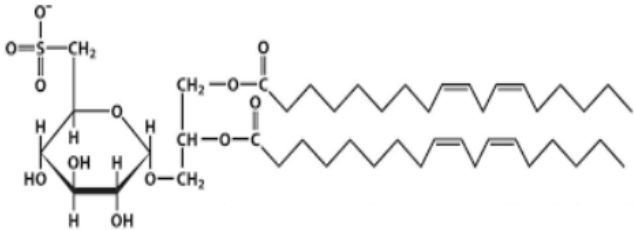
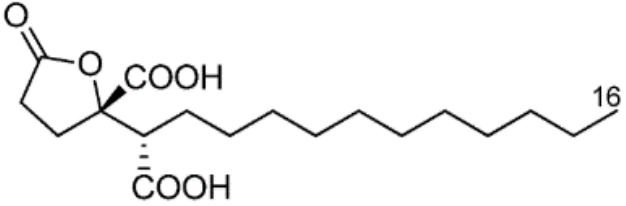
En la Tabla 3 se presenta la clasificación, tipo de microorganismo productor, estructura principal y usos reportados. No todos los biosurfactantes reportados en la literatura han sido estudiados para usos biotecnológicos, algunos de ellos como los lipopolisacáridos son componentes fundamentales de la membrana celular (Jacques & Jacques, 1996).

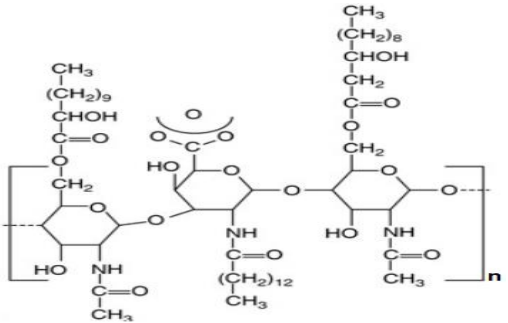
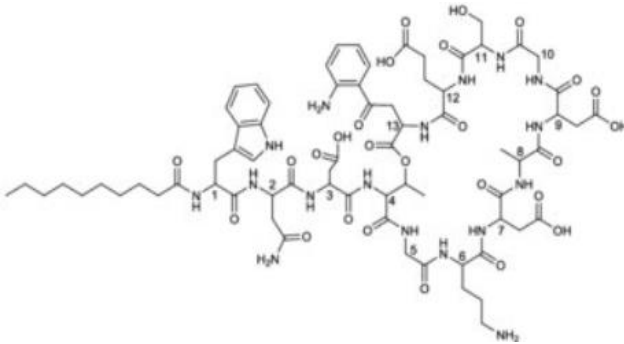
Tabla 3: Clasificación y uso de los biosurfactantes

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ESTRUCTURA	APLICACIONES
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>		<ul style="list-style-type: none"> * Mejora en la degradación y dispersión de diferentes clases de hidrocarburos. * Emulsificación de hidrocarburos y aceites vegetales. * Remoción de metales del suelo
Trehalolípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia sp.</i>		<ul style="list-style-type: none"> * Mejora de la biodisponibilidad de hidrocarburos
Soforolípidos	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>		<ul style="list-style-type: none"> * Recuperación de hidrocarburos de lodos. * Remoción de metales pesados de sedimentos. * Recobro mejorado de petróleo.

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ESTRUCTURA	APLICACIONES
Celobiolípidos	<i>Ustilago maydis</i>	 <p>R = H or OH n = 2 to 4</p>	* Efecto fungicida contra levaduras y hongos micelares
Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>		
Diglicosil diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>		
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>		

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ESTRUCTURA	APLICACIONES
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.		<ul style="list-style-type: none"> * Mejora en recobro mejorado de petróleo * Mejora la biodegradación de hidrocarburos y pesticidas clorinados * Remoción de metales pesados de suelos, agua y sedimentos.
Lichenysin A, Lichenysin B	<i>Bacillus licheniformis</i>		
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>		

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ESTRUCTURA	APLICACIONES
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.		* Incrementa la tolerancia de bacterias a metales pesados
Sulfonilípidos	<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>		
Ácidos grasos (ácido corinomicólico, espiculispórico, etc.)	<i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaramyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>		* Mejora de recobro de bitumen. * Remoción de iones metálicos de soluciones acuosas. * Dispersión de pigmentos hidrofílicos. * Secuestrante metales pesados

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ESTRUCTURA	APLICACIONES
Emulsan, Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>		* Estabilización de hidrocarburos en emulsiones con agua
Streptofactin	<i>Streptomyces tendae</i>		
Surfactantes particulados	<i>Acinetobacter sp. HO1-N. Pseudomonas sp marginalis</i>		
Biosur PM	<i>Pseudomonas sp maltophilla</i>		

Fuente: Elaborado a partir de los trabajos de (Mulligan, 2005) (Raiger & López , 2009) (Pacwa Plociniczak, Plaza, Piotrowska Seget, & Cameotra , 2011) (Jacques & Jacques, 1996)

Los usos principales de los biosurfactantes son en la industria de hidrocarburos en recobro mejorado de petróleo y procesos de biorremediación de hidrocarburos (Banat, Makkar, & Cameotra, 2000).

4.2.2 Propiedades de los biosurfactantes

Las propiedades de los biosurfactantes son tomadas de Vijayakumar (2015):

- *Actividad en la superficie e inter-facial:* Eficiencia y efectividad son características esenciales de un buen surfactante. Eficiencia es medida con la Concentración Crítica Micelar (CMC), mientras que efectividad es relacionada con la tensión superficial e inter-facial. La CMC de biosurfactantes está en el rango entre 1 y 2000mg/l, mientras que la tensión superficial e inter-facial (aceite/agua) es aproximadamente entre 1 a 30mN/m. Los surfactantes de buena calidad son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m y la inter-facial de n-hexadecano de 40 a 1 mN/m.
- *Tolerancia a temperatura, pH y esfuerzos iónicos:* Muchos biosurfactantes pueden ser usados a alta temperatura y pH con rango de 2 a 12. Al igual que toleran altas concentraciones de sal por arriba del 10%, sin embargo, 2% de NaCl es suficiente para inactivar los surfactantes sintéticos
- *Biodegradabilidad:* Los biosurfactantes son de fácil degradación por microorganismos presentes en el agua y suelo, haciendo que estos compuestos sean adecuados para biorremediación y tratamientos de residuos.
- *Baja Toxicidad:* La baja toxicidad hace que los biosurfactantes puedan ser usados en alimentos, cosméticos e industria farmacéutica. También lo hace compatible para aplicaciones ambientales. Los biosurfactantes además pueden producirse con gran cantidad de residuos industriales.
- *Especificidad:* Los biosurfactantes son moléculas complejas con grupos funcionales específicos por lo cual tienen acciones particulares.
- *Biocompatibilidad y digestibilidad:* Esta propiedad hace que sean compatibles en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética.

- *Formador y Rompedor de Emulsiones:* Pueden ser agentes emulsificantes o agentes rompedores de emulsiones.

Para efectos de evaluación de las propiedades como tensión superficial y dispersión, el producto debe conservarse durante 120 días. Métodos de calentamiento en combinación con sorbato de potasio son utilizados como agentes de conservación (Khadydja , Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo , 2016).

Al comparar las propiedades de los biosurfactantes contra los surfactantes sintéticos se ve la disponibilidad de estos para ser usados en varias aplicaciones comerciales (Vijayakumar & Saravana, 2015), en la Tabla 3 se presentan las principales aplicaciones en las cuales se ha establecido estudios como en recobro mejorado de petróleo, remoción de metales pesados de suelos contaminados, estabilizador de emulsiones aceite en agua, sin embargo, su producción a nivel industrial para su comercialización aún se encuentra a desarrollo, siendo los surfactantes sintéticos más utilizados por sus menores costos de producción (Marchant & Banat, 2012).

4.2.3 Caracterización de biosurfactantes.

El método de caracterización de biosurfactantes más utilizado es la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier FTIR. (Thavasi, Jayalakshmi, & Banat, 2011).

4.2.4 Biosíntesis de biosurfactantes

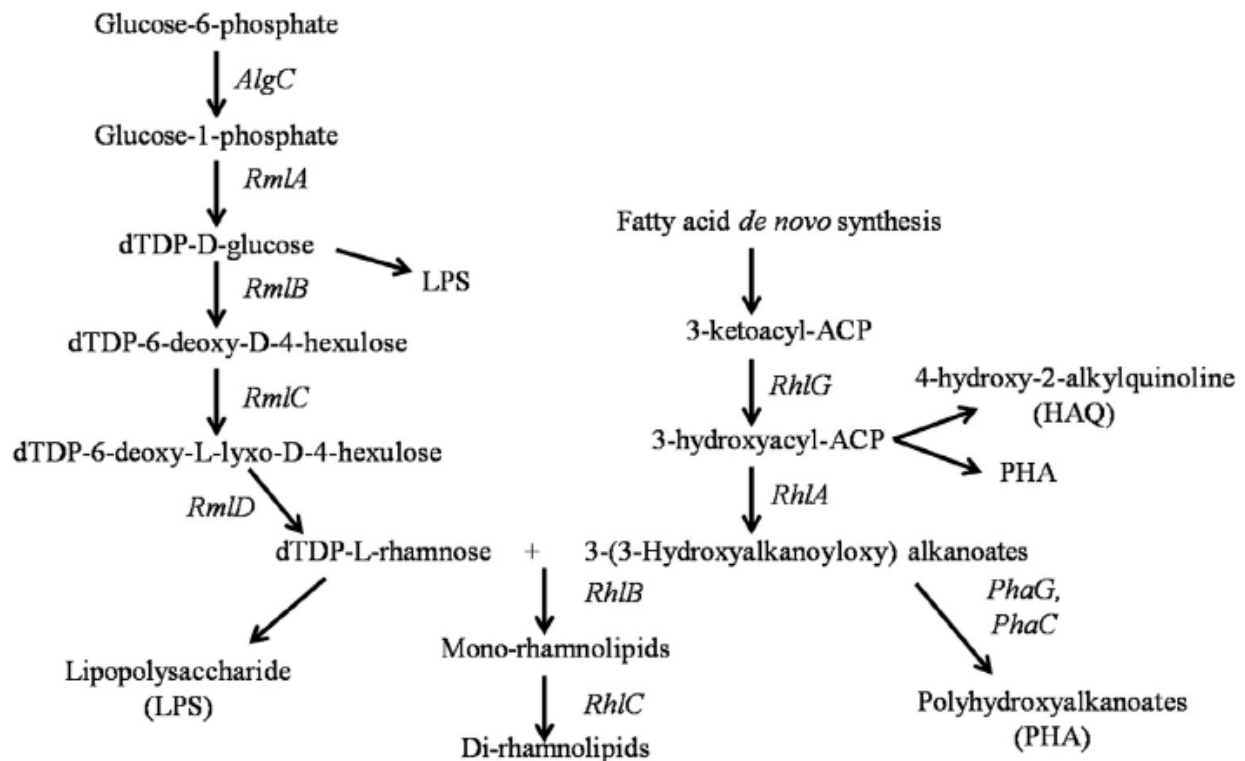
La biosíntesis de los ramnolípidos en la especie *Pseudomonas aeruginosa* se realiza a través de tres etapas descritas por Toribio-Jiménez et. al (2014) las cuales son:

- Etapa 1: La enzima *RhIA* (codificada por el *rhIA*) es involucrada en la síntesis del dímero de ácido graso (HAAs) del ramnolípidos.
- Etapa 2: La ramnosiltransferasa *RhIB* se encuentra unida a la membrana (codificada por el gen *rhIB*) usa el dTDP-L-ramnosa y la molécula de HAAs como precursores para formar el mono-ramnolípidos.

- Etapa 3: Los mono-ramnolípidos son sustratos que junto con la dTDP-L-ramnosa de la ramnosiltransferasa *RhIC* (codificada por el gen *rhIC*) producen los di-ramnolípidos.

En la Figura 2 se presenta la ruta metabólica para la producción de biosurfactantes por medio de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2: Rutas metabólicas de la *Pseudomonas aeruginosa* para producir ramnolípidos



Fuente: Tomado de *Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant*. (Varjani & Upasani, 2017).

4.3 Bioprospección de microorganismos.

El aislamiento de los microorganismos se realiza en medio de cultivo para promover su crecimiento en ambientes controlados. Estos son soluciones de nutrientes utilizadas para cultivar los microorganismos en laboratorio (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Los medios de cultivo contienen los elementos necesarios para el crecimiento microbiano. Los requerimientos nutricionales principales de los microorganismos se dividen en dos grandes grupos, los macronutrientes y los micronutrientes. Los macronutrientes son los componentes que los microorganismos captan en mayor proporción y son principalmente: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio, y hierro (Presscott, Harley, & Klein, 2004). Los micronutrientes o elementos traza son elementos que las células requieren adicionales a los macronutrientes pero en proporción menor. Los principales micronutrientes son: magnesio, cinc, cobalto, molibdeno, níquel y cobre (Presscott, Harley, & Klein, 2004). Las cantidades de micronutrientes requeridas por las células son tan pequeñas que en la mayoría de los casos estos se encuentran en forma de contaminantes del agua (Presscott, Harley, & Klein, 2004).

Los medios de cultivo definidos son aquellos cuya composición de macronutriente y micronutrientes es conocida, se elaboran a partir de agua destilada y cantidades precisas de los compuestos orgánicos e inorgánicos purificados (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Los medios de cultivo complejos son aquellos que utilizan hidrolizados de productos animales como suero de leche, carne, extractos de levadura (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Los medios de cultivo selectivos son aquellos que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos pero que a su vez inducen el crecimiento de otros (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Los medios de cultivo selectivos son utilizados para el aislamiento de microorganismos específicos. El agar King B es un medio de cultivo selectivo, el cual es propicio para el crecimiento del género microbiano *Pseudomonas fluorescentes* (Johnsen & Nielsen, 1999). Los medios de cultivo pueden ser de estado líquidos como caldos de cultivo, o pueden ser medios de cultivo en estado sólido como agar, los cuales poseen igual composición que los caldos de cultivo con la diferencia de la adición de un solidificante.

4.4 Curva de crecimiento

Durante la reproducción celular se presenta las siguientes fases (Wulf Crueger & Annaliese Crueger, 1993).

- Fase de Latencia: Esta fase es el tiempo requerido por el microorganismo para adaptarse al ambiente del sustrato.
- Fase Logarítmica: El microorganismo adaptado a las nuevas condiciones del medio de cultivo, inicia su crecimiento. El crecimiento celular puede ser descrito matemáticamente teniendo en cuenta cualquier variable de biomasa en función del tiempo. La ecuación 1 describe la fase logarítmica (Ramón Parés & Antonio Juárez, 2002)

$$[1] \quad \frac{dN}{dt} = \mu * N$$

Donde:

N: Actividad de la biomasa

μ : Velocidad de crecimiento específico

t: Tiempo

La velocidad de crecimiento específico es función de la concentración del sustrato límite [S], velocidad máxima de crecimiento y la constante específica de sustrato. Esta velocidad de crecimiento específico fue expresada matemáticamente por Monod la cual es la ecuación 2.

$$[2] \quad \mu = \mu_{max} * \frac{S}{K_s + S}$$

Donde:

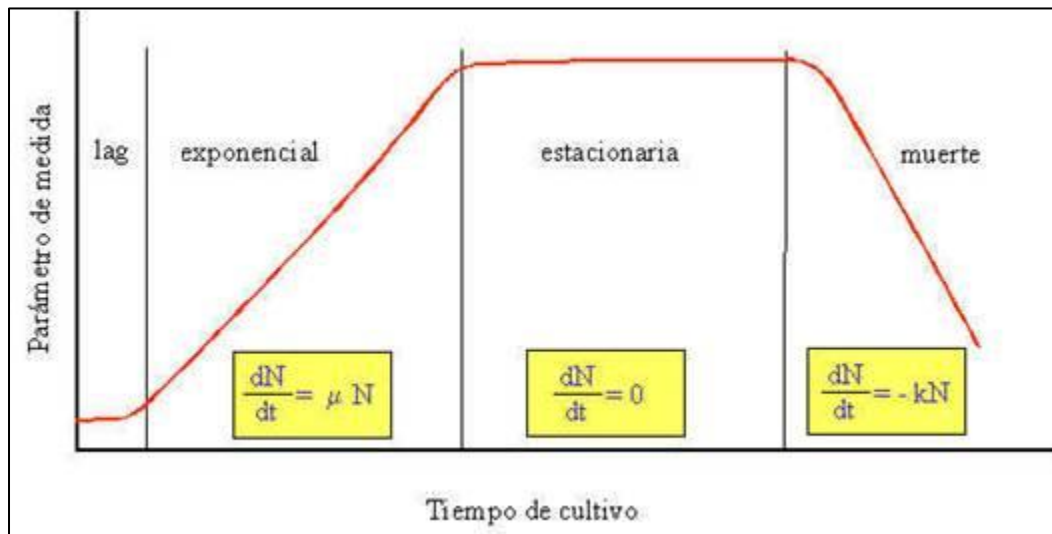
K_s es la concentración de sustrato a la que se obtiene la mitad del crecimiento máximo.

Al final de la fase logarítmica el sustrato se agota rápidamente ya que la [S] se aproxima al valor de K_s . En este punto continúa la fase estacionaria.

- Fase Estacionaria: Fase en la cual el crecimiento del microorganismo se detiene porque se han formado sustancias tóxicas y el sustrato ha sido metabolizado por completo.
- Fase de Muerte: Las reservas energéticas se agotan y el microorganismo comienza a morir a velocidad exponencial.

En la Figura 3 representa las fases de crecimiento de los microorganismos.

Figura 3: Curva de crecimiento de microorganismos



Fuente: <http://procesamientodeproductos.blogspot.com.co/2012/10/curvas-de-crecimiento-microbiano.html>.

4.5 Producción de biosurfactantes

La producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp* ha sido estudiada extensamente (Varjani & Upasani, 2017). El mayor productor reportado de ramnolípidos en su forma de mono-ramnolípidos o di-ramnolípidos es la *Pseudomonas aeruginosa* (Marchant & Banat, 2012), otras especies de *Pseudomonas sp* que han reportado producción de biosurfactantes son las *Ps. chlororaphis*, *Ps. plantarii*, *Ps. putida* y *Ps. fluorescens* (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Se ha reportado producción de ramnolípidos con *Pseudomonas aeruginosa* en biorreactor por lotes, controlado la temperatura entre 28-37°C, y el pH: 6-7,5, en medio mínimo de sales con diferentes fuentes de carbono como: 30g/l glicerol, produciendo 2,0-2,5g/l de ramnolípidos; 20g/l aceite de oliva produciendo 7,6-10g/l de ramnolípidos; y 125g/l aceite de soya, produciendo 78g/l de ramnolípidos (Lang & Wullbrandt, 1999).

Las condiciones de producción principales son: fuente de carbono, fuente de nitrógeno y condiciones de crecimiento (Khadydja, Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo, 2016). La fuente de carbono se puede clasificar en carbohidratos, hidrocarburos y aceites

vegetales, la cual influencia la eficiencia de producción de ramnolípidos, siendo las fuentes de carbono insolubles en agua las de menor eficiencia de producción mientras que la mayor producción se presenta en medio mineral de sales suplementado con glucosa y almidón (Varjani & Upasani, 2017). Relaciones de carbono / nitrógeno (C/N) entre 15 y 76, bajas relaciones C/N favorecen el crecimiento microbiano pero desfavorecen la producción de biosurfactante, siendo la relación C/N de 38 la relación óptima para la producción de biosurfactante (Venkata Ramana & Karanth, 1989). La producción también se ve afectada por las condiciones de crecimiento de los microorganismos tales como pH y temperatura, los valores de pH se encuentran entre 5-7 y la temperatura entre 27-36°C (Khadydja , Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo , 2016).

Los métodos de extracción y purificación para ramnolípidos se encuentran reportados precipitación, extracción por solventes y filtración, centrifugación (Varjani & Upasani, 2017). Siendo el método más sencillo para el recobro de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas sp* la precipitación ácida. El método consiste en reducir el pH hasta 2 para generar in producto insoluble y utilizar centrifugación para precipitar el producto (Varjani & Upasani, 2017) (Mukherjee, Das, & Sen, 2006) (Martínez, 2014) (Khadydja , Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo , 2016).

4.5.1 Producción industrial

En el mundo se encuentran alrededor de 17 compañías que producen biosurfactantes para su comercialización, de las cuales 5 compañías producen y comercializan ramnolípidos. Se reportan 4 compañías ubicadas en Estados Unidos (AGAE Technologies LLC, Jeneil Biosurfactant Co. LLC, Paradigm Biomedical Inc. y Rhamnolips Companies Inc.) y 1 compañía en el Reino Unido (TeeGene Biotech) las demás compañías reportadas son productoras de glicolípidos del tipo soforolípidos (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014).

Aunque la demanda de productos amigables con el medio ambiente ha ido en aumento aun los biosurfactantes no son líderes en el mercado (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014) debido al mayor costo de producción en comparación con los surfactantes sintéticos (Maneerat , 2005). Los costos de producción de los

biosurfactantes se distribuyen en: materias primas constituyen del 10-30% (Paraszkiewicz, Bernat, Kusmierska, Chojniak, & Plaza, 2018) y los procesos aguas abajo para la separación y purificación del producto constituyen entre el 70-80% (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014).

La evaluación de reducción de costos se ha encaminado hacia la reducción de costos de materias primas y reducción de costos de procesos aguas abajo (*downstream*). Para la reducción de costos de materias primas se han estudiado sustratos de bajo costos provenientes de residuos industriales tales como efluentes de molinos de aceite de oliva, grasa animal residuo de frigoríficos, aceite de frituras residuo de establecimientos de venta de alimentos, melaza residuo de la producción de azúcar, suero residuo de la producción de queso, residuos ricos en almidón como residuos de productos de papa (Maneerat , 2005) y glicerol residuo de la producción de biodiesel (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Para la reducción de los costos de los procesos *downstream* se han realizado estudios para optimizar el tiempo de reacción, reducción de costos de producción en sistemas continuos estáticos, combinación de sustratos, combinación genética de microorganismos productores (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Las investigaciones sobre producción de biosurfactantes continúan con el objetivo de obtener un costo de producción de \$2,22USD/l (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014), para que este producto sea competitivo en el mercado.

4.6 Diseño conceptual

Las plantas de producción se dividen en procesos específicos. Baasel (1989) presenta una lista de procesos específicos general para las plantas de producción, los cuales se listan a continuación:

- *Almacenamiento de materias primas:* Las materias primas son almacenadas antes de ser usadas
- *Preparación de materias primas:* Alistamiento de las materias primas a las condiciones requeridas por el proceso.
- *Reacciones:* Las materias primas son empleadas para generar las reacciones de transformación de estas en productos deseados.

- *Purificación del producto:* El producto deseado es separado de las sustancias no deseadas.
- *Empacado y almacenamiento del producto:* El producto es empacado y almacenado para su distribución.
- *Reciclo, recobro y almacenamiento:* Las sustancias indeseables son separadas de las corrientes reutilizables, las cuales son almacenadas para ser recirculadas en el proceso

El ciclo de vida en un proceso químico es una secuencia de actividades que abarcan desde el desarrollo del diseño de planta hasta su construcción y puesta en marcha (Biegler, Grossmann, & Westerberg, 1999).

Varios autores determinan las etapas en las cuales se desarrolla el diseño y su alcance. Según Peter and Timmerhaus el diseño se desarrolla en tres etapas (1991): *Diseño preliminar o diseño de estimación rápida*, en el cual se proponen los procesos a seguir, estimación costo global y algunos cálculos de ingeniería; *Diseño de estimaciones detalladas*, en el cual el estudio financiero del proyecto en cuanto a costos y ganancias estimadas es desarrollado detalladamente, sin embargo, datos detallados de equipos no son establecidos en esta etapa; y *Diseño detallado o Diseño en firme de proceso*, el cual presenta todas las especificaciones de los componentes de la planta y la evaluación financiera de costos y ganancias es obtenida de manera precisa basado en cotizaciones, este diseño igualmente incluye los planos y la información requerida para realizar el proceso de construcción de la planta. Según Biegler et al. las fases del diseño de plantas son (1999): Diseño preliminar (o conceptual), en el cual se busca evaluar el potencial económico del proyecto; y diseño básico y detallado para finalmente realizar las etapas de construcción y puesta en marcha. Mannan describe cuatro etapas de diseño (2005): *Desarrollo e investigación*, en donde son evaluados resultados de laboratorio como planta piloto; *Diseño de procesos*, en el cual se seleccionan el flujo de proceso y se desarrollan simulaciones detalladas del proceso; *Ingeniería Conceptual*, etapa donde se desarrollan los diseños requeridos de equipos para el proceso; e *Ingeniería de Diseño*, en el cual se realizan las especificaciones y selección de equipos para el proceso.

El diseño conceptual de procesos incluye una serie de pasos y decisiones (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009) (Douglas, 1988), los cuales se listan en la Tabla 4 y cuyas salidas fueron adaptadas por Upadhye et. al. (2011).

Tabla 4: Etapas del diseño conceptual de procesos

NIVEL	DESCRIPCIÓN	ENTREGABLE
0 Información de entrada	Adquisición de información requerida para el desarrollo del diseño tal como: * Reacciones. * Disponibilidad de materias primas. * Especificación del producto deseado. * Restricciones del proceso. * Capacidad potencial. * Propiedades físicas de todos los compuestos. * Seguridad, toxicidad y condiciones ambientales. * Costos de materiales, equipos y utilitarios.	* Localización del proyecto * Fuentes de las materias primas y su pureza. * Escala del proceso. * Especificación de la composición del producto.
1 Tipo de operación	Definir según consideraciones tales como tipo de proceso, capacidad de producción, eficiencia de proceso, entre otras el tipo de operación de la planta.	* Lotes o continuo.
2 Estructura de entradas y salidas	Establecer y definir las corrientes de entrada del proceso (materias primas, energía) y las salidas del proceso (producto deseado, corrientes de desecho, energía generada)	* Balances de masa y energía.
3 Estructura de recirculaciones del proceso	Definir las posibles recirculaciones del proceso para recuperación de materiales o energía	* Materiales recuperables de las corrientes de desecho.

NIVEL		DESCRIPCIÓN	ENTREGABLE
4	Estructura de separación	*Definir procesos de recobro de vapor para ahorro energético y procesos de recobro de líquidos o sólidos que puedan ser reutilizados en el sistema	* Equipos y utilitarios pertenecientes al sistema de recobro de vapor, líquidos o sólidos del proceso.
5	Red de intercambio de calor o sistema de recobro de energía del proceso	Establecer las condiciones mínimas energéticas del proceso y condiciones de reutilización de desechos para la generación de energía	* Requerimientos de calor. * Requerimientos de enfriamiento. * Equipos para transferencia de calor.

Fuente: Elaborado a partir de los trabajos de (Upadhye, Qi, & Huber, 2011) (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009) (Douglas, 1988).

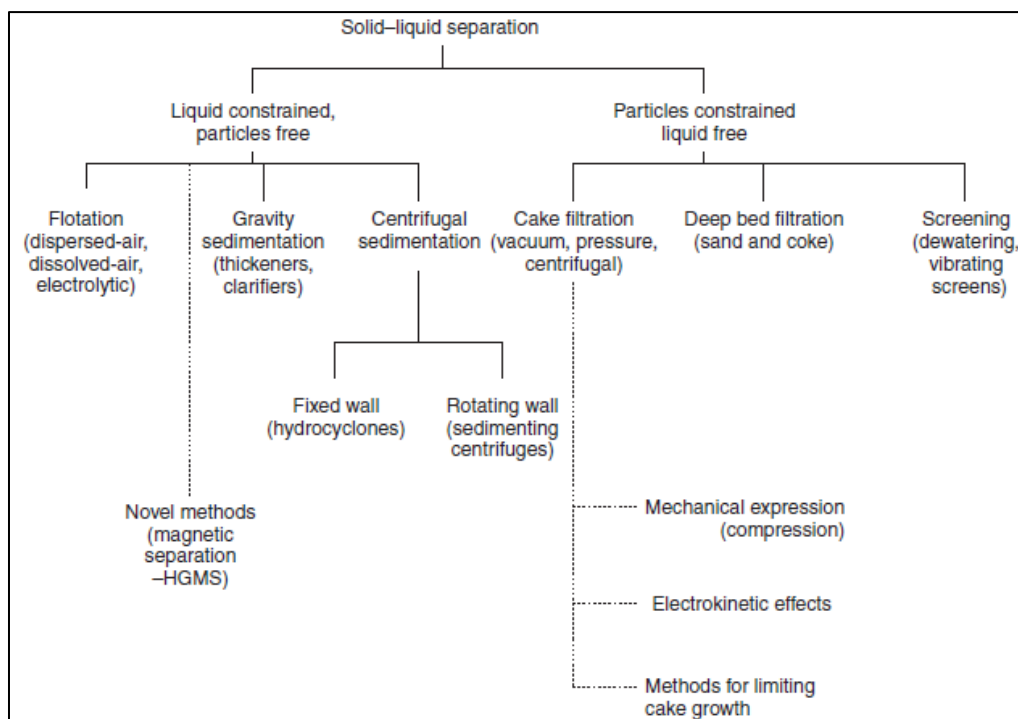
A continuación, se presentan consideraciones y recomendaciones tomadas de Turton et. al. (2009) y Douglas (1988), para la evaluación de los niveles de la ingeniería conceptual y encaminadas a tomar la mejor decisión en el nivel cada nivel.

- Nivel 1 Tipo de operación: La decisión por lotes o continuo depende de dos factores principales flexibilidad y capacidad (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009). Sin embargo, existen otros factores a tener en cuenta los cuales son: calidad de producto, estandarización de equipos, eficiencia del proceso, operación y mantenimiento, disponibilidad de materias primas y demanda del producto (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009). Por capacidad, plantas de producción mayor a 4.535.920kg/año se consideran en procesos continuos mientras que plantas de producción menor a 453.592kg/año se consideran en procesos por lotes (Douglas, 1988).
- Nivel 2 Estructura de entradas y salidas: Se considera la implementación de diagramas como diagramas conceptuales, diagramas de bloques o diagramas de flujo de proceso PFD, se determina cual se utiliza dependiendo de la información obtenida, con el objetivo de determinar el balance de masa y energía (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009).
- Nivel 3 Estructura de recirculaciones del proceso: Evaluar los materiales que pueden ser recirculados, estos pueden ser determinados por costo de la materia prima

(Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009), o materiales como reactivos en exceso, productos de equilibrio que puede ser reversible (Douglas, 1988).

- Nivel 4 Estructura de separación: La recirculación se utiliza para recuperar materias primas, recircular como corrientes de purga o recirculación para sub-procesos o procesos utilitarios de la planta (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009). Se debe seleccionar el método de separación según la fase de la corriente que desea separarse, las fases pueden ser líquido – líquido, vapor – líquido y sólido – líquido (Douglas, 1988). Según la fase de la corriente se selecciona la tecnología de separación. Para fases líquido – líquido se utilizan tecnologías por diferencia de punto de ebullición como torres de destilación; para vapor – líquido se utilizan separadores flash (Douglas, 1988) y para sólido – líquido se utilizan tecnologías basadas en aumento de la gravedad de los sólidos tales como centrifugación (Svarovsky, 2000). En la Figura 4 se presenta la clasificación de los procesos de separación sólido líquido

Figura 4: Clasificación de los procesos de separación sólido-líquido.



Fuente: Tomado de *Solid – Liquid Separation* (Svarovsky, 2000).

- Nivel 5 Red de intercambio de calor o sistema de recobro de energía del proceso: Se determinan los requerimientos de calor del sistema dependiendo los consumidores para obtener el mínimo requerido de calor (Douglas, 1988).

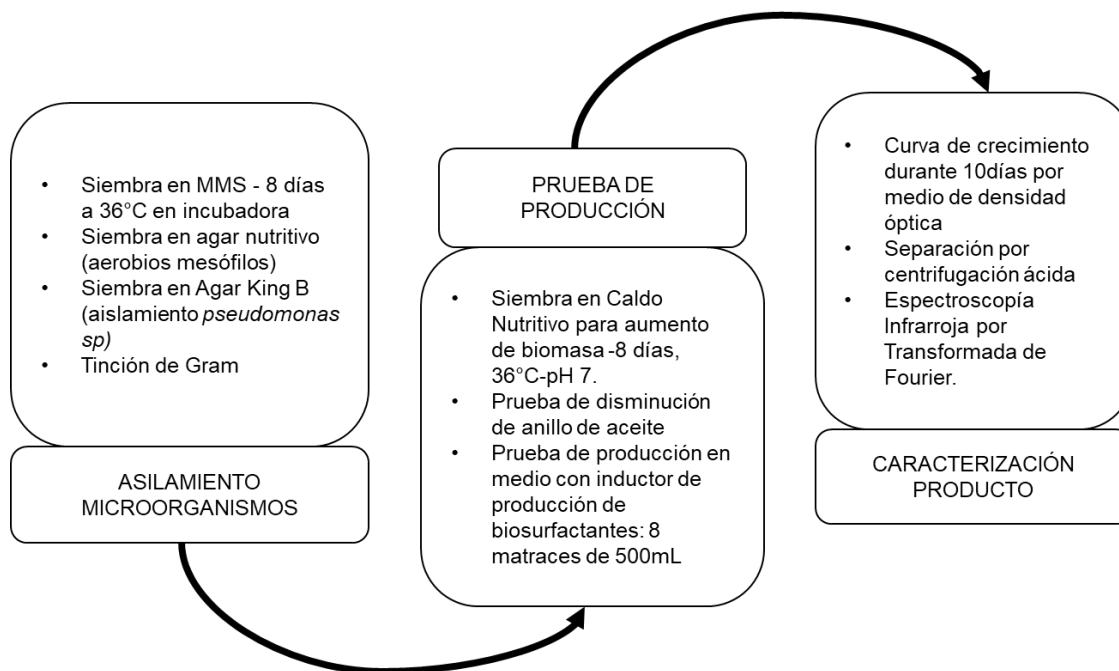
5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología

En la Figura 5 se presenta la metodología asociada a la fase de laboratorio del proyecto. Esta fase se dividía en tres grandes tareas, las cuales fueron:

- Aislamiento de microorganismos, para determinar el tipo de microorganismo presente en las muestras de crudo encaminado hacia la búsqueda de *Pseudomonas sp.* por medio de cultivo en agar King B selectivo para esta especie de bacterias.
- Pruebas de producción: Selección de bacterias productoras de biosurfactantes evaluando su potencial productor en una primera etapa por medio de la prueba de disminución de anillo de aceite y una segunda etapa de producción en medio de sales con inductores de producción de biosurfactantes.
- Caracterización del producto: El producto obtenido en las pruebas de producción se caracteriza por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.

Figura 5: Metodología implementada para el desarrollo del proyecto.



Fuente: Elaboración propia

5.2 Muestras de crudo

Las muestras de hidrocarburos líquidos suministradas hacían parte del volumen muestreado para realizar la caracterización fisicoquímica del crudo durante un día de operación del mes de agosto de 2017, previo al despacho del crudo en carro tanque.

Las muestras fueron suministradas por el personal del área de fiscalización y medición del departamento de producción en los campos mencionados¹. Se tomaron muestras de tres campos de producción petrolera del territorio colombiano, los cuales son los campos Tigana, Carmentea y Moriche.

El campo Carmentea se encuentra en el municipio de Monterrey y el campo Tigana se encuentra en el municipio de Tauramena en el departamento del Casanare en los llanos orientales. Dentro de la característica principal se encuentra la gravedad API @ 60°F tomada por norma ASTM D-1298, la cual para crudo Carmentea es de 29,7 y para el crudo Tigana es de 14,6 respectivamente, clasificándolos como crudos medios y pesados según clasificación por grados API.

El campo Moriche se encuentra en el municipio de Puerto Boyacá en el departamento de Boyacá. La muestra fue suministrada por el departamento de producción, cuando se realizaban pruebas de producción a pozos del campo². La gravedad API @ 60°F tomada por norma ASTM D-1298 es de 11,8 lo cual clasifica el crudo moriche dentro del rango de crudo Pesado según clasificación por grados API.

5.3 Medios de cultivo

5.3.1 Medios de cultivo para aislamiento de microorganismos

Se realizó la siembra en medio mínimo de sales para el cultivo de *Pseudomonas sp* descrito por Chivita y Dussán (Chitiva Urbina & Dussán, 2003). Su composición se presenta en la Tabla 5.

¹ Por acuerdo de confidencialidad no fue permitido nombrar la empresa operadora de los campos.

² Por acuerdo de confidencialidad no fue permitido nombrar la empresa operadora de los campos.

Tabla 5: Composición Medio Mínimo de Sales

MEDIO MÍNIMO DE SALES		
NOMBRE	FÓRMULA	[g/l]
Fosfato di ácido de Potasio	KH ₂ PO ₄	0,5
Cloruro de Amonio	NH ₄ CL	1,0
Sulfato de Sodio	Na ₂ SO ₄	2,0
Nitrato de Potasio	KNO ₃	2,0
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0,001
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	1,0
Sulfato de Hierro	FeSO ₄	0,0004

Fuente: Tomado de *Evaluación de matrices para la inmovilización de Pseudomonas sp. en biorremediación de fenol* (Chitiva Urbina & Dussán, 2003)

Todos los reactivos y equipos utilizados fueron los existentes y de propiedad del laboratorio de biología de la Universidad EAN. Se realizó cambio del sulfato de sodio de la composición original presentada en la Tabla 5, por nitrito de sodio. El cambio se realizó por disponibilidad, el producto sustituto proporciona los requerimientos de sodio para el medio mínimo de sales (MMS). La concentración se trabajó igual a la establecida en la Tabla 5 (Chitiva Urbina & Dussán, 2003). Posteriormente se ajustó pH a 7.0.

Se prepararon 3 matraces al 90% MMS y 10% de crudo (Tigana, Carmentea y Moriche) como fuente de carbono Los matraces se incubaron a 36°C.

El crudo fue separado de los matraces y el MMS con los microorganismos fue sembrado en agar nutritivo (AN) y agar king b (AKB). Adicionalmente se realizó siembra con crudo directamente en AKB para evaluar la presencia de *Pseudomonas sp.* En la Tabla 7 se presenta la composición de los agares utilizados.

En total fueron cultivadas 9 muestras las cuales varían el tipo de agar, fuente de microorganismos y tipo de crudo en la Tabla 6 se presenta el listado de los cultivos realizados. Estos se incubaron por 8 días a 36°C.

Tabla 6: Listado de cultivos

CULTIVO	AGAR	CRUDO	FUENTE MICROORGANISMOS
1	Nutritivo	Moriche	medio mínimo de sales
2	Nutritivo	Tigana	medio mínimo de sales
3	Nutritivo	Carmentea	medio mínimo de sales

CULTIVO	AGAR	CRUDO	FUENTE MICROORGANISMOS
4	King B	Moriche	medio mínimo de sales
5	King B	Tigana	medio mínimo de sales
6	King B	Carmentea	medio mínimo de sales
7	King B	Moriche	Crudo
8	King B	Tigana	Crudo
9	King B	Carmentea	Crudo

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7: Composición Agar Nutritivo y Agar King B

NOMBRE	COMPOSICIÓN Y/O FÓRMULA	PREPARACIÓN
AGAR NUTITIVO	* Polvo "Lab-Lemco": 1 g/l * Extracto de levadura: 2 g/l * Peptona: 5 g/l * Cloruro de sodio: 5 g/l * Agar: 15 g/l	28 g en 1 l de agua destilada
AGAR KING B	* Proteasa - Peptona: 20 g/l * Sulfato de magnesio: 1,5 g/l * Fosfato tripotásico 3-hidrato: 1,8 g/l * Agar - Agar: 10 g/l	33,5g en 1 l de agua destilada

Fuente: Elaboración propia.

De las siembras presentadas en la Tabla 6 se realizó aislamiento de microorganismos en AN y AKB.

5.4 Tinción de Gram

Se realizó tinción de gram para clasificar los microorganismos aislados en gram positivos y gram negativos. El procedimiento para la tinción de gram, se describe a continuación (Presscott, Harley, & Klein, 2004).

- Paso 1: Fijar muestra a laminilla porta objetos
- Paso 2: Aplicar cristal violeta (1 minuto), lavar con agua.
- Paso 3: Aplicar lugol (1 minuto), lavar con agua
- Paso 4: Aplicar alcohol acetona (30 segundos), lavar con agua

- Paso 5: Aplicar safranina o fucsina (1 minuto), lavar con agua
- Paso 6: Evaluar en microscopio.

5.5 Producción de biosurfactante

5.5.1 Cultivo para producción de biosurfactante.

Posterior a la clasificación de los microorganismos, se realizó la inoculación en caldo nutritivo para aumento de la biomasa en incubadora a 36°. En la Tabla 8 se presenta la composición del caldo nutritivo utilizado.

Tabla 8: Composición Caldo Nutritivo

NOMBRE	COMPOSICIÓN Y/O FÓRMULA	PREPARACIÓN
CALDO NUTRITIVO	* Polvo "Lab-Lemco": 1 g/l * Extracto de levadura: 2 g/l * Peptona: 5 g/l * Cloruro de sodio: 5 g/l	13 g en 1 l de agua destilada

Fuente: Elaboración propia.

El cultivo para la producción de biosurfactante se realizó en medio de cultivo con inductores de producción de biosurfactantes cuya composición se presenta en la Tabla 9 (Martínez S., Pedroza R, & Gutiérrez R, 2010).

Tabla 9: Composición Medio de Cultivo con Inductores de producción de biosurfactantes

NOMBRE	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Fosfato di-básico de Sodio	Na_2HPO_4	2,2 g/l
Di- Potasio Hidrógeno Fosfato anhidro	K_2HPO_4	1,4 g/l
Sulfato de Magnesio 7-hidrato	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 g/l
Sulfato de Hierro (II) 7 Hidrato	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
Cloruro de Sodio	NaCl	0,05 g/l

NOMBRE	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0,02 g/l
Extracto de Levadura	* Nitrógeno Total: 10 - 12,5 %w/w * Nitrógeno Amino: 5,1 %w/w * Cloruro de Sodio: 0,3 %w/w	0,02 g/l
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1 g/l
Glicerina	C ₃ H ₈ O ₃	20 g/l
pH		7.0
Solución de Elementos Traza		1 g/l
Agua Destilada	H ₂ O	979 g/l

Fuente: Tomado de *Métodos Microbiológicos, Físicos y Químicos con Aplicación Ambiental. Manual de Microbiología Ambiental* (Martínez S., Pedroza R, & Gutiérrez R, 2010)

Todos los reactivos y equipos utilizados fueron los existentes y de propiedad del laboratorio de biología de la Universidad EAN. Se sustituyó el fosfato di-básico de sodio por molibdato de Sodio 2 Hidrato y el nitrato de amonio por cloruro de amonio en la composición original del medio de cultivo con inductores de producción de biosurfactantes presentada en la Tabla 9 . Ambos cambios se realizan por disponibilidad de reactivos y considerando suministrar fuentes de sodio y nitrógeno.

Se requiere adicionalmente de una solución de elementos traza (Martínez S., Pedroza R, & Gutiérrez R, 2010), sin embargo, estos no fueron adicionados considerando que se encuentran como componentes traza del agua con la cual se realizan los medios de cultivo.

Se prepararon y cultivaron 8 muestras de microorganismos en 8 matraces de 500mL, estos se mantuvieron en agitación constante por medio de agitación magnética y con temperatura entre 32°C y 36°C. Se monitoreó diariamente el pH de los erlenmeyers para verificar que se encontrara ajustado en el rango de pH: 6-7.

5.5.2 Etapas experimentales

Para la producción de biosurfactante se realizaron 2 etapas:

- *Primea Etapa:* El objetivo era determinar la reducción del anillo de sustrato utilizado, el cual es un factor que indica probabilidad de producción de biosurfactante (Martínez, 2014). Se seleccionaron microorganismos aislados en AKB y caracterizados como gram positivos. El procedimiento fue sembrar en caldo nutritivo para aumento de biomasa en incubadora a 36°C, sin agitación. Posteriormente se realizó cultivo en medio de cultivo con inductores de producción de biosurfactantes. La composición original propone como fuente de carbono glicerina (ver Tabla 9), esta fue sustituida por aceite de carro usado.
- *Segundo Etapa:* El objetivo fue evaluar la producción de biosurfactante con las 8 muestras de microorganismos seleccionadas, 4 fueron seleccionadas por reducción verificable del anillo de aceite y 4 cuya clasificación fue de bacilos cortos gram negativos. La composición del ensayo se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10: Dosificaciones para ensayo de producción de biosurfactante

COMPUESTO	%VOLUMEN
Microorganismos	50
Fuente de carbono (aceite de carro usado, aceite de soya comercial)	5
Medio inductor de producción de biosurfactantes	45

Fuente: Tomado de *Métodos Microbiológicos, Físicos y Químicos con Aplicación Ambiental. Manual de Microbiología Ambiental* (Martínez S., Pedroza R, & Gutiérrez R, 2010)

5.6 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento fue realizada para determinar las etapas de crecimiento de los microorganismos. Se elaboró por medio de la medición de densidad óptica a 600nm. Se utilizó para el análisis de espectrofotometría UV-vis un espectrofotómetro UV-1800 marca SHIMADZU. El equipo es un espectrofotómetro de doble haz, con rango de

medición entre 190nm - 1100nm, resolución de onda de 0,1nm. El software del equipo es el *UVprobe*. El equipo hace parte del laboratorio de química de la Universidad EAN³.

La curva de crecimiento se desarrolló durante 10 días. La densidad óptica fue tomada cada 24 horas durante los primeros 3 días (72 horas), realizando 3 repeticiones de medición y el día 10 se tomó la medición final.

5.7 Centrifugación ácida.

Como proceso de separación del producto se utilizó el método de precipitación ácida para realizar la extracción del biosurfactante. Se realizó centrifugación de los medios de cultivo a 6.000 RPM durante 25 minutos, luego se acidificaron los caldos de cultivo con ácido clorhídrico de concentración 10%v/v hasta pH 2.0. Se centrifugó nuevamente a 6.000 RPM durante 25 minutos. El sobrenadante fue separado por filtración en papel filtro de retención de partículas de 11µm. La muestra filtrada es secada en un desecador con sílica gel durante 8 días y pesada para obtener la cantidad de producida.

5.8 Caracterización del biosurfactante por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El producto separado fue analizado por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. El equipo utilizado para realizar el análisis de infrarrojo es el IR-Tracer100 marca SHIMADZU con un ATR Specac, software de adquisición de datos LabsolutionsIR. Los espectros se toman en modo % Transmitancia, con apodización Happ-Genzel en un rango entre 340-4700cm⁻¹ con una resolución de 2cm⁻¹. Para cada muestra se toman 45 escáneres. El equipo hace parte de los instrumentos de análisis químico del laboratorio de absorción atómica y cromatografía de la Universidad EAN⁴.

³ Los datos del equipo fueron extraídos de los manuales y catálogos de los equipos de laboratorio de la Universidad EAN

⁴ Los datos del equipo fueron extraídos de los manuales y catálogos de los equipos de laboratorio de la Universidad EAN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento microorganismos de las muestras de crudo

Luego de 8 días de incubación a 36°C en MMS, se realizó siembra en AN y AKG. La primera valoración se realiza para determinar el crecimiento microbiano en el medio mínimo de sales. En la Tabla 11 se presenta la valoración. En la Figura 6 se presenta las siembras en medido mínimo de sales.

Figura 6: Siembra de crudos en medido mínimo de sales



Fuente: Elaboración propia

Tabla 11: Resultados cualitativos de las siembras

AGAR	CRUDO	MUESTRA	RESULTADO
Nutritivo	Moriche	MMS-Líquido	Positivo
Nutritivo	Tigana	MMS-Líquido	Negativo
Nutritivo	Carmentea	MMS-Líquido	Negativo

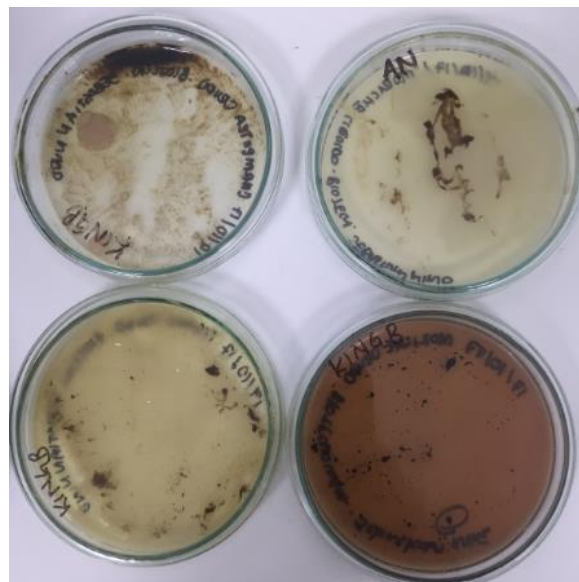
AGAR	CRUDO	MUESTRA	RESULTADO
King B	Moriche	MMS-Líquido	Negativo
King B	Tigana	MMS-Líquido	Negativo
King B	Carmentea	MMS-Líquido	Negativo
King B	Moriche	Crudo	Positivo
King B	Tigana	Crudo	Positivo
King B	Carmentea	Crudo	Positivo

Fuente: Elaboración propia

Las muestras MMS-Líquidas, corresponden a la toma de la muestra líquida tomada del MMS donde fueron cultivadas las muestras de crudo. La prueba con crudo Moriche evidencia disminución del anillo de aceite notaria (ver Figura 6) comparándola con las otras dos muestras; adicionalmente fue positiva en el momento de ser cultivado en AN (ver Tabla 11).

En la Figura 7 se presenta una imagen de los 4 agares que fueron positivos en el crecimiento bacteriano.

Figura 7: Siembra muestras líquidas y crudo en agar Nutritivo y King B

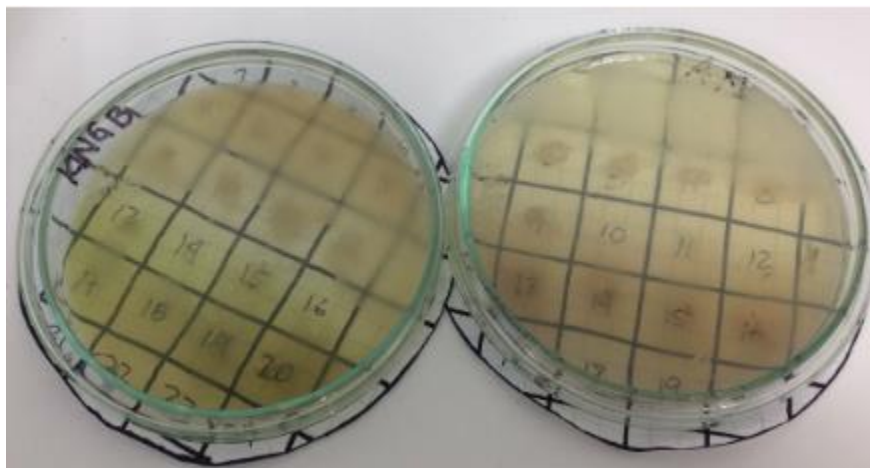


Fuente: Elaboración propia

Se procedió a realizar un cultivo de mayor especificidad. Se tomaron dos cajas Petri, una con AN y otra con AKB para realizar la selección de microorganismos. La siembra en

estas cajas se realiza tomando diferentes muestras de las colonias de microorganismos presentes en las siembras presentadas en la Figura 7. Se incubaron por 8 días a 36°C. En la Figura 8 se presentan los resultados de la selección de microorganismos.

Figura 8: Siembra selectiva de microorganismos en agar Agar King B y Agar Nutritivo



Fuente: Elaboración propia

En el aislamiento selectivo las dos cajas Petri dieron positivas según se muestra en la Figura 8.

Según los resultados presentados en la Tabla 11, de los 6 ensayos realizados al MMS líquido solo 1 obtuvo resultado positivo en crecimiento de microorganismos. El crecimiento microbiano se encuentra ligado directamente a la capa inter – fase entre el crudo y el medio mínimo de sales, donde los microorganismos pueden encontrar la fuente de carbono, por lo cual se encuentran en mayor concentración en la inter-fase, mas no en la fase líquida.

Por tal motivo se realizó siembra directamente en AKB con crudo donde se obtuvieron resultados positivos de crecimiento (ver Tabla 11) y fueron corroborados con el aislamiento realizado en AKB y AN (ver Figura 8).

6.2 Tinción de Gram

Se realizó el procedimiento de tinción de Gram para clasificar los microorganismos. En la Tabla 12 se presentan los resultados.

Tabla 12: Resultados tinción de gram

MUESTRA	AGAR	CRUDO	CLASIFICACIÓN SEGÚN GRAM
1	King B	Carmentea	Cocos gram +
2	King B	Carmentea	Bacilos cortos gram - y Cocos gram +
3	King B	Carmentea	Bacilos cortos gram -
4	King B	Carmentea	Bacilos cortos gram - y Cocos gram +
5	Nutritivo	Carmentea	Bacilos cortos gram -
6	Nutritivo	Carmentea	Bacilos cortos gram -
7	Nutritivo	Carmentea	Bacilos cortos gram -
8	Nutritivo	Carmentea	Bacilos cortos gram -
9	Nutritivo	Moriche	Cocos gram +
10	Nutritivo	Moriche	Bacilos cortos gram -
11	Nutritivo	Moriche	Bacilos cortos gram -
12	King B	Moriche	Bacilos cortos gram -
13	King B	Moriche	Bacilos cortos gram -
14	King B	Moriche	Bacilos cortos gram -
15	King B	Moriche	Bacilos cortos gram -
16	Nutritivo	Tigana	Bacilos gram + esporulados
17	Nutritivo	Tigana	Bacilos gram + esporulados
18	Nutritivo	Tigana	Bacilos gram + esporulados

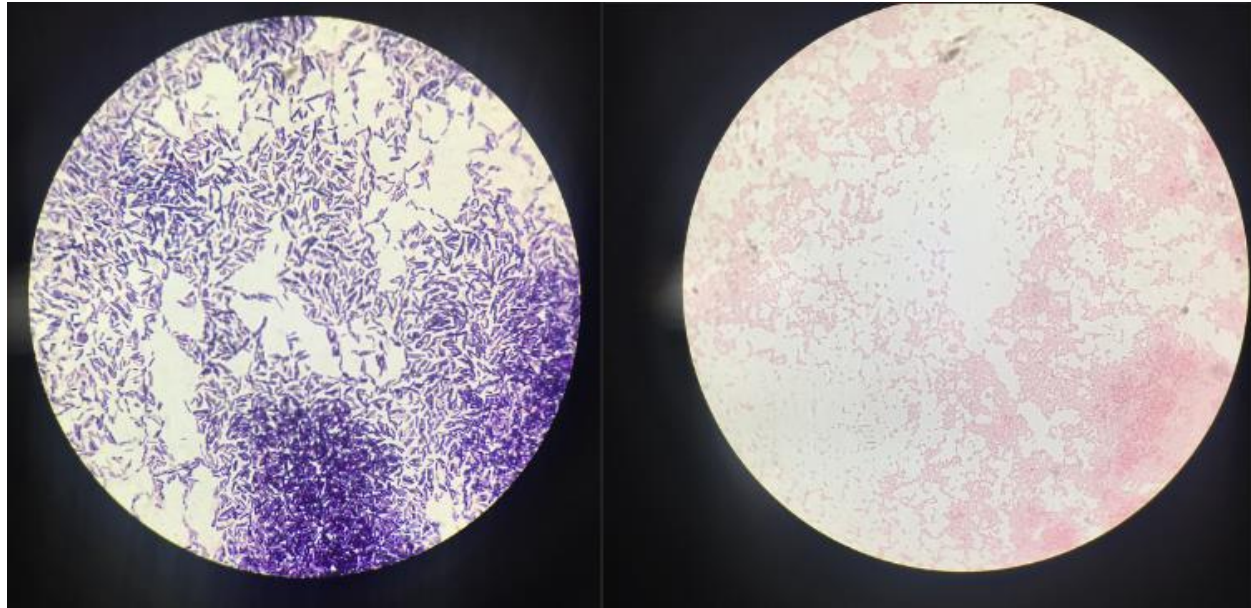
Fuente: Elaboración propia

El porcentaje total de muestras de bacilos cortos Gram negativos es de 61,1%. El porcentaje bacilos cortos Gram negativos por tipo de muestra de crudo es de:

- Porcentaje de bacilos cortos Gram negativos Crudo Carmentea: 62,5%
- Porcentaje de bacilos cortos Gram negativos Crudo Moriche: 85,7%
- Porcentaje de bacilos cortos Gram negativos Crudo Tigana: 0,0%

En la siguiente Figura 9 se presentan bacilos gram positivos esporulados y de los bacilos cortos gram negativos.

Figura 9: Tinción de Gram. (Izquierda: Bacilos gram positivos esporulados. Derecha: bacilos cortos gram negativos)



Fuente: Elaboración propia

Siguiendo la literatura se encuentran indicios hacia la especificación del género *Pseudomonas sp.* Según los resultados presentados en este apartado, se obtuvieron resultados positivos de siembra en AKB, el cual es selectivo para *Pseudomonas sp* (Johnsen & Nielsen, 1999) y el género *Pseudomonas sp* se clasifica como bacilos gram negativos (Presscott, Harley, & Klein, 2004). Sin embargo, se requiere realizar la secuenciación del gen 16S rDNA para poder concluir que el género de los microorganismos obtenidos es *Pseudomonas sp.*

6.3 Producción de biosurfactante

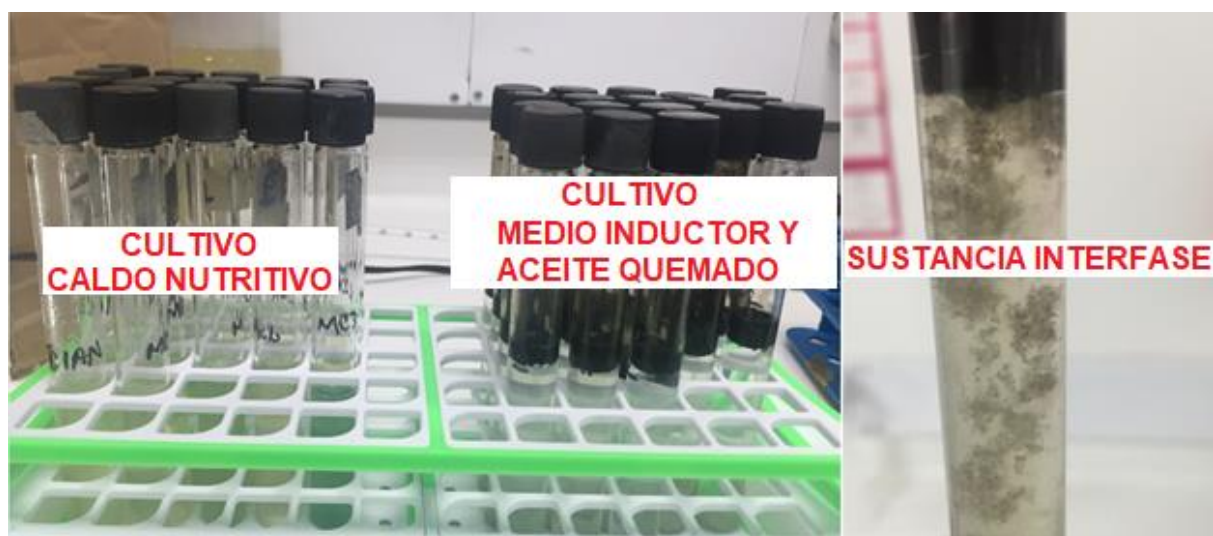
En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos del ensayo de reducción del anillo de aceite. Las Figura 10 presenta los tubos de ensayo de la prueba de reducción de anillo de aceite, como sustrato fue utilizado aceite de carro usado.

Tabla 13: Resultados disminución de anillo de aceite

MUESTRA	SUSTANCIA BLANCA	DISMINUCIÓN DE ANILLO ACEITE
1	Positivo	Variación no verificable
2	Positivo	Variación no verificable
3	Positivo	Variación no verificable
4	Positivo	Variación no verificable
5	Positivo	Variación no verificable
6	Positivo	Variación no verificable
7	Positivo	Variación no verificable
8	Positivo	Variación no verificable
9	Positivo	Reducción aprox. 1mm
10	Positivo	Variación no verificable
11	Positivo	Reducción aprox. 1mm
12	Positivo	Reducción aprox. 1mm
13	Positivo	Variación no verificable
14	Positivo	Variación no verificable
15	Positivo	Reducción aprox. 1mm
16	Positivo	Variación no verificable
17	Positivo	Variación no verificable
18	Positivo	Variación no verificable

Fuente: Elaboración propia

Figura 10: Ensayo de producción de biosurfactantes



Fuente: Elaboración propia

Se presentó producción de sustancia blanca inter-fase, la cual fue positivo para todas las muestras sembradas, pero solo 4 muestras de las 15 presentaron una variación verificable del espesor de la capa de aceite en el tubo de ensayo. La medición fue realizada flexómetro, cuya unidad de medida menor es de 0,001m (1mm).

Se seleccionaron 8 muestras para realizar el ensayo de producción de biosurfactante (segundo ensayo ver sección 5.5.2). Las muestras 9, 11, 12 y 15 que dieron positivas en la disminución del anillo de aceite (ver Tabla 13) y cuatro muestras adicionales de clasificación bacilos cortos gram negativos. Se seleccionaron las muestras 3, 5, 6 y 7 (ver Tabla 13) por ser muestras de microorganismo provenientes de otra fuente de crudo. Las muestras 9, 11, 12 y 15 corresponden a microorganismos aislados del crudo Moriche y las muestras 3, 5, 6 y 7 corresponden a microorganismos aislados del crudo Carmentea (ver Tabla 12). No se tomaron muestras de microorganismos aislados de crudo Tigana porque estos fueron clasificación de bacilos gram positivos esporulados (ver Tabla 12).

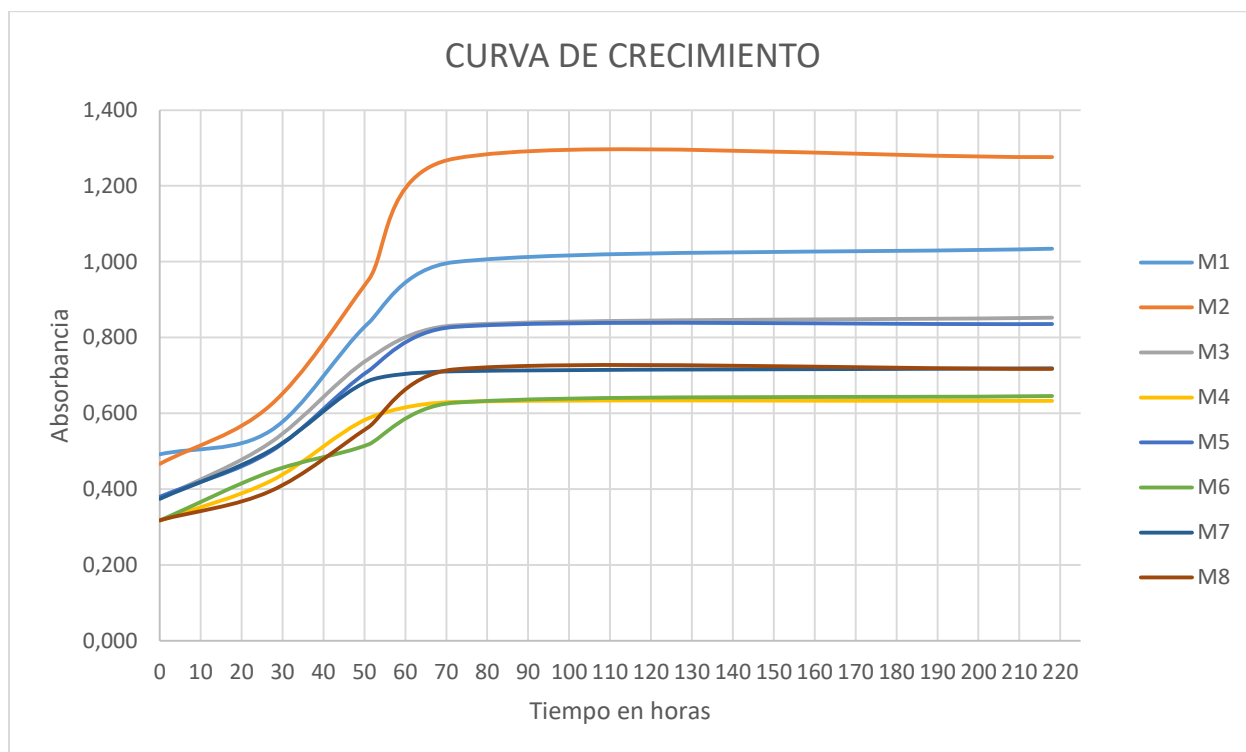
La primera etapa se realizó con aceite de carro quemado; sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios en la producción de biosurfactante respecto a la reducción del anillo de aceite. Por ellos se cambió para la segunda etapa la fuente de carbono utilizada por aceite de soya comercial.

El volumen se incrementó a matraces de 500ml, fueron monitoreadas las condiciones de temperatura en el rango de 32 a 36°C y pH en valor de 7 durante los 10 días del ensayo. La curva de crecimiento de los microorganismos fue elaborada por medio de toma de densidad óptica a 600nm en espectrofotómetro. Las mediciones de densidad se realizaron al momento de inicio del ensayo tomando el blanco (medio de cultivo) y al adicionar los microorganismos, luego se realizaron mediciones repetidas 3 veces durante los primeros 3 días cada 24 horas y finalmente el día 10. Las curvas de crecimiento resultados del ejercicio se presentan en la Figura 11.

En la Figura 11 se pueden observar las fases de crecimiento del microorganismo, estas se encuentran reportadas en la Tabla 14.

La separación del producto se realizó por centrifugación ácida, el cual se reduce el pH hasta valor de 2 en el cual el biosurfactante es insoluble en agua (Martínez, 2014). En la Tabla 14 se presentan los valores producidos en cada una de las 8 muestras.

Figura 11: Curva de crecimiento microorganismos



Fuente: Elaboración propia

Las muestras M2, M3, M4, M5, M6, M7 alcanzaron la fase de latencia en menos de 5 horas mientras que las muestras M1 fue la de mayor tiempo de latencia con tiempo de 20 horas. La fase exponencial observada fue similar para todas las muestras con un rango de tiempo entre 60 y 70 horas, la fase estacionaria no tiene tiempo de finalización debido a que no se evidenció fase de muerte. En la Tabla 14 se presentan los resultados de producto obtenido en las 8 muestras analizadas.

La eficiencia es evaluada con la relación de producto obtenido contra los gramos de sustrato utilizado. Por análisis de curva de crecimiento se establecieron las fases de crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, según la Figura 11 la muestra 1 (M1) su fase de latencia estuvo hasta la hora 20, la fase logarítmica va de la hora 20 a la hora 70 y la fase estacionaria es de la hora 70 en adelante. La fase de muerte no se evidenció en el experimento. En la Tabla 14 se presentan los rangos de las diferentes fases para las diferentes muestras del ensayo.

Las curvas de crecimiento no poseen declinación en su tendencia luego de 10 días de ensayo, lo anterior se debe a que los microorganismos llegan a un equilibrio en donde los microorganismos vivos se alimentan tanto del biosurfactante producido como de los microorganismos muertos.

Tabla 14: Resultados Producción

MUESTRA	PRODUCTO (g)	PRODUCTO (g/l)	EFICIENC. Y (g _p /g _c)	FASE CRECIMIENTO (h)			
				Latencia	Log.	Estacionaria.	Muerte
M1	10,05	20,1	0,4512	20	70	<70	N/D
M2	6,87	13,74	0,3084	>5	70	<70	N/D
M3	5,56	11,12	0,2496	>5	65	<65	N/D
M4	12,65	25,3	0,5679	>5	60	<60	N/D
M5	5,76	11,52	0,2586	>5	65	<65	N/D
M6	13,67	27,34	0,6137	>5	70	<70	N/D
M7	5,31	10,62	0,2384	>5	50	<50	N/D
M8	7,06	14,12	0,3169	10	65	<65	N/D

Fuente: Elaboración propia

Al comparar la eficiencia de producción de biosurfactante respecto a los gramos de sustrato (y en la Tabla 14), contra las eficiencias de producción reportadas por Lang & Wullbrndt (1999), estas se encuentran entre el rango de producción característico para los sustratos aceite de soya y aceite de oliva. El rango de eficiencia g_p/g_c para aceite de soya es de 0,624 a 0,687 y para aceite de oliva es de 0,382 a 0,5 (Lang & Wullbrandt, 1999). Según lo anterior quienes las muestras obtuvieron rangos de producción similares son M1, M4 y M6.

Para el desarrollo del diseño conceptual se toman dos bases principales resultado de la fase de laboratorio: la primera es la base de la curva de crecimiento que será base fundamental en el proceso de escalamiento de producción de biomasa con el microorganismo en fase exponencial; y el segundo es la eficiencia de producción, con la cual se establecerá la base de cálculo para el balance de masa. Al igual la importancia de establecer las fases de crecimiento se debe a que el biosurfactante se produce durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Toribio-Jiménez, y otros, 2014), lo cual brinda tiempos de reacción estimado para la conceptualización del proceso de producción.

6.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Los productos obtenidos en la segunda etapa de producción de biosurfactante (ver sección 5.8) se analizaron por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Las tendencias en la gráfica generada por la toma del espectro fueron comparadas contra el espectro característico de biosurfactantes tipo ramnolípidos (ver Figura 12).

Para realizar la comparación con las curvas características de los espectros FTIR de los ramnolípidos, se compararon los espectros obtenidos en laboratorio y presentados en la Figura 13 contra el espectro característico presentados en las Figura 12 (Rikalovic, Gojic-Cvijovic, Vrivic, & Kardadzic, 2012), el cual describe las vibraciones características de los grupos funcionales perteneciente a los ramnolípidos en los siguientes rangos (Rikalovic, Gojic-Cvijovic, Vrivic, & Kardadzic, 2012):

Figura 12: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de Ramnolípidos

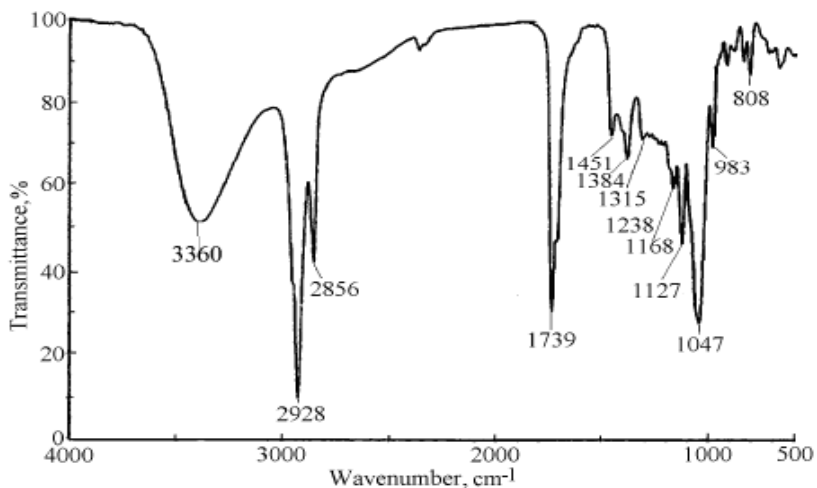
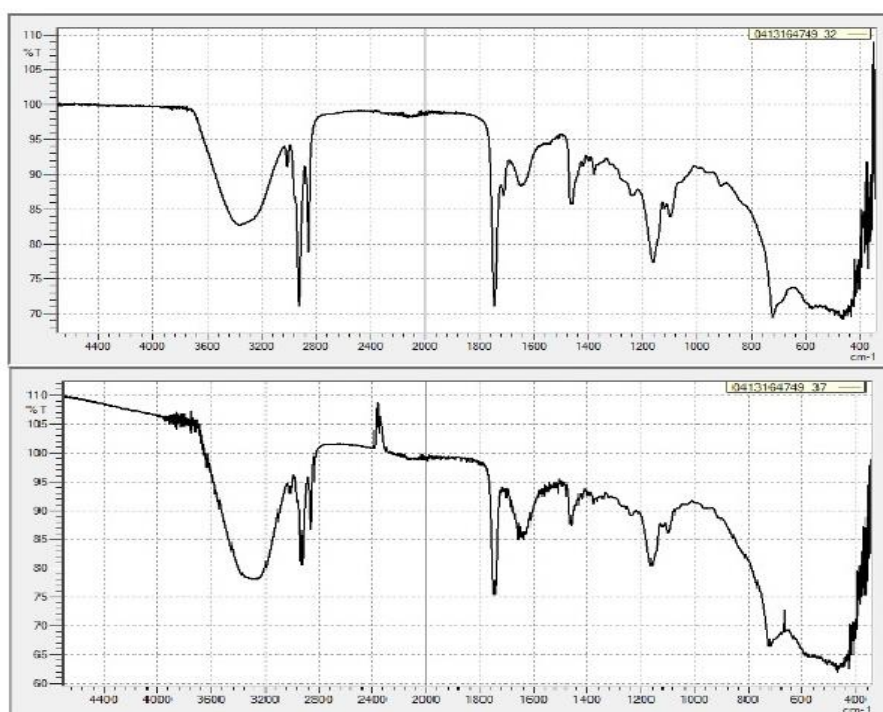


Fig. 5. IR Spectrum of rhamnolipid showing the following vibrations: C–H stretching asym. (2928 and 2856 cm^{-1}), C=O stretching (1739 cm^{-1}), C–H deformations (1451, 1238 and 808 cm^{-1}), C–H/O–H deformation (1384 cm^{-1}), O–H in plane deformation (1315 cm^{-1}), C–O stretching (1168, 1127 and 1047 cm^{-1}), CH_3 rocking (983 cm^{-1}).

Fuente: Tomado de *Production and characterization of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa san-ai* (Rikalovic, Gojic-Cvijovic, Vrivic, & Kardadzic, 2012)

- C-H: $\lambda=2.928\text{cm}^{-1}$ y 2.856cm^{-1}
- C=O: $\lambda=1.739\text{cm}^{-1}$
- C-H: $\lambda=1.451\text{cm}^{-1}$; 1.238cm^{-1} y 808cm^{-1}
- C-H/O-H: $\lambda=1.384\text{cm}^{-1}$
- O-H: $\lambda=1.315\text{cm}^{-1}$
- C-O: $\lambda=1.168\text{cm}^{-1}$; 1.127cm^{-1} y 1.047cm^{-1}
- CH₃: $\lambda=938\text{cm}^{-1}$

Figura 13: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de Producto obtenido



Fuente: Elaboración propia

Los picos observados del producto obtenido son:

- C-H: $\lambda=2.920\text{cm}^{-1}$ y 2.840cm^{-1}
- C=O: $\lambda=1.720\text{cm}^{-1}$
- C-H: $\lambda=1.460\text{cm}^{-1}$; 1.240cm^{-1} y 800cm^{-1}
- C-H/O-H: $\lambda=1.360\text{cm}^{-1}$
- O-H: $\lambda=1.280\text{cm}^{-1}$

- C-O: $\lambda=1.160\text{cm}^{-1}$; 1.120cm^{-1} y 1.040cm^{-1}
- CH₃: $\lambda=940\text{cm}^{-1}$

Según lo anterior el espectro de la Figura 13 posee los picos característicos en la mayoría de los rangos especificados para biosurfactante de tipo ramnolípido, al igual que posee picos de vibraciones entre las longitudes de onda de 1.100 cm^{-1} a 1.300 cm^{-1} confirmando la presencia de glicolípidos tipo biosurfactante (Antoniou, Fodelianakis, Korkakaki, & Kalogerakis, 2015). La variación de los picos se debe adicionalmente al tipo de microorganismo que produjo el biosurfactante en el cual se compara con un biosurfactante producido por un género específico de *Pseudomonas sp* (*Pseudomonas aeruginosa san-a*) mientras que el producto obtenido fue de una especie nativa, originaria de muestras de hidrocarburos. Se requiere realizar ensayos de mayor especificidad como cromatografías de capa fina o espectroscopía de masas.

7. DISEÑO CONCEPTUAL

A partir de la eficiencia y curva de crecimiento obtenidas en la etapa experimental y con un estimado de incursión en el mercado nacional de surfactantes del 8%, se desarrolla el diseño conceptual para la producción de biosurfactante tipo ramnolípido, modificando el orden establecido en la Tabla 4: Etapas del diseño conceptual de procesos, al propuesto en la siguiente lista.

- Nivel 0: Información de referencia
- Nivel 1: Definición del tipo de operación
- Nivel 2: Estructura de entradas y salidas
- Nivel 3: Estructura de separación
- Nivel 4: Estructura de recirculaciones

El nivel 5: Red de intercambio de calor y recobro de energía, no se desarrolla en este proyecto, debido a que la información es insuficiente para determinar los requerimientos de calor

7.1 Nivel 0: Información de Referencia.

Según la Encuesta Anual Manufacturera del año 2017 la producción anual de jabones industriales fue de 4.488.423kg (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2017). Para este caso de estudio se dimensiona la capacidad de la planta para producir 30.000kg mensuales de biosurfactante, que representan 8% de la producción mensual nacional.

El sustrato de mayor eficiencia de producción reportado es el aceite de soya, del cual se tiene reportes de eficiencia de producción de 0,624 a 0,687 gramos de biosurfactante por cada gramo de fuente de carbono (Lang & Wullbrandt, 1999). Para efectos del dimensionamiento de la planta se tomará la eficiencia obtenida por la muestra M6 en la etapa de laboratorio la cual es de 0,613 gp/gc (ver Tabla 14). Con esta relación

se establece que se requieren para el proceso 48.939,6kg/mes de aceite de soya. Este dato será el eje de cálculo del balance de masa como base de cálculo.

7.2 Nivel 1: Tipo de operación

A continuación se realiza una evaluación cualitativa de los factores que deben considerarse para la definición del tipo de operación los cuales son (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009): cantidad producida, calidad de producto, flexibilidad operativa, estandarización de equipos, eficiencia del proceso, operación y mantenimiento, disponibilidad de materias primas y demanda del producto.

Tabla 15: Selección del tipo de operación.

FACTOR	LOTES	CONTÍNUO	EXPLICACIÓN
Cantidad Producida	+	-	La producción estimada es de 360.000kg/año. Para producciones inferiores a 453.592kg/año se recomienda operación por lotes (Douglas, 1988).
Calidad de Producto	+	-	Para productos cuya calidad se debe verificar en cada lote distribuido se recomienda por lotes (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009)
Flexibilidad Operativa	+	-	Los equipos pueden ser utilizados para la producción de otros productos u otras etapas de proceso, mientras que continuo es específico para un solo producto por su operación 24/7. (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009)
Estandarización de Equipos	+	-	Los equipos pueden ser utilizados para la producción de otros productos u otras etapas de proceso, (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009)
Eficiencia del Proceso	-	+	Los procesos continuos tienen mayores eficiencias energéticas y operativas por su producción a escala. Procesos de integraciones energéticas no son posibles en

FACTOR	LOTES	CONTÍNUO	EXPLICACIÓN
			operación por lotes (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009).
Operación y Mantenimiento	+	-	Por ser un proceso biotecnológico se requiere de operación aséptica (Doran , 1998), la operación por lotes brinda tiempos que permiten realizar la esterilización de equipos (Crueger & Crueger, 1993).
Demanda del Producto	+	-	Aunque los biosurfactantes son amigables con el medio ambiente, aun no se posee un precio competitivo en el mercado (Maneerat , 2005) (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014).

Fuente: Elaborado a partir de los trabajos de (Douglas, 1988) (Crueger & Crueger, 1993) (Doran , 1998) (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009) (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014)

Se define el tipo de operación por lotes según los resultados obtenidos en la Tabla 15.

7.3 Nivel 2: Estructura de entradas y salidas

Para definir la estructura de entradas y salidas se debe tener presente que la propuesta del proceso productivo se divide en 2 líneas principales. Se selecciona el diagrama de conceptual como diagrama para la presentación de la estructura de entradas y salidas. Sin embargo, en el Anexo 1 se presenta un diagrama de bloques para el proceso.

7.3.1 Primera línea – Inoculación del microorganismo:

En la Tabla 10: Dosificaciones para ensayo de producción de biosurfactante, se presentan las concentraciones en % v/v, según la cual el volumen a utilizar de microorganismos es el 50% del volumen total, 45% del volumen total a producir es el

medio de cultivo con inductores de producción de biosurfactantes y el 5% restante es el volumen requerido de la fuente de carbono.

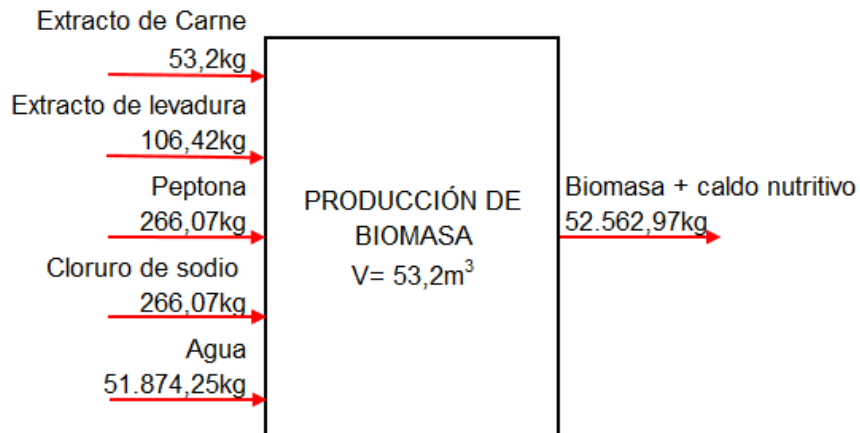
Teniendo en cuenta que el biosurfactante se produce durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Toribio-Jiménez, y otros, 2014) y comparando las fases con la curva de crecimiento obtenida en laboratorio (ver sección 6,3 Producción de biosurfactante, Figura 3: Curva de crecimiento de microorganismos) se estima la duración del proceso productivo en 3 días, tiempo establecido donde se desarrolla la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos y parte de la fase de estacionaria. La producción entonces se realizaría en 10 lotes mensuales. La base de cálculo es de 3 toneladas/lote de biosurfactante producido.

Tabla 16: Volúmenes requeridos para producción

	%Volumen	m3/bache
Microorganismo	50%	53,2
MMS+Inductores	45%	47,9
Fuente de carbono (aceite de soya)	5%	5,3
Total Bache	100%	106,4

Fuente: Elaboración propia

Figura 14: Entradas y salidas general para producción biomasa.



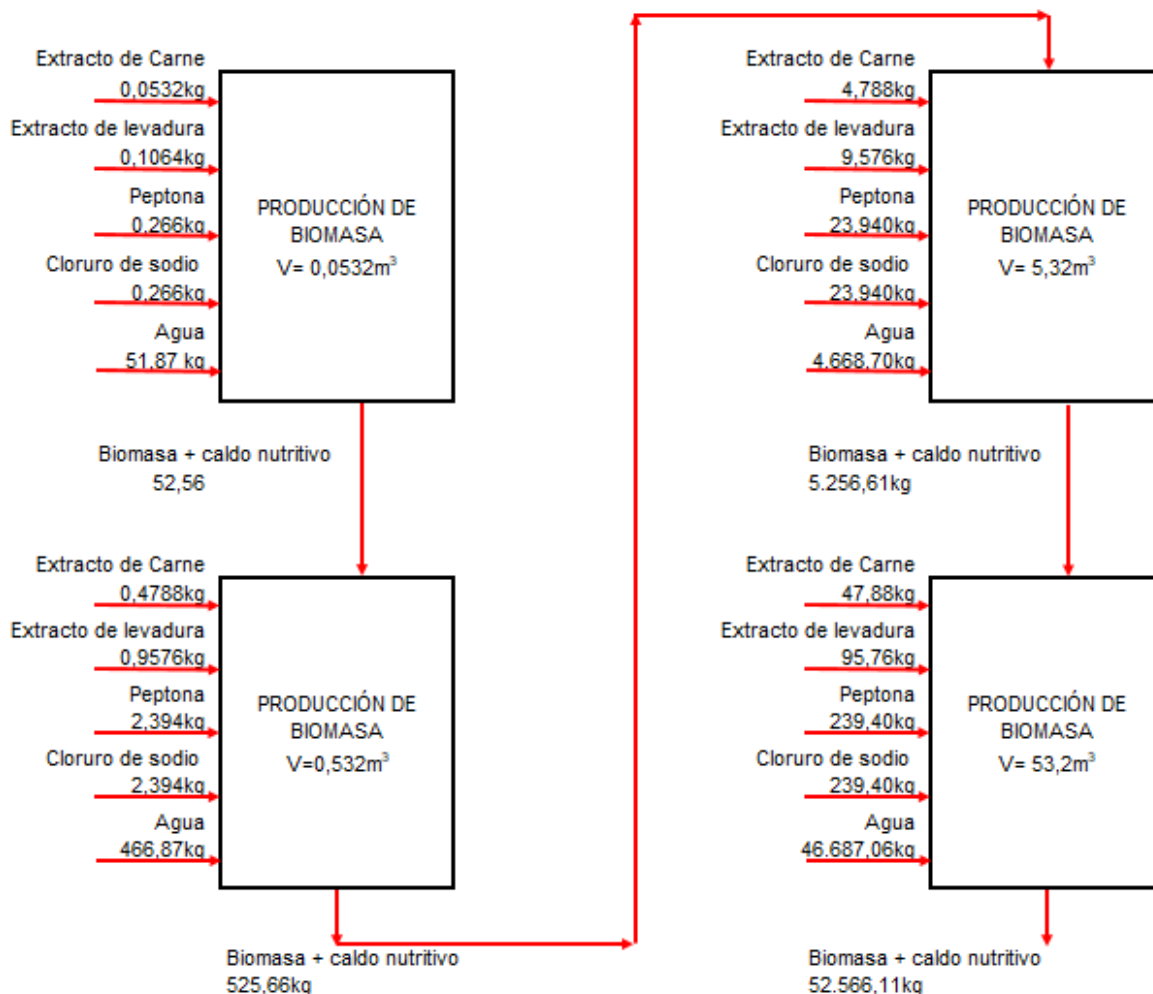
Fuente: Elaboración propia

Se calcularon posteriormente los volúmenes de microorganismos, medio inductor de producción de biosurfactante y fuente de carbono según la Tabla 10. Los volúmenes se presentan en la Tabla 16.

Esta primera línea producirá 53,2m³ de microorganismo por bache. En la Figura 14 se presenta el esquema general de entradas y salidas.

Los bioprocesos requieren la preparación de la cantidad de biomasa requerida para la operación. Es por ello que se propone un proceso de escalamiento de crecimiento de biomasa en 2 o 3 etapas, en relación 1:10 para obtener la cantidad requerida (Hermann, 2003). En Figura 15 se presenta el proceso de escalamiento propuesto para la obtención del volumen requerido de biomasa.

Figura 15: Escalamiento crecimiento biomasa.

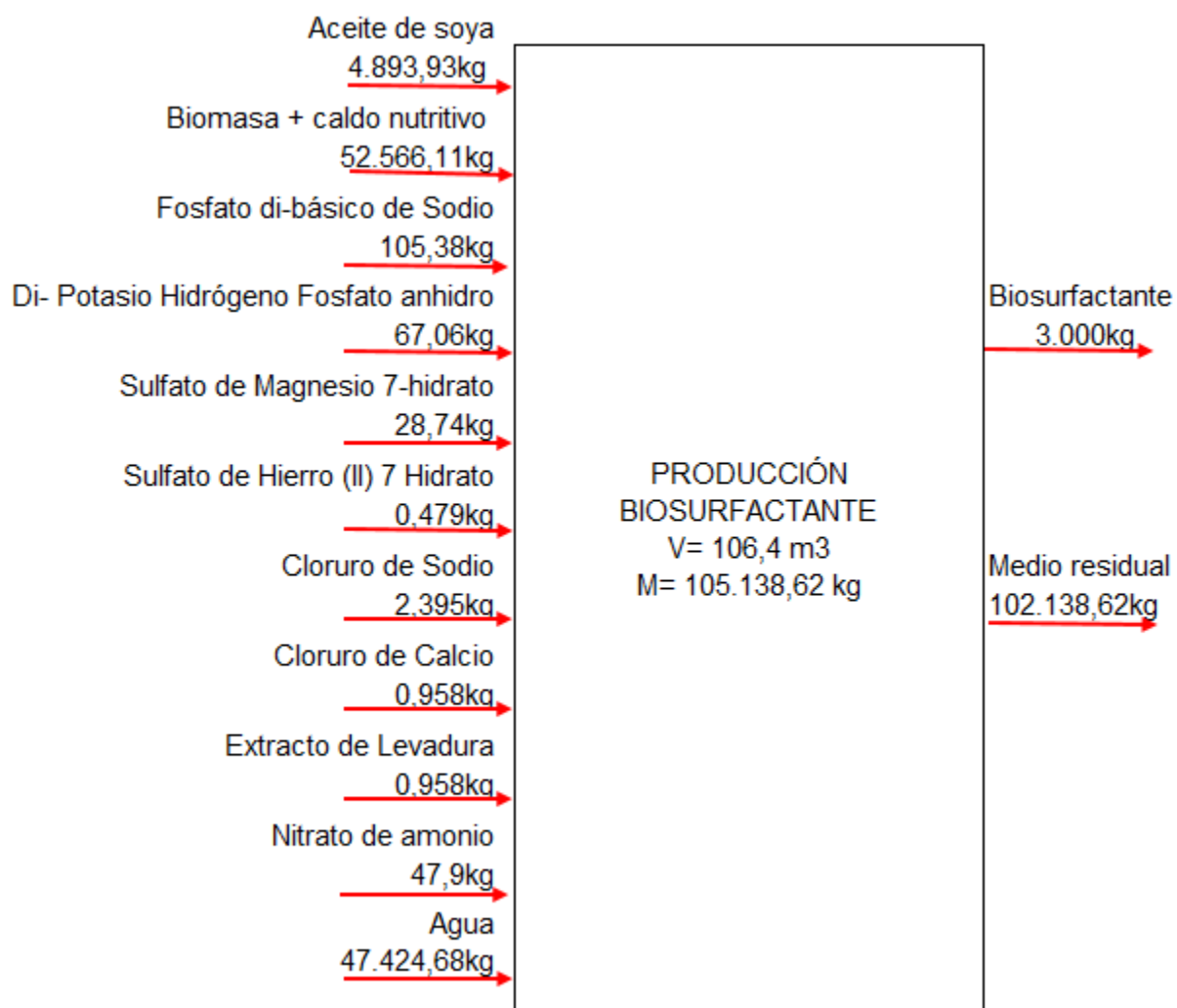


Fuente: Elaboración propia

7.3.2 Segunda línea – Bioproceso

Para completar la producción de biosurfactante, se requiere de adicionar el volumen faltante compuesto por: 47,9m³ de medio mínimo de sales con inductores de producción de biosurfactante y 5,3m³ de fuente de carbono (ver Tabla 16). El diagrama de entradas y salidas para el bioproceso se presenta en la Figura 16.

Figura 16: Entradas y salidas producción biosurfactante.



Fuente: Elaboración propia

El proceso de producción será realizado en biorreactor. Para ello el biorreactor deberá contar con facilidades mecánicas para la agitación y aireación del medio, al igual que las facilidades de alivio de presión requeridos para los procesos de esterilización de equipos, requerido para brindar el nivel aséptico en el proceso (Doran , 1998).

7.4 Nivel 3: Estructura de separación

Para la extracción del biosurfactante se utiliza el procedimiento realizado en laboratorio de precipitación ácida. El primer paso a realizar es la acidificación del medio de cultivo hasta $\text{pH} < 2$, valor en el cual el producto es insoluble en el medio y será separado por medio del proceso de centrifugación.

El sistema propuesto para separación de partículas suspendidas en líquidos, donde la fase en estado líquido corresponde a la mayor proporción de la mezcla, son sistemas de flotación, precipitación y centrifugación (Svarovsky, 2000). La concentración en peso de biosurfactante es de 2,93% demostrando así que el mayor porcentaje de la mezcla se encuentra en fase líquida.

Cuando el objetivo de la separación es la obtención de retorta consistente con alto contenido de sólidos, el proceso es denominado *DEWATERING* (Perry, 2008).

7.5 Nivel 4: Estructura de Recirculaciones.

Para determinar la estructura de recirculaciones se realiza primero el análisis de la composición por peso de los cada uno de los compuestos en el balance general de masa por lote y se presenta en la Tabla 17. Esta se realiza para determinar los reactivos que pueden ser recuperables para el sistema (Turton, Bailie, Whiting, & Shaeiwitz, 2009).

Tabla 17: Concentración en peso producción lote de biosurfactante

COMPUESTO	kg	%p/p
Aceite de soya	4893,960	4,6548
Extracto de carne	53,200	0,0506
Extracto de levadura	106,422	0,1012
peptona	266,072	0,2531

COMPUESTO	kg	%p/p
Fosfato di-básico de Sodio	105,380	0,1002
Di- Potasio Hidrógeno Fosfato anhidro	67,060	0,0638
Sulfato de Magnesio 7-hidrato	28,740	0,0273
Sulfato de Hierro (II) 7 Hidrato	0,479	0,0005
Cloruro de Sodio	268,418	0,2553
Cloruro de Calcio	0,958	0,0009
Extracto de Levadura	0,958	0,0009
Nitrato de amonio	47,900	0,0456
Agua	99298,936	94,4459
TOTAL	105138,5	100

Fuente: Elaboración propia

Se infiere de la Tabla 17 que los dos mayores compuestos utilizados para la producción de biosurfactante son agua 94,44% y aceite de soya 4,96%.

La recirculación busca recuperar el aceite que no reaccionó para la producción de biosurfactante, este puede obtenerse por métodos de flotación en trampas de grasas y con desnatadoras se recupera el aceite residual (Perry, 2008), este podrá recircularse al proceso productivo.

El agua debe tener un proceso primario de neutralización ya que fue acidificada para realizar la separación del producto y realizarse la determinación de las propiedades fisicoquímica para determinar el tipo de tratamiento antes de su vertimiento. Esta podrá evaluarse su reutilización en operaciones secundarias de la planta como aguas de lavado general de la planta o aguas sanitarias, sin embargo, dicho estudio no hace parte del alcance de este trabajo.

8. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento de microorganismos de las tres muestras de crudo pertenecientes a los campos Tigana, Carmentea y Moriche, utilizando agar King B por ser un medio selectivo para inmovilización de *Pseudomonas sp*, cuyos resultados fueron positivos de crecimiento para la siembra directa muestra en agar. La estimación del género *Pseudomonas sp*. se debe a las evidencias de crecimiento en agar king b, clasificación como bacilos gram negativos y ser productoras de biosurfactante tipo ramnolípido. Se recomienda establecer el género de la bacteria aislada por medio de secuenciación del gen 16S rDNA.
- El producto obtenido fue acidificado hasta obtener $\text{pH} < 2$, centrifugado, filtrado y secado. Se obtuvo producción mínima de 5,31g y máxima de 13,67g correspondientes a eficiencias de producción evaluadas como gramos producidos por gramo de fuente de carbono de g_P/g_C de 0,2384 y 0,6133. encontrándose estas en los límites reportados en la literatura para producción de biosurfactante por microorganismo del género *Pseudomonas sp*. Se realizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, obteniéndose un espectro acorde a biosurfactantes del tipo ramnolípido de una especie nativa presente en muestras de hidrocarburos Moriche y Carmentea, demostrando el potencial productor de biosurfactante tipo ramnolípido
- Se generó la curva de crecimiento de los microorganismos aislados por medio de espectrofotometría, obteniéndose las siguientes fases: Fase de latencia inferior a 5 horas; Fase logarítmica desde la hora 5 a la hora 70; Fase estacionaria mayor a 70 horas. No hubo evidencia para la identificación de la fase de muerte. Con los resultados obtenidos laboratorio de la curva de crecimiento y eficiencia de producción, se realizaron los Niveles 0 al 4 propuestos por Douglas (1988) y complementado por Turton et. al (2009) para desarrollo de la conceptualización del proceso productivo. El nivel 5 de recobro energético no hace parte del alcance por insuficiente información. El diagrama propuesto de proceso se presenta en el ANEXO 1. DIAGRAMA DE BLOQUES.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez C, M. (2004). La industria de los surfactantes: Tendencias mundiales y perspectivas para Colombia. *Palmas*, 25(Especial), 340-353.
- Antoni, F., & Szabo, M. T. (1982). Damaging effect of detergents on human lymphocytes. *Bulletin of environmental contamination and Toxicology*, 28(4), 504-511.
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strain using crude oil as carbon source. *Microbiotechnology based surfactants and their applications*, 6(274), 8-21.
- Baasel, W. D. (1989). *Preliminary Chemical Engineering Plant Design* (2 ed.). New York, United States: Springer.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial application of microbial surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495-508.
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Sientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Biegler, L. T., Grossmann, I. E., & Westerberg, A. W. (1999). *Systematic Methods of Chemical Process Design*. New Jersey: Prentice Hall.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63-67.
- Chitiva Urbina, L., & Dussán, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 5-10.
- Crueger, W., & Crueger, A. (1993). *Biotecnología. Manual de microbiología industrial*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Cserháti, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28, 337-348.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2017). *Encuesta Anual Manufacturera*. Obtenido de <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/industria/encuesta-anual-manufacturera-enam>

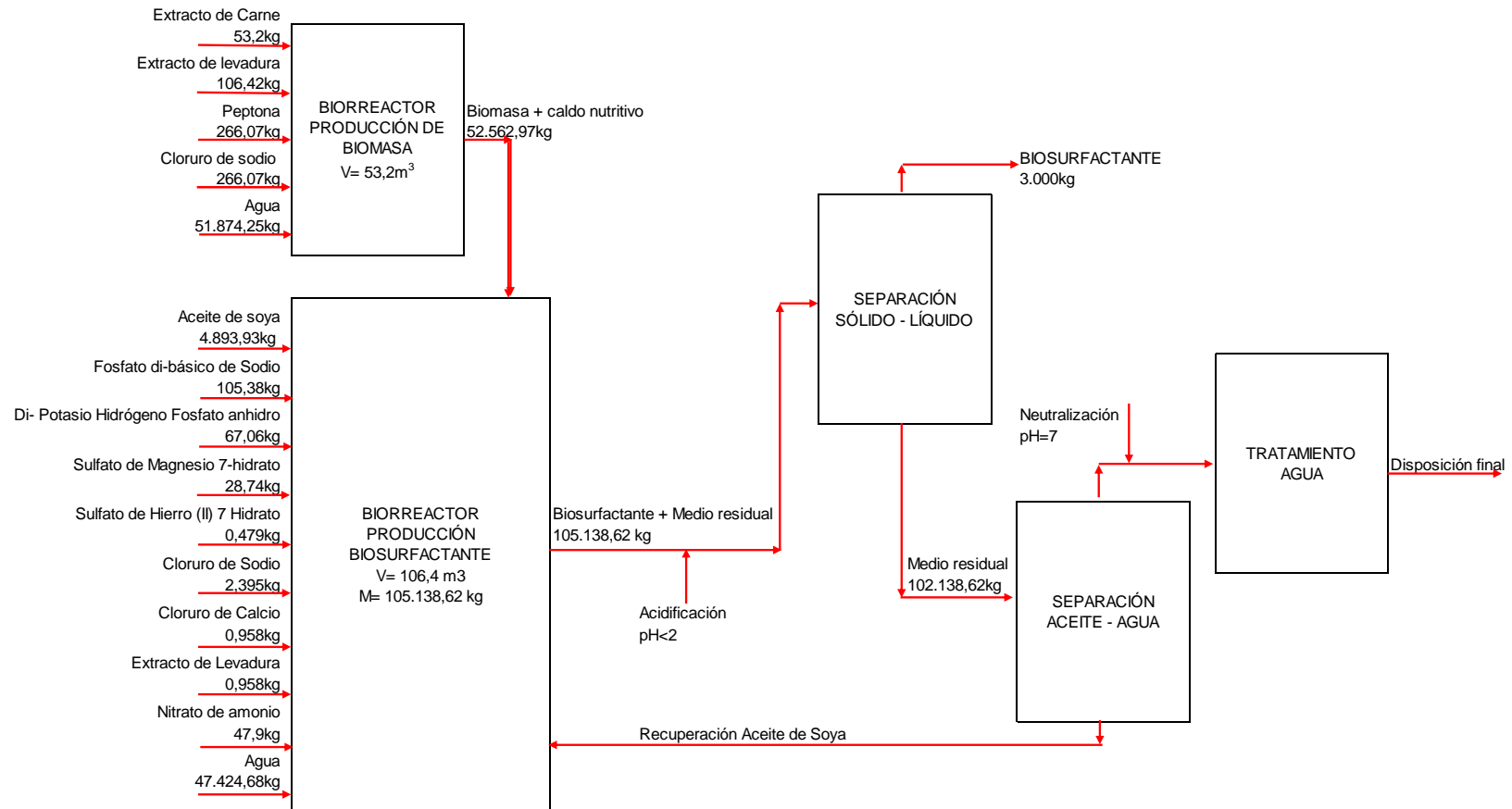
- Departamento de Educación, C. C. (2006). *Microbiología Industrial*. Washington D.C., Estados Unidos: Organización de los Estados Americanos.
- Doran , P. M. (1998). *Principios de ingeniería en los bioprocesos* (1 ed.). Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Douglas, J. M. (1988). *Conceptual Design of chemical processes* (1 ed.). New York, United Estates: McGraw_Hill.
- Falbe, J. (2012). *Surfactants in consumer products: Theory, Technology and Applications*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Federación Nacional de biocombustibles en Colombia. (06 de 04 de 2011). Obtenido de <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-271.htm>
- Grossman, M., Prince, R., Garrett, R., Garrett, K., Bare, R., Lee, K., . . . Guénette, C. (1999). Microbial diversity in oiled and un-oiled shoreline sediments in the Norwegian Arctic. *Microbial Biosystem: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.*, 1, 775-787.
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104, 155-172.
- Ivanokovic, T., & Hrenovic, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arh Hig Rada Toksikol*, 65, 95-110.
- Jacques, & Jacques, M. (1996). Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends in Microbiology*, 4(10), 408-410.
- Johnsen, K., & Nielsen, P. (1999). Diversity of Pseudomonas strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *FEMS Microbiology Letters*(173), 155-162.
- K.S.M Rahman, P., Pasirayi, G., Auger, V., & Ali, Z. (2010). Production of rhamnolipid biosurfactants by Pseudomonas aeruginosa DS 10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55, 45 - 52.
- Khadydja , D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo , L. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Science*, 17, 1-31.

- Kumar , A., Bisht, B., Joshi, V., & Dhewa, T. (2011). Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6), 1079-1093.
- Lang , S., & Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 22-32.
- Lewis, M. A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: review and risk assessment. *Water Research*, 25(1), 101-113.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (12 ed.). Madrid , España: Pearson Educación S.A.
- Maneerat , S. (2005). Production of biosurfactants using substrates from renewable-resource. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 27(3), 675-683.
- Mannan, S. (2005). *Lees' Loss Prevention in the Process Industries* (Vol. 1). Texas: Elsevier.
- Marchant , R., & Banat, I. (2012). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597-1605.
- Martínez S., M., Pedroza R, A., & Gutiérrez R, V. (2010). *Métodos Microbiológicos, Físicos y Químicos con Aplicación Ambiental. Manual de Microbiología Ambiental*. Santa María: Universidad Santa María.
- Martínez, M. (2014). Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado del petróleo. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química* (7 ed.). McGraw Hill.
- McInerney, M. J., Knapp, R. M., Duncan, K., Simpson, D. R., Youssef, N., Ravi, N., . . . Weiland, S. (2007). *Development of an in situ biosurfactant production technology*. University of Oklahoma. doi:10.2172/943328
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trend in Biotechnology*, 24(11).
- Mulligan, C. (2005). Environmental Applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(22), 183-198.

- Pacwa Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Science*, 12(1), 633-654.
- Paraszkiewicz, K., Bernat, P., Kusmierska, A., Chojniak, J., & Plaza, G. (2018). Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural source. *Journal of Environmental Management*, 209, 65-70.
- Parés, R., & Juárez, A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*. España: Reverté S.A.
- Perry, R. H. (2008). *Chemical Engineers Handbook-Section 18*. United States: McGraw-Hill.
- Peter, M. S., & Timmeerhaus, K. D. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. Singapore: McGraw-Hill.
- Presscott, L., Harley, J., & Klein, D. (2004). *Microbiología* (5 ed.). Madrid, España: McGraw Hill.
- Raiger, L., & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 3, 146-161.
- Rikalovic, M., Gojic-Cvijovic, G., Vrivc, M., & Kardadzic, I. (2012). Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. *Journal of The Serbian Chemical Society*, 77(1), 22-47.
- Roberts, D., Roberts, J., Hodges, G., Gutsell, S., Ward, R., & Liewellyn, C. (2013). Aquatic toxicity of cationic surfactants to *Daphnia magna*. *SAR and QSAE Environmental Research*, 24(5), 417-427.
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactant and oil bioremediation. *Current Opinion in biotechnology*, 13, 249-252.
- Roy, A. (2018). A review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy*, 8, 248-252.
- Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. (2014). Rhamnolipid biosurfactants - past, present and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5(454).
- Svarovsky, L. (2000). *Solid-liquid separation* (4 ed.). Boston: Butterworth-Heinemann.

- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Banat, I. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology*(102), 3366-3372.
- Toribio-Jiménez, J., Velásquez Ardila, J. C., Romero Ramírez, Y., Rodríguez Barrera, M. Á., Chávez González, J., Guevara Luna, J., . . . Fierro Torres, A. (2014). *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes. *Tlamati*, 5(2), 66-82.
- Turton, R., Bailie, R. C., Whiting, W. B., & Shaeiwitz, J. A. (2009). *Analysis, Synthesis, and Desing of Chemical Processes* (3 ed.). Boston, Massachusetts, United States of America: Pearson Education.
- Upadhye, A. A., Qi, W., & Huber, G. W. (2011). Conceptual Process Design: A systematic method to evaluate and develop renewable ennergy technologies. *AIChE Journal*, 57(9), 2292-2301.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipids as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232, 389-397.
- Venkata Ramana, K. V., & Karanth, N. G. (1989). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 45(4), 249-257.
- Vijayakumar, S., & Saravana, V. (2015). Biosurfactants: Types, Source and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10, 181-191.
- Walas, S. M. (1988). *Chemical Process Equipment Selection and Desing* (1 ed.). London: Butterwoth-Heineman.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to biorremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 237-241.
- Wauquier, J.-P. (2004). *El refinio del petróleo; petróleo crudo, productos petrolíferos, esquemas de fabricación* (1 ed.). Madrid, España: Diaz de Santos.
- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in enviroment. *Enviroment International*, 32(3), 417-431.

ANEXO 1. DIAGRAMA DE BLOQUES



FUENTE: Elaboración Propia.