



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Escola d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental

GICOM (Grupo de Investigación en Compostaje)

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Producción, escalado y recuperación de soforolípidos mediante
fermentación en estado sólido con la cepa *Starmerella bombicola*.**

Tesis doctoral

Alejandra Rodríguez Gutiérrez

Directores:

Dra. María Teresa Gea Leiva

Dr. Xavier Font Segura

Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Barcelona

Septiembre 2020



Teresa Gea Leiva, profesora titular, y Xavier Font Segura, profesor agregado, del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certifican:

que, la Químico Farmacobiólogo con maestría de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Alejandra Rodríguez Gutiérrez ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo con el título “Producción, escalado y recuperación de soforolípidos mediante fermentación en estado sólido con la cepa *Starmerella bombicola*” que se presenta en esta memoria, la cual constituye su tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Ambiental por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que se tenga conocimiento y conste a efectos oportunos, presentamos en la Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona la citada Tesis firmando el presente certificado.

Dra. Teresa Gea Leiva

Dr. Xavier Font Segura

Bellaterra, Septiembre 2020.

A mi madre, mi esposo, mi hija,

A toda mi familia, mi razón de ser

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la financiación de la beca para realizar los estudios de doctorado en el extranjero.

Al Ministerio de Economía y Competitividad Español por la financiación del Proyecto que engloba la presente tesis (CTM2015-69513-R).

A mis directores de tesis Teresa Gea y Xavier Font, a Antoni Sánchez y a todos los miembros que integran el grupo de investigación en compostaje (GICOM).

A los doctores José González, Marco Mata, Celeste Ibarra y Daniel Guajardo del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) campus Monterrey y campus Puebla. Así como a Kathia y al Dr. Luis Alberto Mejía.

A los estudiantes que colaboraron en la tesis (Isa, Marga y Andy).

Al Departament d'Enginyeria Química Biològica i Ambiental (doctorandos, profesores, técnicos, secretaría, y personal de limpieza).

A las empresas Lípidos Santiga S.A. (LIPSA), a AB Azcarera Iberia S.L. y a Espumas del Valles por proveernos de insumos para la realización de los experimentos.

Dedicatoria

En primer lugar, me gustaría agradecer al GICOM que me dio la oportunidad de realizar el doctorado, gracias a Toni Sánchez por haberme tomado en cuenta desde el primer e-mail que le envié preguntando por el doctorado. Así mismo, a mis directores de tesis, Teresa Gea y Xavier Font gracias por darme la oportunidad, por confiar en mí, por enseñarme y por ser muy pacientes, durante este tiempo aprendí mucho de ustedes. Xavi, gracias por guiarme, asesorarme y ponerle un toque especial a todas esas reuniones para revisar experimentos y resultados. Tere, muchas gracias por que aparte de mi directora encontré una amiga en la que puedo confiar y que siempre tendrá algo bueno para animarme.

Gracias a todo el grupo de GICOM, Tere, Xavi, Toni, Raquel, Adriana, Ale, Javi, Laura, Arnau, Esther, a todos los que terminaron antes que yo, Pedro, María, Óscar Mauricio, Paula, Eva, Dani y a todos los practicantes o estudiantes de máster que pasaron durante mi estancia (Gina, Marga, Andy, Isa, José Luis, Marta, Karla Luna). Gracias a todos por su apoyo, por compartirme sus conocimientos y por hacerme sentirme siempre como en casa.

Laura, mi apoyo más grande durante todo este tiempo de doctorado, gracias por siempre estar allí para mí, porque siempre que volteaba contigo y te decía: Laura una pregunta... siempre tenías una respuesta o consejo para mí, por ser una gran maestra, persona, amiga y familia catalana. Siempre tendré en mis recuerdos todos esos días que pasamos en el lab, en la campana de flujo inoculando mil placas, montando reactores, sufriendo porque aun no respiraba la Candi o porque había fallado el experimento y siempre estuviste allí para ayudarme y resolver todo con tranquilidad. Gracias por haberme acompañado en México.

Paula, que te puedo decir que no sepas ya?. Fuiste la primera persona con la que hablé cuando llegué al despacho (Ay que suerte, a mí nadie me trato como a ti jaja). Gracias porque siempre estuviste allí para mí desde muy temprano cuando te enviaba los mensajes matutinos, porque cada día nos hacíamos líos mentales que tardábamos mucho tiempo en resolver, pero siempre los resolvimos, por ser mi compañera de crossaint porque fuiste la más paciente en mis momentos de bridezilla y por todos esos momentos de desesperación, felicidad, fiesta, paseos, pláticas, ocurrencias y risas, risas y más risas y por todo lo que me falta mencionar. Gracias por ser mi familia valenciana (de Valencia, Valencia) y por haber viajado conmigo a México.

Pía, mi chilena favorita. Nunca me alcanzará para agradecerte todos lo que has hecho por mí, por llegar a alegrarnos y contagiarnos siempre de positivismo y de risas, voy a extrañar mucho esas mañanas en las que el pasillo se convertía en un desfile de modas jaja. Gracias por que siempre me diste tranquilidad (hasta ahora los sigues haciendo), por quererme y seguirme la onda en nuestras ocurrencias y sobre todo por siempre entenderme (desde mis frases mexicanas hasta mis cosas de la candi) y sé que así será para toda la vida. Gracias por ser mi familia chilena y por haber estado conmigo en México.

Pili, nuestra pequeña y sociable Pili, muchas gracias por todos esos momentos de pláticas amenas, consejos y risas que me brindaste, siempre estuviste allí apoyarme y ponerle humor a toda la situación.

Arnau, moltes gràcies per tot, por ayudarme siempre en el lab, por llevarme a recoger los residuos. Siempre estaré muy contenta de que hayas formado parte de uno de los mejores días de mi vida en mi país! Gracias por todo y por mostrarme el amor por Catalunya. Visca Catalunya!.

Así mismo, quiero agradecer a todas estas personas que han pasado durante mi estancia en Barcelona y que ahora forman parte de mi vida y lo harán para siempre. Mili (la serbia más mexicana) nunca me alcanzará la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mi por estar siempre para mí, por quererme (a mí y a mi familia) por regañarme y enseñarme a ser fuerte. Carlos Cantú, le agradezco a la vida por coincidir contigo, porque mi vida en Barcelona no hubiera sido lo mismo sin un norteño como tú!. Omar, mi hermano postizo y roomie forever, porque no sé que hubiera sido Barcelona sin ti, nuestras salidas de: pues nada más vamos a cenar no?, o nuestras comidas y pláticas interminables, porque siempre estuviste allí para apoyarme, consolarme, aconsejarme y hacerme reír, tú y Silvia tienen un lugar muy importante en mi corazón. Gaby, una de las personas que más admiro, eres mi ejemplo de fortaleza, gracias por formar parte de mi vida, por tus consejos y por alegrar mis días. Ayari, la fiesterera incansable, gracias por tu apoyo y esas pláticas interminables en cualquier parte de la casa, siempre dándome consejos, cuidándome y por los regaños para Gaby y para mí. Todos ustedes formaron parte de uno de los días más importantes de mi vida, viajaron hasta nuestro México para estar conmigo y con Luis el día de nuestra boda, nunca lo olvidaré y siempre estaré agradecida con ustedes. Ustedes son mi segunda familia mexicana!!

Finalmente, quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida, mi mami, gracias por ese amor y apoyo incondicional, por darme la vida y por ser un gran ejemplo para mí, sin ti, nada de esto sería posible. Siempre llevaré en mi recuerdo cuando me visitaste en Barcelona, definitivamente una de las mejores cosas que me pasaron durante mi estancia, y la mejor parte fue el haber viajado y haber conocido tantos lugares tan impresionantes juntas (cumplimos nuestro sueño de viajar en Europa), sin ti no hubiera sido posible. Gracias a ti llegué hasta donde estoy, te amo mami.

A mi esposo, Luis, sabes que eres mi vida completa, tu me has enseñado el significado de amar y luchar por nuestros sueños, gracias por tu apoyo incondicional y por hacerme muy feliz, por tus visitas en Barcelona y los increíbles viajes que hicimos. Ahora estamos formando nuestra familia y sigo aprendiendo mucho de ti, cada día es una nueva experiencia en nuestras vidas. Gracias por todo este amor incondicional y por nuestra María porque gracias a ti descubrí este sentimiento de amar tanto a una pequeña personita que aún ni siquiera conocemos. Tú y María son todo para mí. Los amo.

A mi María, mi bebé, aún no estás con nosotros y ya eres todo para mí, porque de ahora en adelante todo lo que haré será por ti, gracias por haber llegado a mi vida en el mejor momento y haberme acompañado en mi vientre la última parte y la escritura de la tesis, jamás olvidaré esos días de estudio y escritura y sentir tus movimientos y pataditas en mi panza. Te amo!.

Finalmente, gracias a mi familia (Rodríguez Gutiérrez), mis abuelos: papá (Don Luis), mamá (Doña Petra), mis tíos, tías, primos, primas. También a mi familia (Mata Gómez), mis suegros, cuñadas, cuñado, concuña y sobrinas, gracias a todos por su apoyo y amor incondicional, son todo para mí.

En enero del 2017 llegué a Barcelona con un par de maletas, dejando todo en México, nunca me imaginé todas las personas que encontraría en el camino y mucho menos todas estas grandes experiencias por las que pasé durante este tiempo y que me han ayudado a crecer, le doy gracias a Dios, a la vida y a todas las personas que lo hicieron posible. Es una experiencia inolvidable y a pesar de que las cosas resultaron un poco diferentes a las que planeamos (gracias COVID), no lo cambiaría por nada en el mundo.

Resumen de la Tesis

El presente trabajo representa la continuación a la línea de investigación iniciada en una tesis anterior para la producción de soforolípidos (SLs) por fermentación en estado sólido (FES). Los SLs son un tipo de surfactante biológico producido por microorganismos y representa una gran alternativa para la sustitución de los surfactantes químicos, los cuales presentan una gran demanda. Los estudios se realizaron por FES utilizando como sustratos residuos agroindustriales (residuo de winterización del aceite de girasol y melaza de remolacha azucarera), y su fermentación por una cepa de la levadura *Starmerella bombicola*.

La primera etapa de esta investigación consistió en la evaluación de 9 materiales de diferente naturaleza (biológicos e inertes) para ser utilizados como soportes para la producción de SLs por FES a una escala de 0.5 L. Los materiales biológicos (lignocelulósicos) presentaron mejores resultados en comparación a los materiales inertes. La paja de trigo (PT) resultó ser el soporte con la mayor producción de SLs ($0.20 \text{ gSL g}^{-1}\text{MS}$), el cual fue seleccionado para la segunda etapa relacionada a la evaluación de la producción de SLs a escalas mayores. Así mismo, se comprobó que es posible producir SLs utilizando otros residuos análogos al residuo de winterización, sin embargo, es necesario tomar en cuenta el contenido de impurezas de los mismos y el proceso de recuperación del compuesto para evitar las interferencias de estas mismas en la calidad final del producto.

El escalado de la producción de SLs se llevó a cabo en dos reactores de diferente tamaño (22 y 100 L), en donde se estudió el efecto de la temperatura durante el proceso y la producción de SLs. Se observó que mediante una temperatura ambiente controlada y la implementación de estrategias de aireación la temperatura puede ser controlada. Así mismo, se implementó un proceso de diferentes ciclos de esterilización que permitió disminuir el crecimiento de otros microorganismos dentro del reactor, los cuales podrían interferir en el proceso metabólico de la levadura para producir SLs. Los resultados demostraron la levadura tiene la capacidad de producir SLs a pesar de que se modifiquen sus condiciones óptimas de temperatura.

Finalmente, como parte de una estancia de investigación que se realizó en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) en Monterrey, Nuevo León México se evaluaron dos diferentes tecnologías para la extracción y recuperación de SLs

como alternativa para la sustitución al método convencional con acetato de etilo, se estudiaron los sistemas de dos fases acuosas (ATPS) y la extracción con fluidos supercríticos (FSC). La extracción con ATPS permitió incrementar el rendimiento de SLs de 0.20 a 0.34 gSL g⁻¹MS, mientras que con FSC el rendimiento fue de 0.13 gSL g⁻¹MS. Los resultados demuestran que existen alternativas amigables con el medio ambiente y con potencial para extraer SLs producidos a partir del proceso de FES.

Esta tesis representa un camino para explorar a mayor detalle otras estrategias para la producción, recuperación y purificación de SLs mediante FES y continuar con la línea de investigación que se inició en el Grupo de Investigación en Compostaje (GICOM) del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Summary

The present work represents the continuation of the research line for the production of sophorolipids (SLs) by solid state fermentation (FES), that was started in a previous PhD thesis. SLs are a type of biological surfactant produced by microorganisms and represent a great alternative for the substitution of chemical surfactants, which are in great demand. The studies were carried out by FES using agro-industrial residues (winterization oil cake and sugar beet molasses) as substrates, and its fermentation with the strain of yeast *Starmerella bombicola*.

The first stage of this investigation consisted in the evaluation of 9 materials of different nature (biological and inert) to be used as supports for the production of SLs by FES at a 0.5 L scale. The biological materials (lignocellulosic) presented better results in comparison to inert materials. Wheat straw (PT) resulted the support with the highest production of SLs (0.20 gSL g⁻¹MS), which was selected for the second stage related to the evaluation of the production of SLs at larger scales. Likewise, it was found that it is possible to produce SLs using other residues analogous to the winterization residue, however, it is necessary to take into account their impurity content and the compound recovery process to avoid their interferences in the final quality of the product.

The scaling of the production of SLs was carried out in two reactors of different sizes (22 and 100 L), where the effect of temperature during the process and the production of SLs was studied. It was observed that through a controlled room temperature and the implementation of aeration strategies, the temperature can be controlled. Likewise, a process of different sterilization cycles was implemented that allowed the growth of other microorganisms within the reactor to be reduced, which could interfere in the metabolic process of the yeast to produce SLs. The results demonstrated that the yeast has the ability to produce SLs despite its optimal temperature conditions being modified.

Finally, as part of a research stay that was carried out at the Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) in Monterrey, Nuevo León México, two different technologies for the extraction and recovery of SLs were evaluated as an alternative to replace the conventional method. with ethyl acetate, two phase aqueous systems (ATPS) and supercritical fluid extraction (FSC) were studied. Extraction with ATPS allowed to increase

the performance of SLs from 0.20 to 0.34 gSL g⁻¹MS, while with FSC the yield was 0.13 gSL g⁻¹MS. The results show that there are environmentally friendly alternatives with the potential to extract SLs produced from the FES process.

This thesis represents a way to explore in greater detail other strategies for the production, recovery and purification of SLs by means of FES and to continue with the line of research that began in the Composting Research Group (GICOM) of the Department of Chemical, Biological Engineering and Environmental of the Autonomous University of Barcelona.

Resum de la Tesi

El present treball representa la continuació a la línia de recerca per a la producció de soforolípid (SLs) per fermentació en estat sòlid (FES) que va ser iniciada en una tesi anterior. Els SLs són un tipus de surfactant biològic produït per microorganismes i representa una gran alternativa per a la substitució dels surfactants químics, els quals presenten una gran demanda. Els estudis es van realitzar per FES utilitzant com a substrats residus agroindustrials (residu de winterització de l'oli de gira-sol i melassa de remolatxa sucraera) i el llevat *Starmerella bombicola*.

La primera etapa de la investigació va consistir en l'avaluació de 9 materials de diferent naturalesa (biològics i inerts) per a ser utilitzats com a suports per a la producció d'SLs per FES a una escala de 0.5 L. Els materials biològics (lignocel·lulòsics) van presentar millors resultats en comparació als materials inerts. La palla de blat (PT) va resultar ser el suport amb la major producció de SLs ($0.20 \text{ gSL g}^{-1}\text{MS}$), el qual va ser seleccionat per a la segona etapa relacionada a l'avaluació de la producció de SLs a escales més grans. Així mateix, es va comprovar que és possible produir SLs utilitzant altres residus anàlegs el residu de winterització, però, cal tenir en compte el contingut d'impureses dels mateixos i el procés de recuperació del compost per evitar les interferències d'aquestes mateixes en la qualitat final del producte.

L'avaluació de l'escalat de la producció de SLs es va dur a terme en dos reactors de diferent grandària (22 i 100 L), on es va estudiar l'efecte de la temperatura durant el procés i la producció de SLs. Es va observar que mitjançant una temperatura ambient controlada i la implementació d'estratègies de ventilació la temperatura pot ser controlada. Així mateix, es va implementar un procés de diferents cicles d'esterilització que va permetre la reducció del creixement d'altres microorganismes dins el reactor, els quals podrien interferir en el procés metabòlic del llevat per produir SLs. Els resultats van demostrar que el llevat té la capacitat de produir SLs tot i que es modifiquin les seves condicions òptimes de temperatura.

Finalment, com a part d'una estada de recerca que es va realitzar a l'Institut Tecnològic d'Estudis Superiors de Monterrey (ITESM) a Monterrey, Nuevo León, Mèxic, es van avaluar

dos diferents tecnologies per a l'extracció i recuperació de SLs com a alternativa per a la substitució al mètode convencional amb acetat d'etil. Es van estudiar els sistemes de dues fases aquoses (ATPs) i l'extracció amb fluids supercrítics (FSC). L'extracció amb ATPs va permetre incrementar el rendiment de SLs de 0.20 a 0.34 gSL g⁻¹MS mentre que amb FSC el rendiment va ser de 0.13 gSL g⁻¹MS. Els resultats demostren que hi ha alternatives amigables amb el medi ambient i amb potencial per extreure SLs produïts a partir del procés de FES.

Aquesta tesi representa un camí per explorar a més detall altres estratègies per a la producció, recuperació i purificació de SLs mitjançant FES i continuar amb la línia d'investigació que es va iniciar en el Grup de Recerca en Compostatge (GICOM) del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tabla de contenidos

Capítulo I. Introducción

1. Surfactantes de síntesis química	3
2. Biosurfactantes.....	4
2.1 Tipos de biosurfactantes y aplicaciones.....	5
2.2 Producción de biosurfactantes	7
3. Producción de Soforolípidos	8
3.1 Producción de soforolípidos por fermentación sumergida.....	11
3.2 Una alternativa para producir SLs: Fermentación en estado sólido	19
3.3 Producción de soforolípidos por Fermentación en estado sólido	22
3.4 Técnicas para la caracterización de soforolípidos	26
3.5 Impactos económicos y ambientales.....	26
4. Recuperación de compuestos (<i>Downstream Processing</i>)	27
4.1 Extracción de soforolípidos: Métodos convencionales.....	28
4.2 Otras alternativas	28
4.3 Sistemas de dos fases acuosas	29
4.4 Extracción con fluidos supercríticos.....	31

Capítulo II. Objetivos

Objetivos.....	34
----------------	----

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1 Materiales y métodos.....	39
3.1.1 Microorganismo.....	39
3.1.2 Preparación del inóculo.....	39
3.1.3 Evaluación del inóculo.....	40
3.1.3.1 Microscopía óptica	40
3.1.3.2 Densidad óptica	40
3.2 Sustratos	41
3.3 Soportes.....	41
3.4 Sistemas de fermentación en estado sólido	42
3.4.1 Fermentación en reactor de 0.5 L.....	43
3.4.2 Fermentación en reactor de 22 L.....	44
3.4.3 Fermentación en reactor de 100 L.....	45
3.5 Monitoreo y medición de la actividad biológica de los sistemas de fermentación	47
3.5.1 Tasa de consumo de oxígeno	47

3.5 Monitoreo y medición de la actividad biológica de los sistemas de fermentación	47
3.5.1 Tasa de consumo de oxígeno	47
3.5.2 Consumo de oxígeno acumulado	47
3.6 Métodos analíticos estándares	48
3.6.1 pH.....	48
3.6.2 Humedad y materia seca	48
3.6.3 Materia orgánica.....	49
3.6.4 Análisis elemental	49
3.6.5 Determinación de grasas	49
3.6.6 Densidad aparente (DAP) y porosidad	50
3.6.7 Capacidad de retención hídrica (CRH).....	51
3.6.8 Microscopía electrónica de barrido	51
3.7 Métodos específicos para el monitoreo del proceso de producción de soforolípidos	51
3.7.1 Rendimiento de soforolípidos	51
Concentración de soforolípidos.....	53
Producción volumétrica:	54
Rendimiento de producto/sustrato	54
3.7.2 Determinación del contenido total de azúcares (Método Antrona).....	54
3.7.3 Unidades Formadoras de colonias (UFC).....	56
3.7.4 Caracterización de soforolípidos (HPLC-MS).....	57
3.8 Procesos para la recuperación de compuestos (Downstream processing)	59
3.8.1 Extracción de soforolípidos con solventes orgánicos.....	59
3.8.2 Sistemas de dos fases acuosas.....	60
3.8.3 Extracción de soforolípidos con Fluidos supercríticos.....	61
3.8.4 Métodos específicos para determinación de impacto ambiental del proceso	62
Capítulo IV. Producción de biosurfactantes por fermentación en estado sólido usando	
agroresiduos y materiales inertes como soporte	
4.1 Materiales	70
4.2 Condiciones experimentales.....	70
4.3 Análisis estadístico	72
4.4 Resultados y discusión	73
4.5. Conclusiones.....	94

Capítulo V. Estudio del efecto de escala en la producción de soforolípidos mediante fermentación en estado sólido

5.1 Materiales	99
5.2 Condiciones experimentales	100
5.3 Resultados y discusión	102
5.4 Conclusiones.....	133

Capítulo VI. Evaluación de diferentes procesos de extracción y recuperación de soforolípidos

6.1 Materiales	139
6.2 Condiciones experimentales	139
6.3 Resultados y discusión	143
6.4 Conclusiones.....	171

Capítulo VII.

Conclusiones generales y trabajo futuro	173
Referencias	179

Lista de Abreviaciones

Abreviación	Significado	Unidades
ACP	Análisis de componentes principales	
AR	Arcilla	
ATPS	Sistemas de dos fases acuosas	
AV	Arcilla volcánica	
BMP	Potencial de producción de biogás	
BS	Biosurfactantes	
CA	Cáscara de arroz	
CG	Cromatógrafo de gases	
COC	Consumo de oxígeno acumulado	mg O ₂ g ⁻¹ MS
COVs	Compuestos orgánicos volátiles	
CP	Corteza de pino	
CRH	Capacidad de retención hídrica	g agua g ⁻¹ material
DAP	Densidad aparente	g L ⁻¹
DO	Densidad óptica	
DoE	Diseño de experimentos	
EA	Espuma de poliuretano color amarillo	
EN	Espuma de poliuretano color negro	
FC	Fibra de coco	
FES	Fermentación en estado sólido	
FI	Fase inferior	
Fms	Fermentación sumergida	
FORM	Fracción orgánica municipal	
FS	Fase superior	
FSC	Fluidos supercríticos	
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas	
HU	Humedad	%
MEL	Melaza de remolacha azucarera	
MELs	Lípidos de manosileritrol	
MO	Materia orgánica	%
MS	Materia seca	%
OUR	Tasa de consumo de oxígeno	mgO ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹
PE	Perlita	
PID	Detector de fotoionización	
PM	Potencial metanogénico	
PT	Paja de trigo	
RLs	Ramrólípidos	
RSF	Residuo sólido final	
SE	Sistemas con extracto (sin evaporar)	
SEM	Microscopía electrónica de barrido	
SF	Sólido fermentado	
SFT	Sólido fermentado triturado	
SL	Soforolípido	
SLs	Soforolípidos	
sOUR	Tasa de consumo de oxígeno específico	mgO ₂ g ⁻¹ MS
TD	Tierras de decoloración	
UFC	Unidades formadoras de colonias	UFC g ⁻¹ MS
WOC	Residuo de winterización del aceite de girasol	

Capítulo I

Introducción

Parte de este capítulo se encuentra publicado en la revista *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 413-435. Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: state of the art and perspectives. Jiménez-Peñalver, P., Rodríguez, A., Daverey, A., Font, X., Gea, T.

1. Surfactantes de síntesis química

Los surfactantes o agentes tensioactivos son productos químicos producidos o derivados del petróleo que tienen la capacidad de reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles ya que poseen al mismo tiempo una parte hidrofílica (cabeza) y una parte hidrofóbica (cola) y permiten la formación de agregados coloidales en soluciones acuosas denominados micelas (Figura 1.1) (Otzen, 2017; Sharma y Oberoi, 2017).

En la actualidad, la industria de los surfactantes de síntesis química es una de las más importantes a nivel mundial ya que cuenta con cantidades de producción masivas y ganancias millonarias (Wang *et al.*, 2018). El mercado de los surfactantes presentó una facturación global en el año 2016 de \$31 billones de dólares y se estima su crecimiento hasta los \$40 billones de dólares para el 2024 (Edser, 2018).

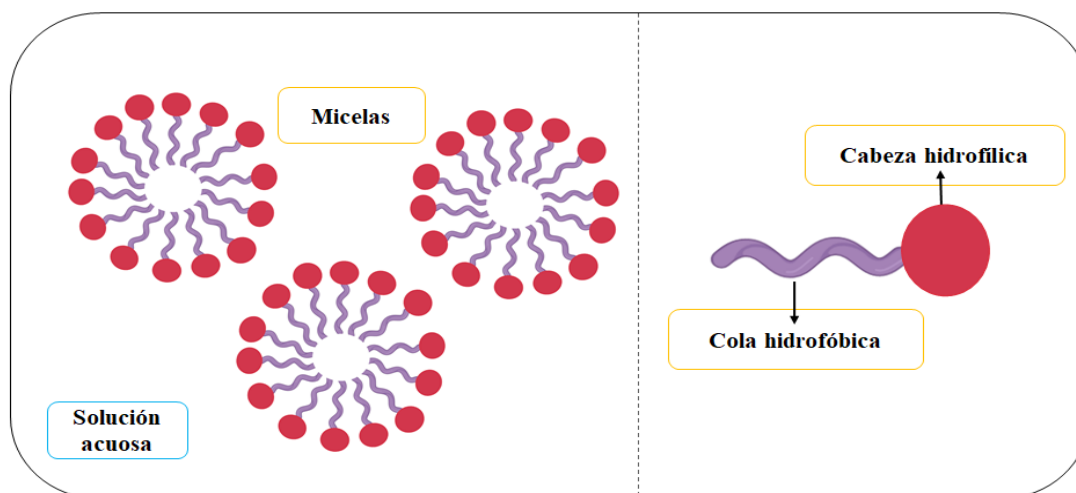


Figura 1.1. Izquierda: Formación de micelas en solución acuosa. Derecha: Configuración de un surfactante.

Los surfactantes están clasificados según sus características y propiedades en diferentes grupos: iónicos, los cuales presentan una gran afinidad al agua, estos a su vez se dividen en aniónicos (carga negativa) y catiónicos (carga positiva); no iónicos, los cuales no contienen grupos funcionales ionizables en el agua y los anfóteros los cuales presentan cargas tanto positivas como negativas dependiendo del medio en el que se encuentran (Sharma y Oberoi,

2017). Estos compuestos pueden funcionar como emulsificantes, solubilizantes y como mecanismos de envoltura para la reducción del aceite (Mishra *et al.*, 2009).

Gracias a sus propiedades, éstos compuestos químicos cuentan con un amplio rango de aplicaciones como pueden ser en la industria de los productos de limpieza, cosméticos, textiles, agroquímicos, alimentos, fármacos, petróleo, entre muchas otras más (Mishra *et al.*, 2009; Van Bogaert *et al.*, 2011). A pesar de su gran potencial en el mercado, estos compuestos son sintetizados a partir de fuentes no renovables como es el petróleo y presentan impactos negativos ya que la mayoría de ellos terminan dispersos en el medio ambiente, especialmente en los sistemas acuáticos en donde presentan una muy baja biodegradabilidad y provocan una grave contaminación ambiental con efectos tóxicos para los organismos vivos (Cserháti *et al.*, 2001).

Es aquí en donde surge la necesidad de buscar y recurrir a alternativas de bajo impacto ambiental para sustituir los surfactantes químicos por compuestos de origen biológico, que sean biodegradables y no provoquen los daños anteriormente mencionados. Como una gran alternativa se encuentran los surfactantes de origen biológicos o biosurfactantes, que pueden ser producidos por microorganismos mediante fermentación a partir de fuentes renovables (Van Bogaert *et al.*, 2011), los cuales, en los últimos años han sido de gran interés debido a sus características y propiedades.

2. Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son metabolitos extracelulares que actúan de la misma forma que los surfactantes químicos, la diferencia es que son producidos de manera biológica por microorganismos como bacterias y levaduras (Patel *et al.*, 2019). Al igual que los surfactantes sintéticos, estos compuestos biológicos actúan como buenos agentes emulsificantes, reducen la tensión superficial y son selectivos (Van Bogaert *et al.*, 2011). En comparación con los surfactantes químicos, los BS presentan ciertas ventajas; son altamente biodegradables, presentan muy baja toxicidad, son altamente selectivos y presentan actividad específica según las condiciones de temperatura, pH y salinidad en las que se encuentran, además cuentan con una gran variedad de aplicaciones lo que les permite ser de interés comercial para diferentes industrias (Costa *et al.*, 2018). Así, gracias a sus propiedades y a la efectividad

similar a la de los surfactantes de origen químico y a que son productos biodegradables y menos tóxicos, la producción y estudio de nuevos biosurfactantes ha tomado gran interés en los últimos años (Banat *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2018).

2.1 Tipos de biosurfactantes y aplicaciones

Los biosurfactantes por lo general presentan estructuras no iónicas y aniónicas y están compuestos, al igual que los surfactantes químicos, por una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. La diferencia es que la parte hidrofílica está formada generalmente por un azúcar, un éster, o un grupo hidroxilo, fosfato o carboxilato, mientras que la parte hidrofóbica está formada por proteínas, péptidos o ácidos grasos de cadenas de 10 o 18 átomos de carbono (Sharma y Oberoi, 2017). Estos compuestos se clasifican (Figura 1.2) según su estructura y peso molecular en biosurfactantes de bajo peso molecular, los cuales se caracterizan por ser mejores agentes reductores de la tensión superficial, que a su vez se clasifican en glicolípidos (soforolípidos (SLs), lípidos de manosileritrol (MELs) y ramnolípidos (RLs)), y en biosurfactantes de alto peso molecular constituidos por proteínas, lipoproteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos, los cuales tiene mejores propiedades emulsificantes (Sharma y Oberoi, 2017; Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019).

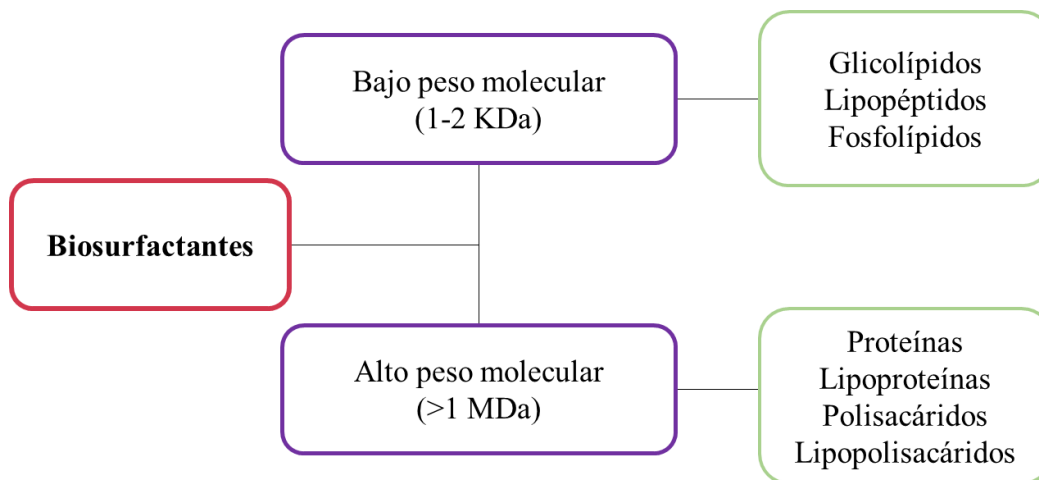


Figura 1.2. Clasificación de los biosurfactantes según su peso molecular

El interesante potencial que presentan los BS les ha permitido ir ganando interés comercial y representan una gran demanda en procesos biotecnológicos y en diferentes industrias como la agrícola, textil, alimenticia, cosmética, farmacéutica, de detergentes, como biopesticidas,

en la industria del papel, en procesos de biorremediación (petróleo y aceites contaminantes) entre muchas otras (Pereira, *et al.*, 2016). La tabla 1.1 enumera algunos ejemplos de las potenciales aplicaciones con resultados satisfactorios, entre ellas se enumeran aplicaciones ambientales como la biorremediación de suelos y aguas contaminadas, en la industria agrícola como control de plagas (biopesticidas), en la alimenticia como estabilizador de emulsiones, en la cosmética y productos de higiene personal, en la industria de los detergentes, en la farmacéutica como agentes anticancerígenos, entre muchos otros más.

Tabla 1.1. Potenciales aplicaciones de diferentes tipos de biosurfactantes.

Tipo de Biosurfactantes	Microorganismo	Potencial aplicación	Autores
Surfactina y Ramnolipidos	<i>Bacillus subtilis</i>	Biorremediación de tierras contaminadas con biodiesel	Whang <i>et al.</i> , 2008
Ramnolipidos	<i>Pseudomona aeruginosa</i> LBI	Ambiental y alimenticia	Maier <i>et al.</i> , 2000
Ramnolipidos	-	Demulsificación de residuos de petróleo crudo	Long <i>et al.</i> , 2013
Glicolipidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AB4	Remoción de metales pesados	Hazra <i>et al.</i> , 2011
Soforolipidos	<i>Candida bombicola</i>	Agentes anticancerígenos	Rashad <i>et al.</i> , 2014
Soforolipidos	<i>Candida bombicola</i> ATCC-22214	Compuestos antimicrobianos para productos de higiene oral	Elshikh <i>et al.</i> , 2017
Lipopéptido	<i>Candida lipolytica</i>	Biorremediación de metales pesados	Rufino <i>et al.</i> , 2012.
Soforolipidos	<i>C. bombicola</i> ATCC22214	Detergentes	Joshi-Navare <i>et al.</i> , 2013
Lipopolisacáridos	<i>Klebsiella oxitoca</i> BSF-1	Estabilizador de emulsiones y controlador de viscosidad	Kim y Kim, 2013
Bioemulsificadores/ lipopolisacáridos / polisacáridos	<i>Amycolatopsis tucumanensis</i>	Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados	Colin <i>et al.</i> , 2013
Lípidos de manosileritrol	-	Inhibidores de proliferación celular	Isoda y Nakahara, 1997
Ramnolipidos	<i>P. aeruginosa</i>	Bioinsecticida	Silva <i>et al.</i> , 2015
Lipopéptidos	<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Biopesticida	Ghribi <i>et al.</i> , 2011

2.2 Producción de biosurfactantes

Los biosurfactantes se producen a partir de microorganismos como las bacterias, levaduras y hongos filamentosos mediante procesos de fermentación. Las bacterias son los microorganismos que han sido más estudiados; entre ellos se encuentran los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus*; seguido por levaduras como *Candida lipolytica*, *Candida glabrata*, *Candida sphaerica*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida bombicola* (*Starmerella bombicola*) y finalmente algunos hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* y *Cunninghamella echinulata* han reportado tener capacidad biosurfactante, sin embargo, no han sido tan estudiados como los demás microorganismos.

La mayoría de los estudios para la producción de BS son en fermentación sumergida (Fms). Sin embargo, la Fms presenta como principal problema la formación de espuma durante el proceso de producción, la cual interfiere negativamente tanto en el propio proceso como en el producto. Para solventar este problema, es necesario aplicar algunas estrategias que podrían implicar un mayor coste de producción (Costa *et al.*, 2018). Alternativamente, los BS también son producidos por fermentación en estado sólido (FES) y cada vez han ido ganando importancia ya que mediante esta estrategia no se producen espumas y al igual que la Fms se pueden aprovechar residuos y sustratos de bajo coste, sin embargo, es necesario explorar y optimizar el proceso para mejores resultados.

El mercado global de los BS fue valuado por US\$3.99 billones en el 2016, y se estima que para el 2022 alcance valores de hasta US\$5.52 billones, con un incremento del 5.5 % por año (Wang *et al.*, 2020). En la actualidad existen algunas empresas alrededor del mundo dedicadas a la producción de BS y/o productos con BS, entre ellas se encuentra la empresa Kao Co. Ltd en Japón, MG Intobio Co. Ltd en Corea del Sur, Lipofabrik y el grupo Soliance en Francia, Ecover en Bélgica y Apollo Biolife en India enfocadas a los soforolípidos; las empresas Iwata Chemical Co. Ltd en Japón, MG Intobio Co. Ltd en Corea de Sur, AGAE Techologies LLC en los Estados Unidos de América enfocadas a ramnolípidos y la empresa Wako Pure Chemical Industries en Estados Unidos de América enfocado a Surfactinas (Sharma y Oberoi, 2017).

3. Producción de Soforolípidos

Hoy en día los SLs han ido ganando gran interés, tanto para investigadores como para la industria, por el potencial que tienen como biosurfactantes (Van Bogaert *et al.*, 2011). Este tipo de biosurfactante puede ser producido por diferentes microorganismos. La cepa más estudiada es la levadura *Starmerella bombicola*, la cual fue aislada en 1970 por Spencer *et al.*, (1970) de la miel de abejas, es considerada como no patógena y se habían reportado rendimientos de 400 g L⁻¹ en procesos de Fms (Pekin *et al.*, 2005), si bien recientemente Wang *et al.* (2019) reportaron rendimientos de 1,146 g L⁻¹.

Los SLs son compuestos formados por una parte hidrófila, constituida por un disacárido (soforosa), unida a una parte hidrófoba, la cual es un ácido graso de cadena larga (Dolman *et al.*, 2017). Se producen dos tipos de SLs: ácidos y lactónicos, la variación entre ellos se encuentra en la acetilación y la lactonización de la soforosa (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019). Otra diferenciación entre SLs se encuentra en la cadena del ácido graso, que puede ser de 16 o 18 átomos de carbonos y contener una o más cadenas insaturadas (0, 1 o 2 dobles enlaces) en el grupo hidroxilo (en la posición terminal o subterminal) (Van Bogaert *et al.*, 2011). A continuación, la Figura 1.3 descrita por Jiménez-Peñalver *et al.*, (2016), muestra la configuración de los dos diferentes tipos de moléculas que se producen por *S. bombicola*.

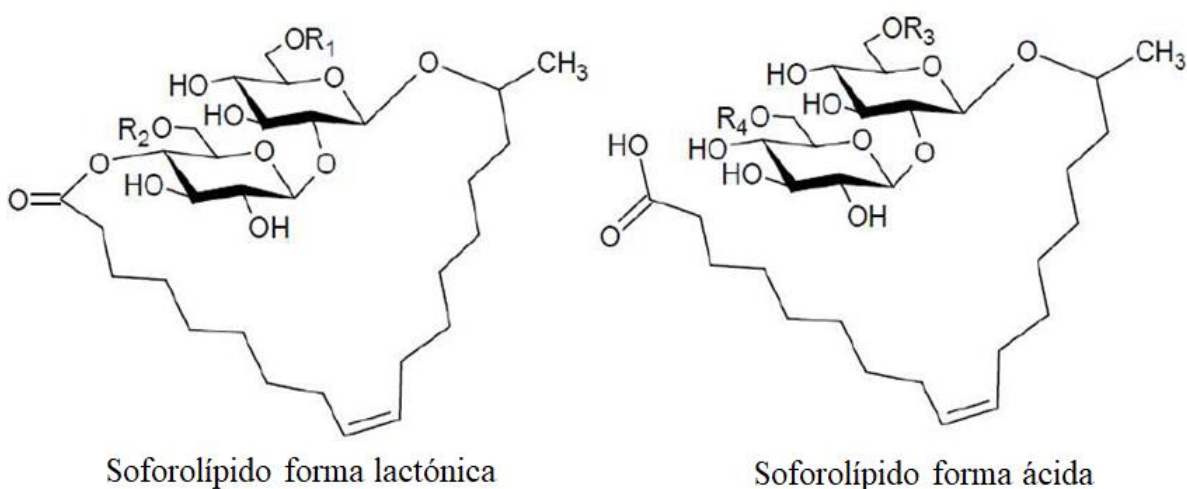


Figura 1.3. Estructura sofrolípidos producidos por *Starmerella bombicola* (R1, R2, R3 y R4 pueden ser un hidrógeno o un grupo acetilo).

Para la formación de SLs es necesario que el medio de fermentación contenga una fuente de carbono tanto hidrofílica como hidrofóbica. La síntesis de SLs empieza cuando las células entran en la fase estacionaria, una vez que el nitrógeno es consumido (Davila *et al.*, 1992). El proceso (Figura 1.4) empieza con la hidroxilación de los ácidos grasos. Una lipasa extracelular hidroliza los ácidos grasos, cuando en el medio de cultivo hay triglicéridos los cuales son consumidos por las células; si en el medio no están presentes los ácidos grasos, éstos se formarán a partir de acetil-CoA derivado de la vía de glucólisis. La hidroxilación de los ácidos grasos es realizada por el citocromo monooxigenasa P450, la cual forma una cadena corta junto con NADPH citocromo reductasa P450. Después de la hidroxilación de los ácidos grasos, dos moléculas de UDP-glucosa se involucran en la reacción y se forma la glucosa para la síntesis de los SLs durante la glucogénesis. Finalmente participa una acetiltransferasa provocando la acetilación de la soforosa, dando a lugar a los SLs de forma acetilada o una lactonización, catalizada por una lactona esterasa, que da a lugar a los SLs de forma lactónica (Van Bogaert *et al.*, 2011; Kulakovskaya y Kulakovskaya 2013).

Los SLs son biosurfactantes de baja capacidad espumante con alta detergencia, reductores de la tensión superficial, presentan muy baja toxicidad y son rápidamente biodegradables en comparación con los surfactantes de síntesis química, lo que los hacen ambientalmente sostenibles (Hirata *et al.*, 2009). Según la estructura, sus propiedades varían; por ejemplo, los SLs de forma lactónica son más hidrofóbicos y son mejores reductores de la tensión superficial en comparación con los SLs ácidos, mientras que estos últimos prestan mejor formación de espuma y solubilidad acuosa (Jadhav *et al.*, 2019).

Estos compuestos han presentado resultados prometedores para ser utilizados como emulsificantes de alimentos (Gaur *et al.*, 2019), germicidas (Morya *et al.*, 2013), agentes anticancerígenos (Rashad *et al.*, 2014), para remover metales pesados de residuos tóxicos de minería (Arab y Mulligan, 2018), como agentes antimicrobianos para formular productos de higiene oral (Elshikh *et al.*, 2017), para productos de limpieza (Joshi-Navare *et al.*, 2013), entre algunos otros.

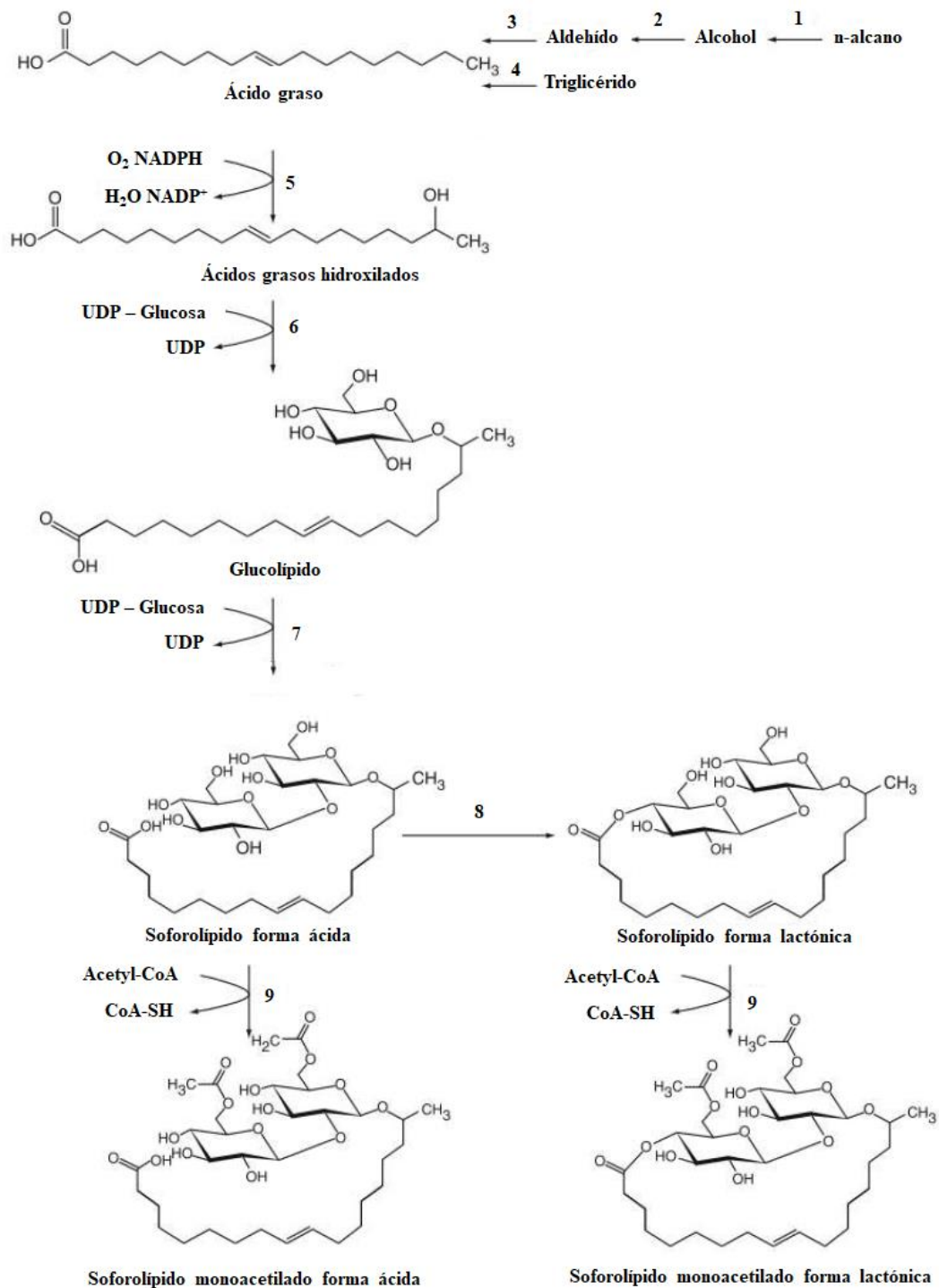


Figura 1.4 Biosíntesis de Soforolípidos: (1) citocromo P450 monooxigenasa, (2) alcohol-deshidrogenasa, (3) aldehído-deshidrogenasa, (4) lipasa, (5) citocromo P450 monooxigenasa, (6) glucosiltransferasa I, (7) glucosiltransferasa II, (8) lactonesterasa, (9) acetiltransferasa. Fuente: Jiménez-Peñalver, 2017.

3.1 Producción de soforolípidos por fermentación sumergida

La fermentación sumergida (Fms) es el proceso el cual se lleva a cabo por un cultivo de microorganismos en un medio líquido suplementado con nutrientes y sustratos para la producción de diferentes metabolitos de interés (Renge *et al.*, 2012). El método más reportado en literatura para la producción de SLs es mediante fermentación sumergida. En el proceso, las materias primas (sustratos y nutrientes) y el método para la recuperación de los compuestos (separación y purificación) tiene una influencia significativa en el coste final de los bioproductos. Por lo que, para la producción de SLs, el uso de recursos renovables naturales como lo son residuos y efluentes en lugar de los sustratos convencionales (glucosa y ácido oleico como fuente hidrofílica e hidrofóbica respectivamente) pueden ser una alternativa viable enfocada a una economía circular (Wang *et al.*, 2018).

En el análisis de literatura muestra 52 trabajos analizados realizados entre los años 1998 y 2019 se presenta en la tabla 1.2 (Jiménez *et al.*, 2019). En algunos de los experimentos en los que se han utilizado residuos o sustratos de bajo coste para la producción de SLs por Fms. India y Estados Unidos de América son los países con mayores publicaciones, seguido por China y Brasil. La cepa que ha sido más utilizada es *Starmerella bombicola* ATCC 2214 (86% de las referencias analizadas), lo que concuerda con lo reportado por Van Bogaert *et al.*, (2011) como una de las cepas con mayores rendimientos de producción de SLs. Mientras que las cepas *Candida albicans* O-13-1, *Candida antarctica*, *Cunninghamella echinulate* y *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52T son las menos reportadas.

De los experimentos analizados, reportados en los 52 trabajos analizados, el 67% las fermentaciones se realizaron de manera discontinua (batch), el 29% en fermentación por lote alimentado (fed-batch) y dos experimentos en fermentación continua (4%). El volumen del medio de fermentación oscila entre los 0.45 y los 8 L siendo la escala más analizada por debajo de los 0.1 L. Este hecho enfatiza la necesidad de investigar el escalado de la producción de SLs a partir de sustratos de bajo coste o efluentes, así como el proceso posterior de recuperación, el cual ha sido muy poco estudiado a escala laboratorio. En el caso de las fuentes de carbono y nitrógeno, como sustrato hidrofílico se utilizó glucosa en el 55% de los experimentos, seguido de melaza de caña de azúcar (12%), el cual es un subproducto de la industria azucarera. La mayor parte de las investigaciones se centran en reemplazar el

ácido oleico por otros aceites, subproductos o desechos más baratos. En este sentido, se han utilizado aceites vegetales como de coco, maíz, jatropha, neem, oliva, palma, girasol, karanja, mango y soja. Las grasas y aceites animales se han utilizado en menor medida; por ejemplo, Maeng *et al.*, en el 2018 estudiaron la producción de SLs por *Candida bombicola* usando aceite de caballo y demostraron que es un sustrato novedoso y eficiente para producir soforolípidos de alta calidad y alto rendimiento. Algunos de estos son aceites comestibles. Aunque su coste puede ser más bajo que el ácido oleico puro, su uso en otras aplicaciones que no sean alimentos y/o piensos deberían de ser evitados por cuestión de sostenibilidad.

Otro grupo de sustratos utilizados corresponde a efluentes residuales como aguas residuales lácteas y derivados de la leche, residuos de aceite de soja, torta de aceite de girasol y residuos de aceite de cocina. También se han usado sustratos hidrofóbicos puros tales como ácidos grasos (por ejemplo, ácido esteárico).

En la mayoría de las investigaciones, el medio líquido se complementa con macronutrientes, principalmente de extracto de levadura, urea y fosfato y sales de sulfato, Na, K o Mg y en algunos casos, también se agregan oligoelementos (Fe, Mn, Zn) como sales. Daverey y Pakshirajan (2009) demuestran que la melaza de caña de azúcar se puede utilizar como fuente de carbono y nitrógeno hidrofílicos, sustituyendo el uso de glucosa y extracto de levadura en los procesos Fms, reduciendo así considerablemente los costes.

En cuanto a los rendimientos de producción de SLs, en los experimentos de fermentación discontinua se reportan valores que se encuentran entre 2.2 y 62 g L⁻¹ en procesos que van desde las 72 hasta las 240 h (principalmente alrededor de 200 h). Las producciones inferiores a 15 g L⁻¹ representan el 25% de los experimentos. La producción máxima fue (62 g L⁻¹) utilizando *Starmerella Bombicola* ATCC 22214 con aguas residuales lácteas y aceite de soja (10% v/v) y glucosa (Daverey y Pakshirajan, 2011). En algunos casos se han implementado algunas estrategias para aumentar la producción, sin embargo, no es muy rentable, ya que implica un consumo mayor de energía. Como es el caso de Liu *et al.*, (2016) que pretrataron la paja de arroz mediante explosión microtérmica y tratamiento con celulasas para liberar el carbono hidrofílico, logrando una producción de 53 g L⁻¹ con ácido oleico como fuente de carbono hidrofóbico. En otras investigaciones, se han utilizado ultrasonidos durante la fermentación para aumentar la permeabilidad celular de *S. Bombicola* ATCC 22214 y, de

esta manera, mejorar la absorción del sustrato, lo que permitió un aumento del 23% en la producción de SLs (Maddikeri *et al.*, 2015). Recientemente, Kaur *et al.*, (2019) realizaron hidrólisis enzimática de residuos de alimentos (100 g L⁻¹ de glucosa y 2.4 g L⁻¹ de amino nitrógeno libre), y obtuvieron una producción 115.2 g SL L⁻¹ mediante el proceso de fermentación alimentada.

El valor de producción más bajo (2.2 g L⁻¹) fue reportado por Accorsini *et al.*, (2012) mediante fermentación discontinua utilizando la cepa *Candida Antártica* en un medio con glucosa y glicerol y en paralelo al sustituir el glicerol por aceite de soja obtuvieron una producción de 13.86 g SL L⁻¹.

Maddikeri *et al.*, (2015) compararon los rendimientos obtenidos mediante fermentación discontinua y por lote alimentado, en donde reportaron un incremento del 140% cuando se realizó la fermentación por lote alimentado La producción más alta (1,146 g L⁻¹) fue utilizando residuos alimenticios hidrolizados como sustrato y alimentando el reactor con glucosa concentrada en el momento en el que disminuyeron los azúcares (Wang *et al.*, 2019). Por otro lado, Pekin *et al.* (2005) usando como sustratos glucosa y aceite de maíz y sustituyendo la glucosa cuando se consumía, por una solución de miel obtuvieron 400 g L⁻¹. Finalmente, por fermentación continua con *S. bombicola* se han utilizado aguas residuales lácteas y grasas como sustratos, sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron de 1 a 2 g L⁻¹ de SLs (Daverey y Pakshirajan, 2015). Mientras que, en otro estudio, al utilizar hidrolizados derivados del bagazo de sorgo dulce, fibra de maíz y aceite de soja los rendimientos fueron de 84.6 g L⁻¹ (Samad *et al.*, 2014).

A pesar de que la mayoría de los estudios para la producción de SLs son mediante Fms, existen fenómenos que pueden afectar el proceso y el producto final; por ejemplo, la aireación y agitación forzada ocasionan la formación de grandes cantidades de espuma, y esto provoca que el microorganismo se acumule dentro de la espuma y se pierdan células viables, se reduce la eficiencia de la transferencia de gases en el sistema y se aumenta el riesgo de contaminación (Krieger *et al.*, 2011).

Tabla 1.2. Producción de SLs por fermentación sumergida con residuos como sustratos o materiales de bajo coste.

Microrganismo	Sustratos hidrofílicos	Sustratos hidrofóbicos	Suplementos	Escala del reactor (L)	Periodo del proceso (h)	Condiciones de fermentación Agitación (rpm)/ T (°C) /pH	Aeración (L min ⁻¹) / Punto fijo de O ₂	Producción SLs (g L ⁻¹)	Referencia
Fermentación Discontinua									
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de girasol	Extracto de levadura, urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	n.d	210/30/4.5	-	12	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (MTCC1910)	Glucosa	Aceite de girasol	Extracto de levadura, urea y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L medio	192	200/30/4.5	-	41.6	Jadhav <i>et al.</i> , 2019
<i>Candida albicans</i> O-13-1	Glucosa	Ácido oleico	Extracto de levadura y peptona	5 L con 3L de medio	70	450/30/6	8	477	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de jatropha	Extracto de levadura, urea y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	n.d	210/30/4.5	-	6	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de Karanja	Extracto de levadura, urea, sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	n.d	210/30/4.5	-	7.7	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Residuo de aceite freído	Extracto de levadura y urea	3.3L con 1L de medio	n.d	400/30/n.d.	-	34	Shah <i>et al.</i> , 2007
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> CGMCC 1576 ^a	Paja de Arroz pretratada	Ácido Oleico	Extracto de levadura, y sales de K, Na y Mg	n.d.	n.d	n.d/30/n.d.	-	53	Liu <i>et al.</i> , 2017
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Residuo de aceite de cocina		5 L con 3.5 L de medio	22	130/30/n.d.	2.8	50	Fleurackers, 2006
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Grasa animal	Licor de maíz fermentado, urea y sales de Na y K	10L con 8L de medio	72	400/30/3.4 controlado	4	120	Deshpande <i>et al.</i> , 1995

I. Introducción

<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de Jatropha	Extracto de levadura, peptona y extracto de malta	0.45L	96-120	180/28/4	-	15.25	Joshi <i>et al.</i> , 2013
<i>Cyberlindnera samutprakarnensis</i> JP52T	Glucosa	Aceite de palma	Extracto de levadura y sales de Na, Mg y K	n.d.	168	200/30/5.5	-	n.d.	Poomtien <i>et al.</i> , 2013
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de girasol	Extracto de levadura, urea y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	12.3	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Residuos freídos de aceite de girasol	Extracto de levadura, urea y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	4.26	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glicerol	Aceite de girasol	Extracto de levadura, urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	6.61	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glicerol	Residuos freídos de aceite de girasol	Extracto de levadura, urea y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L media	200	210/30/4.5	-	3.97	Wadekar <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de girasol	Extracto de levadura, urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	11.98	Wadekar <i>et al.</i> , 2012b
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de Jatropha	Extracto de levadura, y urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	6.00	Wadekar <i>et al.</i> , 2012b
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de Karanja	Extracto de levadura, urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	7.66	Wadekar <i>et al.</i> , 2012b
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de Neem	Extracto de levadura, urea, y sales de Na, Mg, K y Fe	0.250L con 0.05L de medio	200	210/30/4.5	-	2.63	Wadekar <i>et al.</i> , 2012b
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	-	Torta de aceite de girasol y aceite de soja crudo	Peptona y amonio, y sales Na, Mg, Ca y Mn	0.250L con 0.05L de medio	96	180/30/7.8	-	41.2	Rashad <i>et al.</i> , 2014

I. Introducción

<i>Candida antarctica</i>	Glucosa	Aceite de soja	Extracto de levadura y sales de K, Na y Mg	0.5 L con 100 mL de medio	168	200/30/5.78	-	13.86	Accorsini <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida antarctica</i>	Glucosa	Glicerol	Extracto de levadura y sales de K, Na y Mg	0.5 L con 100 mL de medio	168	200/30/5.78	-	2.20	Accorsini <i>et al.</i> , 2012
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aguas residuales lácteas y aceite de soja (10% v/v)	Extracto de levadura	0.25 L con 50 mL de medio	240	200/30/6	-	62	Daverey y Pakshirajan, 2011
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de caña de azúcar	Leche en polvo deshidratada, grasa (ghee) y aceite de soja	-	50 ml del medio	192	180/30/6	-	38.76	Daverey y Pakshirajan, 2009
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Leche en polvo deshidratada, grasa (ghee) y aceite de soja	Extracto de levadura	50 ml del medio	192	180/30/6	-	29.49	Daverey y Pakshirajan, 2009
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Suero desproteini-zado, glucosa	Ácido oleico	Extracto de levadura	0.250L con 0.05L de medio	192	200/30/6	-	23.29	Daverey y Pakshirajan, 2010
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Suero desproteini-zado, glucosa	Ácido oleico	Extracto de levadura	3L con 1L de medio	192	350/30/6	2	25.54	Daverey y Pakshirajan, 2010
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Suero desproteini-zado, glucosa	Ácido oleico	Extracto de levadura	3L con 1L de medio	192	350/30/6	2	33.32	Daverey y Pakshirajan, 2010
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de caña de azúcar	Aceite de soja	-	0.250L con 0.05L de medio	120	180/30/6	-	23.25	Daverey y Pakshirajan, 2009
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de caña de azúcar	Aceite de oliva	-	0.250L con 0.05L de medio	120	180/30/6	-	18.96	Daverey y Pakshirajan, 2009
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de caña de azúcar	Aceite de girasol	-	0.250L con 0.05L de medio	120	180/30/6	-	17.46	Daverey and Pakshirajan, 2009

I. Introducción

<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Desechos de aceite de cocina	Extracto de levadura y urea	2.5 L con 2.25L de medio	240	300/30/3	2	21.5 con ultrasonido	Maddikeri <i>et al.</i> , 2015
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Residuos de aceite de cocina	Extracto de levadura y urea	2.5 L con 2.25L de medio	240	300/30/3	2	24.5 con ultrasonido	Maddikeri <i>et al.</i> , 2015
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Licor de maíz	Residuo de aceite de soja	Sales de Na, K, Mg, Fe, Mn y Zn	0.250L con 0.1L de medio	96	150/28/5	-	4	Andrade <i>et al.</i> , 2014
Fermentación por lote alimentado									
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa/ Licor de maíz	Aceite de colza	KH ₂ PO ₄ 1 g L ⁻¹ , (NH ₄) ₂ SO ₄ 4 g L ⁻¹ , MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 L con 2.5L de medio	125	200/25/3.5 controlado	1.25	Aprox. 200	Chen <i>et al.</i> , 2019
<i>Candida bombicola</i>	Glucosa	Aceite de caballo	Extracto de Levadura, y sales Na, Mg, K, Ca	5 L	168	500/25/4.0 a4.5 controlado	1.1	71.7	Maeng <i>et al.</i> , 2018
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de caña de azúcar	Aguas residuales lácteas 07 mg L ⁻¹ grasa y aceites	Extracto de levadura	3L con 1L de medio	120	300/30/5.9	1.5	1 to 2	Daverey and Pakshirajan, 2015
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Aceite de maíz	Extracto de levadura y urea	3L con 1.5L de medio	432	variable O ₂ /25/n.d.	25-35 %	400	Pekin <i>et al.</i> , 2005
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glicerol	Ethyl-sojato (transesterificación de aceite de soja)	Extracto de levadura y urea	2.5L con 2L de medio	168	700/26/6	2	42	Ashby <i>et al.</i> , 2006
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glicerol	Propyl-sojato (transesterificación de aceite de soja)	Extracto de levadura y urea	2.5L con 2L de medio	168	700/26/6	2	18	Ashby <i>et al.</i> , 2006
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glicerol	Methyl-sojato (transesterificación de aceite de soja)	Extracto de levadura y urea	2.5L con 2L de medio	168	700/26/6	2	46	Ashby <i>et al.</i> , 2006

I. Introducción

<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Ácidos grasos de sebo	Extracto de levadura y urea	0.5L con 0.11-0.14L de medio	240	200/30/n.d.	20–30mM O ₂ /(L·h)	120	Felse <i>et al.</i> , 2007
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Ácidos grasos del coco	Extracto de levadura y urea	0.5L con 0.11-0.14L de medio	240	200/30/n.d.	20–30mM O ₂ /(L·h)	40	Felse <i>et al.</i> , 2007
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melaza de soja	Ácido oleico	Extracto de levadura y urea	12	120	700/26/6	2	21	Solaiman <i>et al.</i> , 2004
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Glucosa	Residuos de aceite de cocina	Extracto de levadura y urea	2.5 L con 2.25L de medio	240	300/30/3	2	51 sin ultrasonido/ 55.6 con ultrasonido	Maddikeri <i>et al.</i> , 2015
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Metanol	Glicerol- Ácido Oleico	10 g Extracto de levadura /l y 1 g urea/l	0.5 L con 0.1L de medio	168	700/26/6	1	5.6	Ashby y Solaiman, 2010
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)		Glicerol- Ácido Oleico	10 g Extracto de levadura /l y 1 g urea/l	0.5 L con 0.1L de medio	168	700/26/6	1	12.7	Ashby y Solaiman, 2010
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Suero desproteinizado	Aceite colza	4 g Extracto de levadura/l	30 L	280	25/4.7 inicial, 3.3 durante la fase de producción	-	280	Daniel <i>et al.</i> , 1998
Fermentación continua									
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Hidrolizados derivados del bagazo de sorgo dulce y maíz fibra	Aceite de soja	Extracto de levadura	50 ml del medio	240	120/25	-	84.6	Samad <i>et al.</i> , 2014
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC 22214)	Melazas de caña de azúcar	Aguas residuales lácteos	Extracto de levadura	3L con 1L de medio	40	300/30/5.9	1.5	1 to 2	Daverey y Pakshirajan, 2015

**Wickerhamiella domercqiae* CGMCC 1576 después fue reclasificada como *S. bombicola* CGMCC 1576 (Claus y Van Bogaert 2017).

3.2 Una alternativa para producir SLs: Fermentación en estado sólido

Una de las sugerencias para mejorar la producción de SLs (reducir costes) es usar residuos industriales como materia prima en la fermentación (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019). Siendo aquí en donde la fermentación en estado sólido (FES) es una alternativa con un potencial interesante, ya que mediante este proceso se puede hacer uso de residuos sólidos pudiendo ser aprovechados como sustratos (Wang *et al.*, 2018). Este proceso ha sido investigado para la producción de diferentes productos de alto valor agregado como enzimas, antibióticos, biocombustibles (Botton *et al.*, 2018), biosurfactantes (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2016b, 2016a), ácidos orgánicos (Mata-Gómez *et al.*, 2015), compuestos aromáticos (Martínez *et al.*, 2017), biopesticidas (Rodríguez *et al.*, 2019), entre otros.

La FES se define como el proceso en donde cultivos microbianos crecen sobre partículas sólidas con cantidades mínimas de agua libre (Mata-Gómez *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2000). Es importante mencionar que estas matrices deben contener la humedad necesaria para apoyar el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (Pandey, 2003a; Singhania *et al.*, 2009).

La FES consta de tres fases heterogéneas, sólida, líquida y gaseosa (Figura 1.5), las cuales son esenciales y ofrecen grandes beneficios para el desarrollo de bioprocesos y productos de interés (Thomas *et al.*, 2013). La fase sólida es la matriz o el soporte utilizado en el sistema, la fase líquida constituye el agua contenida en la matriz y finalmente la fase gaseosa es el gas que se encuentra en circulación continua entre los poros (Chen y Xu 2004). Por lo tanto, una mejor disponibilidad de nutrientes y una eficiente transferencia de oxígeno en el sistema permitirá que los microorganismos tengan una producción de biomasa y buenos rendimientos de metabolitos.

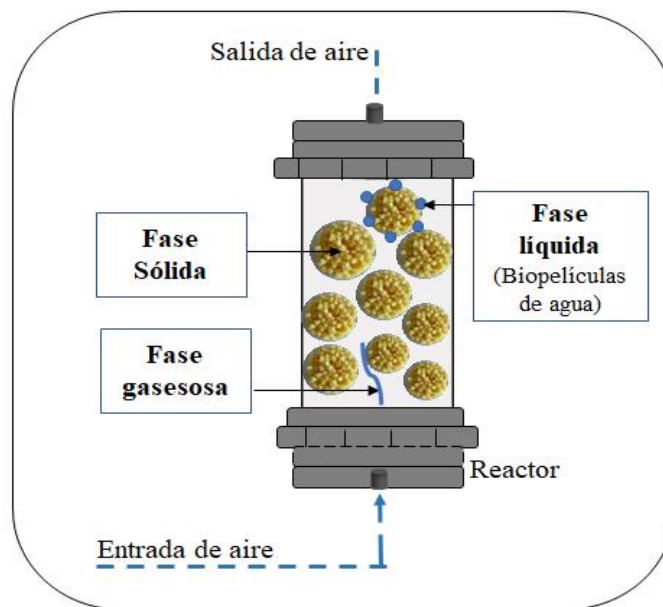


Figura 1.5. Esquema de las fases de fermentación en estado sólido.

El tipo de soporte representa un factor muy importante para el crecimiento de los microorganismos (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2013; Manpreet *et al.*, 2005). Existen dos tipos de sistemas FES según la naturaleza del soporte usado. Aquellos en los que los materiales biológicos actúan como soportes físicos y pueden ser simultáneamente una fuente de carbono o nutrientes y, por otro lado, los soportes inertes que actúan solo como soportes físicos, a los cuales, es necesario agregar nutrientes para apoyar el crecimiento microbiano (Barrios-González, 2012; Chen, 2013). Se han evaluado una gran variedad de materiales como soportes sólidos para producir diferentes bioproductos comercializables empleando diferentes sustratos, los cuales se ilustran en la Tabla 1.3. La mayoría de ellos son residuos agrícolas o de la industria alimentaria, en su mayoría materiales lignocelulósicos los cuales, presentan excelentes resultados. Por ejemplo, el bagazo de la caña de azúcar se ha utilizado como soporte para producir diferentes metabolitos. Sella *et al.*, 2009, lo utilizaron para la producción de esporas en diferentes tipos de biorreactores y Martínez *et al.*, en el 2018 lo utilizaron para producir aromas. Otros residuos agroindustriales fueron evaluados por Buenrostro-Figueroa *et al.*, (2013) para producir elagitanasas utilizando mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar y cáscara de coco. Por otro lado, Peñamaría *et al.*, 2017 compararon materiales de diferente naturaleza (biológicos e inertes) como soportes sólidos mezclados

con aceites y sacarosa para la producción de lipasas, la cáscara de trigo y cacao funcionaron mejor que la vermiculita.

Por otro lado, el uso de soportes inertes permite manipular el medio de cultivo y evitar que la naturaleza del soporte afecte el proceso (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995). Es muy importante que la estructura de los soportes permita la transferencia de oxígeno necesario para que los microorganismos aprovechen al máximo los nutrientes de los sustratos. En la tabla 1.3 se muestran algunos ejemplos de soportes inertes en donde el más estudiado ha resultado ser las espumas de poliuretano. Por ejemplo, Mata-Gómez *et al.*, (2015) y De la Cruz *et al.*, (2015) utilizaron espumas para producir enzimas. Además, Del Campo *et al.*, (2015) evaluaron estrategias de mezcla de soportes para producir esterasas / lipasas; la perlita, la vermiculita, la espuma de poliuretano y la fibra de vidrio resultaron con valores inferiores a $20 \text{ kg}^{-1} \text{ U}$, sin embargo, la mezcla de materiales (espumas de fibra de vidrio y poliuretano) aumentó la producción de enzimas con valores superiores a 50 U kg^{-1} .

Tabla 1.3. Ejemplos de algunos soportes usados en FES para diferentes bioproductos

Soporte	Micorganismo	Sustratos	Producto	Autor
Paja de Trigo	<i>Starmerella bombicola</i>	Residuo de winterización del aceite de girasol Melazas de remolacha azucarera	Soforolípidos	Jiménez-Peñalver <i>et al.</i> , 2016
Bagazo de caña de azúcar, cascara de coco, mazorcas de maíz y tallos de candelilla	<i>Aspergillus niger</i>	Extracto puro de elagitanasa	Elagitanasa	Buenrostro-Figueroa <i>et al.</i> , 2013
Bagazo de caña de azúcar	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Melazas de soja Inductor de esporulación Sales	Esporas	Sella <i>et al.</i> , 2009
Virutas de Madera	<i>Phanerochete chrysosporium</i> BKM-F-1767	Solución inductora de enzimas	Manganeso-Peroxidasa	Rodríguez Couto, <i>et al.</i> , 2002
Espumas de poliuretano	<i>Aspergillus. niger</i>	Ácido Tánico. Medio mineral Medio DSM97	Tanasas	Mata-Gómez <i>et al.</i> , 2015
Perlita, Vermiculita, Poliuretano y fibras de vidrio	<i>Natronococcus sp.</i> <i>TC6, Halobacterium sp. NRC-1</i> y <i>Haloarcula marismortui</i>		Esterasas/Lipasas	Del Campo <i>et al.</i> , 2015
Espumas de poliuretano	<i>Aspergillus. niger</i>	Solución de elagitaninos, Medio Czapek Dox	Ácido elágico	De la Cruz <i>et al.</i> , 2015

Mazorcas de maíz, Luffa y esponjas de celulosa	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aceite de castor, Tween 80, base nitrogenada de levadura y aminoácidos	Aromas	Try <i>et al.</i> , 2017
Bagazo de caña de azúcar	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (ATCC 10022)	Solución nutriente y melazas de caña de azúcar	Aromas	Martínez <i>et al.</i> , 2017
Digestato	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	Biopesticidas	Rodríguez <i>et al.</i> , 2019

Gracias a los resultados, este proceso ha ganado un gran interés para muchas investigaciones, ya que presenta ciertas ventajas sobre la fermentación sumergida (Fms); algunas de ellas incluyen que se pueden utilizar materiales de diversa naturaleza (biológicos o inertes) como sustrato o como soporte y de esta manera se pueden valorizar residuos agro-industriales y de otras industrias, fácil preparación y manipulación de la mezcla sólida, presenta una menor probabilidad de contaminación, bajo condiciones óptimas se pueden obtener mayores rendimientos y mejores características del proceso, se pueden establecer diversas estrategias para aumentar mejoras en los rendimientos, los productos son más fáciles de recuperar, según su naturaleza, los sólidos residuales pueden ser utilizados para la producción de otros compuestos como biogás o compost, presenta menores requerimientos de energía por lo que los costes de producción son más bajos y genera menores cantidades de aguas residuales (López-Pérez y Viniegra-González, 2016; Ooijkaas *et al.*, 2000).

3.3 Producción de soforolípidos por Fermentación en estado sólido

Bajo la perspectiva de la FES, entre las investigaciones existentes, la mayoría se han centrado en la producción de glicolípidos (SLs y RLs) y lipopéptidos, especialmente surfactinas. Estos biosurfactantes son, de hecho, los de mayor interés industrial. La FES se ha señalado recientemente como una alternativa prometedora para la producción de SLs a partir de residuos, sin embargo, es necesario optimizar el proceso para aumentar el rendimiento (Wang *et al.*, 2018).

Con el fin de buscar nuevas vías para la producción de SLs y sus aplicaciones, recientemente, algunos estudios se centran en la producción de estas moléculas por FES, utilizando desechos de la industria alimentaria y mostrando resultados prometedores para explorar más a fondo (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2018, 2016; Nooman *et al.*, 2017; Rashad *et al.*, 2014).

A partir de una revisión de la literatura, se han encontrado ocho artículos publicados que tratan sobre la producción de SLs mediante FES (Tabla 1.4). Las investigaciones se han llevado a cabo en tres grupos diferentes de investigación en España, India y Egipto. El primer reporte de FES se publicó en el 2012 (Parekh *et al.*, 2012), mientras que el primer trabajo en Fms con sustratos de bajo coste fue en 1995 (Deshpande *et al.*, 1995), por lo que la producción de SLs por FES es relativamente una tecnología joven.

Jiménez-Peñalver *et al.*, (2016) utilizaron aireación forzada y encontraron una tasa óptima de aireación de $3.0 \times 10^{-4} \text{ L g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para la producción de SLs. En una sola investigación (Rashad *et al.*, 2014) se añadieron suplementos (peptona, amoníaco y minerales), lo cual es muy relevante ya que en comparación con los procesos Fms el 90% de los experimentos utilizaron algún tipo de suplemento.

Parekh y Pandit (2012) produjeron SLs utilizando glucosa y ácido oleico como sustratos (mezclados con salvado de trigo) y obtuvieron un rendimiento máximo de SLs de 0.180 g por g de sustrato en el día 8 de fermentación. Se obtuvieron rendimientos similares cuando el ácido oleico fue sustituido por grasa de grano de mango como fuente de carbono hidrofóbico (Parekh *et al.*, 2012). Curiosamente, el rendimiento de SLs fue 3 veces mayor que el obtenido por Fms usando la misma cantidad de grasa de grano de mango. Esto confirma que la FES es una mejor tecnología para el uso de sustratos hidrófobos sólidos. Los SLs también se han producido a partir del residuo de winterización del aceite de girasol (una torta de prensado residual de la industria del procesamiento de aceite de girasol y maíz) el mayor rendimiento (0.25 g por g de sustrato) se obtuvo cuando se combinó con melaza de remolacha azucarera (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2016). Rashad y col. (2014) utilizaron un medio basado en una mezcla de una torta de aceite de girasol y aceite de soja humedecido con un medio nutriente. Estos autores obtuvieron un rendimiento máximo de 0.22 g por g de sustratos en el día 8 al usar el mismo método de extracción que el utilizado por Parekh y Pandit (2012) y Parekh *et al.*, (2012), señalando que la extracción con acetato de etilo seguido de una purificación adicional con n-hexano presenta mejores resultados que la extracción con metanol. Jiménez-Peñalver *et al.*, (2016; 2018) también realizaron la extracción con acetato de etilo y n-hexano. Nooman *et al.*, 2017 produjeron SLs con torta de aceite de girasol y la

extracción se realizó con metanol seguido de acetato de etilo obteniendo un rendimiento de 0.244 y 0.483 g por g de sustrato mixto, respectivamente.

Los SLs también se han producido a partir de ácido esteárico (C18:0) como fuente de carbono hidrofóbica. Parekh *et al.*, 2012, comparó la producción de SLs bajo Fms y FES obteniendo una conversión de sustrato 2.5 veces mayor en SLs por FES (0.085 g por g de sustratos, día 10). Jiménez-Peñalver *et al.*, (2018) produjeron SLs a partir de ácido esteárico y melaza de remolacha de azúcar, utilizando espumas de poliuretano como material de soporte. Este es el único estudio que utiliza un material inerte para la producción de SLs por FES.

En cuanto a la escala de producción la mayoría de las investigaciones se han realizado usando bajas cantidades de sustratos (4-100 g). Solamente se ha realizado un estudio en un reactor de lecho empacado de 40 L que constaba de tres bandejas usando paja de trigo y el residuo de winterización del aceite de girasol (Jiménez- Peñalver, 2017). El reactor contenía un total de 2,700 g (soporte y sustratos) en base húmeda (900 g por bandeja), el sistema presentó un rendimiento de SLs de 0.33 g por g de sustrato. Cabe destacar que temperaturas superiores a los 30°C no afectaron la producción de SLs. Finalmente, solamente el mismo autor ha realizado una amplia caracterización de los SLs obtenidos por FES.

Tabla 1.4. Producción de soforolípidos por fermentación en estado sólido

Sustratos (g)	Sustrato hidrofílico	Sustrato hidrofóbico	Suplementos	Soporte Sólido	Rendimiento (g g ⁻¹ sustratos)	Autores
4	Glucosa	Ácido oleico	No	Paja de trigo	0.18	Parekh and Pandit, 2012
4	Glucosa	Grasa de grano de mango	No	Paja de trigo	0.175	Parekh <i>et al.</i> , 2012
4	Glucosa	Ácido esteárico	No	Paja de trigo	0.085	Parekh <i>et al.</i> , 2012
10		Torta de aceite de girasol y aceite de soja	Peptona y sales de amonio, K, Na, Mg, Ca, Mn	No	0.221	Rashad <i>et al.</i> , 2014

45	Melazas de remolacha de azúcar	Residuo de winterización de aceite de girasol	No	Paja de trigo	0.25	Jiménez-Peñalver <i>et al.</i> , 2016
30	Melazas de remolacha de azúcar	Ácido esteárico	No	Espumas de poliuretano	0.211	Jiménez-Peñalver <i>et al.</i> , 2018
2700	Melazas de remolacha de azúcar	Residuo de winterización de aceite de girasol	No	Paja de trigo	0.33	Jiménez-Peñalver 2017
10		Aceite de soja	Peptona y sales de amonio, K, Na, Mg, Ca, Mn	Torta de aceite de girasol	0.483	Nooman <i>et al.</i> , 2017
-	Glucosa	Ácido oleico	No	Digestato	0.02	Cerda <i>et al.</i> 2019

Como podemos observar el uso de residuos sólidos presenta un gran potencial, así mismo cuenta con una serie de ventajas que lo hacen aún más atractivo. Sin embargo, como en todo proceso, existen desventajas que podrían no ser tan favorables con el proceso, a lo cual, sería necesario buscar alguna solución que elimine o minorice el impacto. Entre las ventajas de usar residuos sólidos se encuentran que los costes de producción se pueden reducir, dichos residuos por lo general son baratos y se encuentran disponibles en grandes cantidades, las propiedades de los compuestos podrían no ser alteradas y el proceso es amigable con el ambiente al darle un valor agregado a dichos residuos. Por otro lado, entre las desventajas, se encuentra que, en algunas ocasiones, es necesario realizarle un pretratamiento al sustrato lo cual requiere el uso de energía u otros aditivos, según la aplicación a la que va dirigida se necesitarán técnicas especiales de purificación, la composición del residuo puede variar por cada lote y algunos residuos podrían contener compuestos no deseados o no favorecedores para el proceso o los microorganismos (Krieger *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2018).

3.4 Técnicas para la caracterización de soforolípidos

Las técnicas de caracterización de SLs más utilizadas incluyen: FTIR, ¹H-NMR, HPLC, cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS), microscopía electrónica de barrido, cromatografía de capa delgada, tensión superficial y dilución micelar crítica, siendo la cromatografía líquida la más utilizada. Chen *et al.*, (2019) estudiaron un método para cuantificar las concentraciones y caracterización de petróleo y SLs utilizando resonancia magnética nuclear de bajo campo (LF-NMR), presentando mejores resultados en comparación con los métodos tradicionales.

3.5 Impactos económicos y ambientales

Los aspectos económicos y ambientales por lo general no se tienen en cuenta en los trabajos de investigación, ni cuando los procesos se realizan a escala piloto. De acuerdo con Van Bogaert *et al.*, (2007), el precio de la producción de SLs por Fms depende de los sustratos y la escala de producción, que van de 2 a 5 €/kg. Existen estudios (Ashby *et al.*, 2013) basados en los costes de producción, en donde con un rendimiento de SLs de 100 g L⁻¹ y una producción de 90.7 millones de kg/año, utilizando *S. bombicola*, glucosa y medio de aceite de girasol, el precio se encuentra en US \$2.95/kg. Recientemente, un estudio basado en Fms utilizando residuos de alimentos indicó que el coste operativo de la producción de SLs en cristales es de US \$19.65/kg y en forma concentrada es de US \$19.65/ kg y US \$16.45/kg (Wang *et al.*, 2020).

Así mismo, el hecho de que la producción de SLs sea a partir de subproductos o residuos no garantiza un menor impacto ambiental en comparación con el proceso convencional. En algunas ocasiones es necesario realizar un pretratamiento del sustrato o un proceso posterior más complejo. Si no se utiliza una perspectiva de cero residuos desde el comienzo de la investigación, el proceso más complejo (basado en fuentes de residuos) puede requerir más energía o aumentar las emisiones en comparación con el proceso convencional. Kopsahelis *et al.*, (2018) compararon el impacto ambiental de la producción de SLs y RLs por Fms e identificaron que las emisiones gaseosas, la electricidad y los requerimientos térmicos del proceso son los principales contribuyentes al impacto ambiental; y por otro lado que el proceso de SLs tiene un mayor impacto en comparación con el de los RLs. Baccile *et al.*,

(2016) presentaron un análisis completo del ciclo de vida de la producción de SLs bajo Fms, y demostraron que el principal impacto corresponde al proceso de producción. El proceso de fermentación representa el 90% del impacto de la producción y, curiosamente, el uso de sustratos puros como lo es el aceite de colza y la glucosa contribuye al 47% y 41%, respectivamente. Estos datos refuerzan la idea de centrar la investigación en el uso de sólidos y efluentes residuales (en lugar de sustratos de bajo coste) como fuentes de carbono para la producción de SLs.

Hasta el día de hoy no se han publicado trabajos de investigación relacionados con los costes de producción de SLs bajo FES ni su impacto ambiental. Probablemente y de acuerdo con Krieger *et al.*, 2010, al realizar extracciones del compuesto con solventes orgánicos tendrá una gran importancia en costes e impacto ambiental. De acuerdo con la extracción de SLs en condiciones de laboratorio, se necesita una relación de sustrato: acetato de etilo de al menos 1:1 (w: w) para extraer los SLs de la matriz sólida. El acetato de etilo podría recuperarse y reutilizarse (Ashby *et al.*, 2013), sin embargo, el sólido residual se impregnará con el disolvente, lo que dificultará su eliminación. Una alternativa podría ser secar el sólido para recuperar el solvente y tratar el sólido mediante una digestión anaerobia para intentar darle un valor agregado. Ashby *et al.*, (2013) calcularon que el 19% de los costes de capital están relacionados con la recuperación de solventes. Estos escenarios teóricos para FES deben confirmarse experimentalmente y validarse mediante un análisis técnico-económico y ambiental, lo cual ayudará a definir si el proceso para producir SLs mediante FES es rentable o no.

4. Recuperación de compuestos (*Downstream Processing*)

La etapa de recuperación de compuestos es una parte integral para el desarrollo de cualquier producto, tiene como objetivo recuperar el o los productos con la mínima carga ambiental posible y con costes mínimos ya que el precio final dependerá de las técnicas que se emplean para su extracción y purificación (Gupta *et al.*, 1999; Cuellar *et al.*, 2020).

4.1 Extracción de soforolípidos: Métodos convencionales

La recuperación de SLs al final del proceso se realiza principalmente por métodos convencionales de extracción con solventes, excepto en algunos casos con cristalización directa o cristalización con acetona. La estrategia principal utilizada es la extracción con acetato de etilo, seguido de un lavado final con n-hexano. En la literatura encontrada, la extracción de SLs se realiza para la caracterización y cuantificación del rendimiento del proceso, sin embargo, no se han encontrado estudios que profundicen en la optimización de la extracción con vistas a un proceso industrial.

4.2 Otras alternativas

Los métodos convencionales con solventes para la extracción de SLs tanto en FES como en Fms representan una fuerte inversión e impacto ambiental, lo cual a escala industrial no es conveniente; es por ello que es necesario explorar diferentes tecnologías que permitan la recuperación de los SLs de tal forma que sea amigable con el medio ambiente y una opción económicamente viable.

Dolman *et al.*, en el 2016, desarrollaron una técnica para la recuperación de SLs después del proceso de Fms; el método consta de una separación por gravedad en una columna de asentamiento, el cual logra recuperar hasta un 86% de los SLs producidos. En el 2010, Palme *et al.*, evaluaron la aplicación de ultrasonidos como método de separación, el cual presentó una buena eficiencia para la separación de células y resultados prometedores para la separación de SLs los cuales necesitan ser estudiados con mayor profundidad. Aunque estas tecnologías resultan atractivas para la extracción de SLs, están probadas solamente en Fms y podrían no tener la misma eficiencia o ser aplicados en FES debido a la naturaleza de la matriz de fermentación. Es por ello, que es necesario explorar otras tecnologías que han tenido éxito en FES y que sería interesante evaluar si pudieran ser implementadas para la recuperación de los SLs.

Recientemente han ganado mucho interés para la separación de biocompuestos las tecnologías de sistemas de dos fases acuosas (ATPS, por sus siglas en inglés) y extracción con fluidos supercríticos (FSC) ya que presentan un gran potencial de extracción y son ambientalmente sostenibles. A continuación, se describen estas atractivas alternativas.

4.3 Sistemas de dos fases acuosas

La recuperación de bioproductos generalmente está conformada por una serie de pasos; recuperación, aislamiento, purificación y pulimento; en las cuales, la purificación representa aproximadamente más del 70% de los costes de recuperación (Raja *et al.*, 2011). Aquí es donde los sistemas de dos fases acuosas pueden jugar un rol muy importante ya que con este método se pueden reducir las etapas y por lo tanto los costes de recuperación.

Los ATPS son sistemas de extracción que involucran dos fases acuosas inmiscibles (líquido-líquido). Por lo general los tipos de ATPS más utilizados son polímero-sal, polímero-polímero y etanol-sal, igualmente se han probado con líquidos iónicos y carbohidratos (Veloso *et al.*, 2020).

Estos sistemas han sido aplicados con resultados prometedores para la recuperación y purificación de biomoléculas como lo son anticuerpos, proteínas, enzimas, antibióticos, terpenos, antioxidantes (Rosa *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013; Mejía-Manzano *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2014), entre otros. El uso de ATPS presenta una serie de ventajas, como lo es la baja tensión interfacial, la posibilidad de integrarse a los procesos, una alta selectividad y biocompatibilidad, es muy fácil de operar, no es necesario el uso de equipos y materiales costosos, es escalable y no representa peligro para el medio ambiente (Veloso *et al.*, 2020; Raghavarao *et al.*, 2003).

Para la implementación de ATPS es necesario la selección correcta de las condiciones y los parámetros apropiados que lo van a conformar, como lo son los compuestos que formarán las fases (polímeros, sales, alcoholes, etc), el pH del sistema, la longitud de línea de corte (LLC) la cual permite conocer la composición de las fases en equilibrio y el volumen de la fase (V_R : relación entre la fase superior y la fase inferior formadas) (González-Valdéz *et al.*, 2017). Después de preparar los sistemas y mezclarlos; la separación de fases se realiza por decantación por gravedad o por centrifugación. Las fases se separan y los compuestos deben concentrarse en una de las fases y los contaminantes en la otra (Figura 1.6). En muchos casos, la recuperación y concentración de producto supera el 90% de rendimiento (Raja *et al.*, 2011).

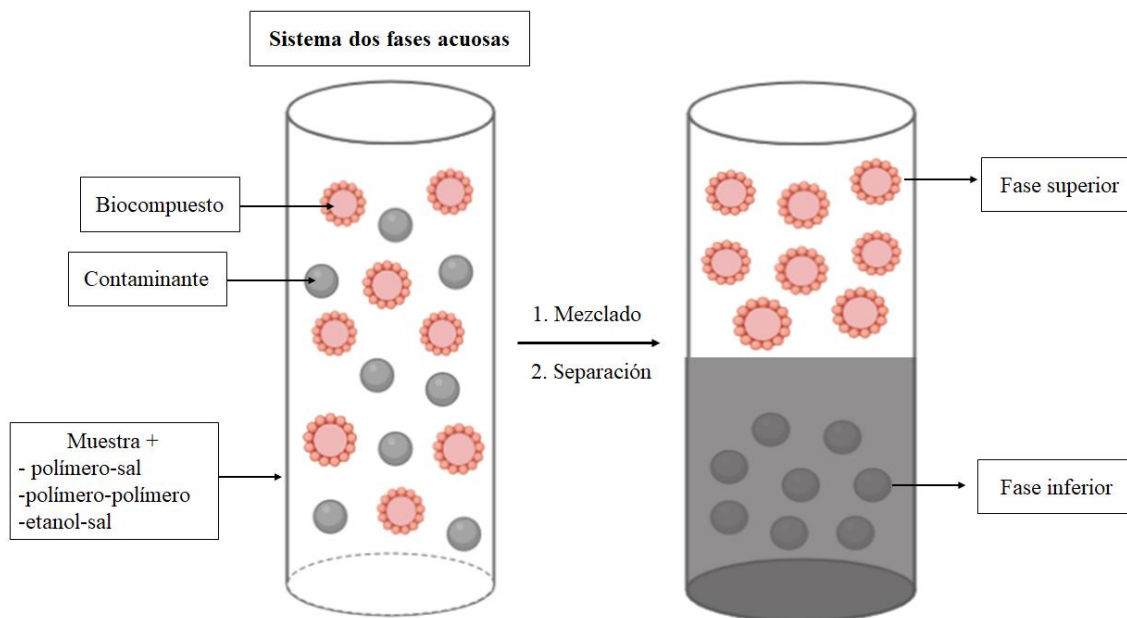


Figura 1.6. Esquema de la separación de compuestos mediante sistemas de dos fases acuosas (ATPS).

El uso de ATPS se ha centrado principalmente en el fraccionamiento, recuperación y purificación parcial de compuestos de gran peso molecular (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) y biopartículas (células, orgánulos, partículas similares a virus, etc.). Así mismo, en los últimos años, el interés en la aplicación de ATPS para la recuperación y purificación parcial de compuestos de bajo peso molecular ha ido aumentando, pues ya que ha demostrado muy buenos resultados para el fraccionamiento y recuperación de dichos compuestos bioactivos (Benavides *et al.*, 2011; Simental-Martínez *et al.*, 2014; Iqbal *et al.*, 2016).

La extracción por ATPS muestra un gran potencial y para biosurfactantes existen muy pocos estudios relacionados, entre los que se encuentra el trabajo realizado por Drouin y Cooper (1991) en donde evaluaron la extracción de surfactina producida por *Bacillus subtilis* con ATPS de polietilenglicol y dextrano con fosfato de sodio y lo compararon con otros surfactantes químicos. Yuan *et al.*, (2011) evaluaron ATPS de etanol-sulfato de amonio para la extracción Iturina A, un lipopéptido producido por una especie de *Bacillus*, en la investigación evaluaron diferentes parámetros para determinar la eficiencia de la extracción (temperatura, tiempo de centrifugación y pH) y comprobaron que con este método favorece la extracción y cuantificación rápida del BS. Ambos BS fueron producidos por Fms y, hasta

el día de hoy, no se han identificado trabajos relacionados en BS producidos por FES, por lo que particularmente para la separación de SLs podría ser una alternativa para la sustitución de los métodos convencionales con solventes orgánicos.

4.4 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos es una tecnología que se basa en la extracción de compuestos bioactivos empleando presiones y temperaturas por encima del punto crítico ya sea de la matriz, la mezcla, el compuesto o el elemento. Este método es una alternativa ecológica ya que el empleo de solventes es mucho menor que los sistemas convencionales y tiene la capacidad de extraer compuestos sin que sufran modificaciones, deterioro térmico y oxidación (Antunes-Ricardo *et al.*, 2020).

Este método de extracción fue estudiado desde finales de 1970, sin embargo, en la actualidad ha ido ganando mucho interés por el gran potencial de esta tecnología pues se ha convertido en un método de extracción eficaz para diversos productos, como lo son enzimas (Antunes-Ricardo *et al.*, 2019), alimentos, compuestos fenólicos (Santos *et al.*, 2012), antioxidantes (Andrade *et al.*, 2012), aceites esenciales (Reverchon *et al.*, 1997), entre muchos otros más compuestos.

El solvente más utilizado para la extracción por FSC es el CO₂, el cual es un solvente ecológico, barato y reconocido por la FDA como seguro. Sus condiciones críticas son 30.9°C y 73.8 bar. Por lo que, con esta tecnología es posible emplear temperaturas más bajas a las que convencionalmente se utilizan para la extracción de compuestos térmicos, lábiles o fácilmente oxidables.

El proceso presenta una serie de ventajas que lo hacen muy atractivo, por ejemplo, presenta una difusividad que permite que los fluidos penetren los poros de la matrices sólidas para una mayor transferencia de masa; los tiempos de extracción son más cortos ya que en minutos la extracción se puede realizar exitosamente; es altamente selectivo, los solutos disueltos pueden ser fácilmente separados por despresurización; el método puede ser integrado a técnicas cromatográficas para cuantificar directamente los compuestos que son altamente volátiles y es un proceso que puede ser adaptado desde escala laboratorio hasta escala industrial (Lang *et al.*, 2001).

Para que el método de extracción con FSC sea eficiente es necesario considerar el tipo de muestra y su preparación, el tipo de fluido, el método de alimentación de fluidos en el sistema y las condiciones de extracción (presión, temperatura, flujo y tiempo de extracción). La optimización de estos parámetros permitirá que los compuestos de interés sean extraídos eficazmente. En algunas ocasiones se pueden agregar co-solventes orgánicos, ya que permitirá separar compuestos polares que no se separan fácilmente con CO₂ y ayudará a aumentar el rendimiento de la extracción con FSC (Velasco *et al.*, 2007), lo mismo es necesario agregar para la extracción de lípidos complejos (Herrero *et al.*, 2010).

Este proceso aún no ha sido explorado para la extracción de SLs, pero por sus características podría ser una interesante alternativa de recuperación de estos compuestos.

Capítulo II

Objetivos

El presente estudio se enmarca en el proyecto “Estrategias de optimización de procesos de obtención de bioproductos a partir de residuos orgánicos mediante fermentación en estado sólido” (BIOPRO, CTM2015-69513-R), y corresponde a la segunda tesis en el tema de producción de biosurfactantes del Grupo de Investigación en Compostaje (GICOM).

El objetivo principal de la presente investigación es el estudio de la producción, el escalado y la evaluación de diferentes técnicas para la recuperación de soforolípidos mediante fermentación en estado sólido con la cepa *Starmerella bombicola*.

Para cumplir con el objetivo principal de la presente tesis se han establecido objetivos específicos, los cuales se enumeran a continuación:

- Evaluación de materiales de diferente naturaleza para ser utilizados como soportes en la fermentación en estado sólido para la producción de soforolípidos.
- Evaluación de diferentes sustratos hidrofóbicos (residuos sólidos) para la producción de soforolípidos.
- Desarrollar las metodologías para la caracterización de los soforolípidos producidos mediante nuestro proceso.
- Escalado de la producción de soforolípidos de 0.5 a 22 y a 100 L.
- Estudiar las dinámicas de temperaturas y su efecto en el proceso del escalado de la producción de soforolípidos.
- Definir los factores de emisión que se producen durante el proceso de fermentación para posterior análisis de ciclo de vida.
- Estudiar el potencial que tiene el sólido residual para producir biogás en procesos de digestión anaerobia.
- Explorar diferentes procesos y tecnologías para la extracción y recuperación de los soforolípidos producidos por fermentación en estado sólido.

Capítulo III

Materiales y Métodos

Resumen

En este capítulo se describen los materiales y las metodologías utilizadas durante el desarrollo de la presente tesis; se incluyen las condiciones de crecimiento, los residuos agroindustriales utilizados como sustrato y las diferentes escalas de los sistemas de fermentación que fueron utilizadas evaluadas, así como la metodología detallada, equipos y pruebas para la producción, el monitoreo, cuantificación y recuperación de soforolípidos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Microorganismo

La cepa *Starmerella bombicola* ATCC 22214 fue adquirida de la colección de American Type Culture Collection (Manassas, USA). La cepa fue reactivada siguiendo el protocolo según la ATCC y fue conservada en condiciones estériles en crioviales con 10% (v/v) de glicerol a una temperatura de -80°C , dicho procedimiento se realizó según el sistema propuesto por Simione (2009).

3.1.2 Preparación del inóculo

La cepa fue reactivada a partir de los crioviales preservados a -80°C haciéndola crecer en placas de Petri que contenían 20 g L^{-1} de agar bacteriológico, 10 g L^{-1} de dextrosa, 5 g L^{-1} de peptona y 3 g L^{-1} de extracto de levadura durante 48 h a 30°C (Figura 3.1). Después del periodo de incubación, con un asa bacteriológica se inoculó la cepa en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio líquido fresco (estéril) conformado por 10 g L^{-1} de dextrosa, 5 g L^{-1} de peptona y 3 g L^{-1} de extracto de levadura, el medio de cultivo fue incubado en un agitador orbital durante 48 h a 30°C y 180 rpm.

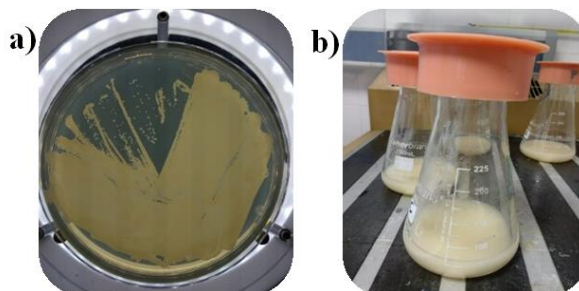


Figura 3.1. a) Crecimiento de *S. bombicola* en placa b) Crecimiento en medio líquido.

3.1.3 Evaluación del inóculo

Una vez crecida la cepa de *S. bombicola* en el medio líquido es necesario comprobar su crecimiento y viabilidad, mediante las siguientes pruebas:

3.1.3.1 Microscopía óptica

Para comprobar la pureza de la cepa se realiza el análisis de una gota del cultivo de *S. bombicola* y se observa en el microscopio óptico a diferentes aumentos x10, x40 y x100. Se comprueba que la morfología y el tamaño característico del microorganismo tal y como se presentan en la Figura 3.2.

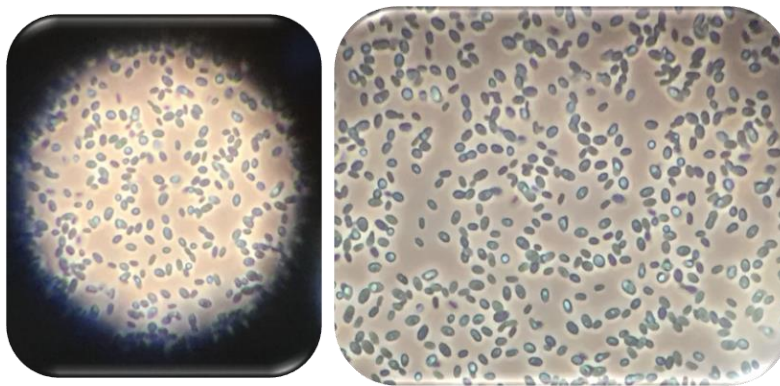


Figura 3.2. Morfología de la cepa *S. bombicola* observada en el microscopio

3.1.3.2 Densidad óptica

La densidad óptica (DO) es un método turbidimétrico rápido que estima el crecimiento microbiano de un cultivo midiendo su absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda constante. Para esto, se tomaron alícuotas (por triplicado) del medio líquido con el microorganismo y fueron diluidas con agua destilada (1:50); como blanco se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Las diluciones se midieron en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio, UV-Visible Spectrophotometer) a una longitud de onda de 600 nm. La DO se calculó según la fórmula 1. Se utilizaron valores entre las 20 y 25 unidades para inocular los sistemas de fermentación (aproximadamente 4 g L⁻¹).

$$DO = Abs_{600} * N \quad [1]$$

Donde:

DO: densidad óptica a 600 nm

Abs₆₀₀: absorbancia a 600 nm

N: número de diluciones

3.2 Sustratos

En los experimentos para producción de soforolípidos se utilizaron dos tipos de sustratos, uno de tipo hidrofílico y uno de tipo hidrofóbico, los cuales, fueron proporcionados por diferentes empresas de España (Figura 3.3). Como sustrato hidrofílico se utilizó melaza de remolacha azucarera (MEL), la cual, fue proporcionada por la compañía Azucarera Iberia S.L.U. (Madrid, España) y corresponde al jarabe que queda de la etapa final de cristalización de la remolacha azucarera. Finalmente, como sustratos hidrofóbicos se utilizaron y evaluaron los residuos de winterización del aceite de girasol (WOC) el cual es un residuo rico en grasas que se obtiene del enfriamiento del aceite de girasol (5°C por 24 h) seguido por la eliminación de ceras por filtrado con perlita y las tierras de decoloración (TD) obtenidas del proceso de decoloración del aceite, los residuos fueron proporcionados por la refinería de aceites para uso alimentario, Lípidos Santiga S.A. (LIPSA, Barcelona, España). Todas las muestras se mantuvieron y conservaron en contenedores herméticamente cerrados a una temperatura de 4°C.



Figura 3.3. a) Melaza de remolacha azucarera. b) Residuo de winterización del aceite.
c) Tierras de decoloración

3.3 Soportes

Se seleccionaron 9 materiales diferentes para evaluarlos como soportes en la fermentación en estado sólido. Dichos soportes fueron seleccionados con base a lo reportado en la literatura y clasificados según su composición en biomateriales y materiales inertes. La Figura 3.4

muestra los biomateriales conformados por cascara de arroz (CA) que fue proporcionada por la empresa Husk Ventures S.L. (Barcelona, Spain) con un tamaño de partícula aproximado a 6 x 4 mm (largo x ancho); paja de trigo (PT) proporcionada por las granjas experimentales de la facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España); fibra de coco (FC) y corteza de pino (CP) que fueron comprados en proveedores locales en Barcelona. Finalmente, la Figura 3.4 también muestra los materiales inertes conformados por espumas de poliuretano de color negro (EN) con una densidad de 32 kg m⁻³ y de color amarillo (EA) con una densidad de 30 kg m⁻³ proporcionadas por las empresas McMaster-Carr (Elmhurst, IL, EUA) y Espumas del Valles S.A. (Cerdanyola del Vallès, España), respectivamente, así mismo perlita (PE), arcilla (AR) y arcilla volcánica (AV) comprados con proveedores locales en Barcelona. Los materiales fueron cortados en partículas de 3 a 9 mm de largo. Las espumas de poliuretano se cortaron en cubos de 6 x 6 x 6 mm, se lavaron con agua destilada y se secaron a 60°C en una estufa de secado.



Figura 3.4. Materiales seleccionados para evaluación como soporte para la producción de soforolípidos. Arriba: Biomateriales. Abajo: Materiales inertes.

3.4 Sistemas de fermentación en estado sólido

La producción de SLs se realizó mediante sistemas de fermentación en estado sólido en reactores diferentes según la escala. Cabe señalar que en todos los experimentos las mezclas

del soporte y los sustratos se esterilizaron previamente a 121°C durante 30 minutos para mantener condiciones de esterilidad en la mayor medida posible. En escala de 22 y 100 L se realizaron 3 ciclos de esterilización previamente cada 24 horas ya que, al incrementar la escala, el riesgo de contaminación es mayor y al mismo tiempo se eliminaron esporas resistentes presentes en el soporte.

En todos los sistemas cada reactor se suplementó con aire, suministrado por un compresor, humidificado y regulado mediante un controlador de flujo másico (Bronkhorst, España). Los gases de salida (parte superior del reactor) pasaron por un sensor de oxígeno (O₂-A2, Alphasense, UK), los cuales se registraron como concentración de oxígeno en el sistema de adquisición de datos. A partir de la concentración de O₂ se calculó, como se describe en la sección 3.5 (fórmula 2 y 3), la tasa de consumo de oxígeno (OUR, mg O₂ g⁻¹ DM h⁻¹) y el consumo de oxígeno acumulado (COC, mg O₂ g⁻¹ DM) (Ponsá *et al.*, 2010). Los sistemas de fermentación de 22 y 100 L cuentan con una sonda que permite monitorear la temperatura en tiempo real durante el proceso; así mismo se colocaron sensores de temperatura portátiles (Thermochron: The temperature logging iButton) en diferentes puntos de cada reactor. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y fueron monitoreadas diariamente.

3.4.1 Fermentación en reactor de 0.5 L

El sistema de fermentación a escala 0.5 L fue diseñado y descrito en trabajos anteriores (Ponsa *et al.* 2010); basado en la metodología propuesta para Adani *et al.* (2006) mediante condiciones controladas y el seguimiento online del proceso de biológico. El sistema está conformado por un reactor de lecho empacado, cilíndrico de cloruro de polivinilo (13 cm de alto x 7 cm de diámetro), el cual tiene una entrada de aire por la parte inferior del reactor permitiendo la distribución del aire en toda la matriz sólida hasta la salida de gases ubicada en la parte superior. Los reactores se incubaron en baños termostáticos a una temperatura constante de 30°C durante 7 días (a excepción de las cinéticas de producción de SLs que se incubaron hasta 14 días). Con base a los datos optimizados de experimentos anteriores (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2016), cada reactor fue suplementado de aire humidificado con 30 mL min⁻¹ (Figura 3.5). La Figura 3.8 muestra la imagen real del reactor de 0.5 L.

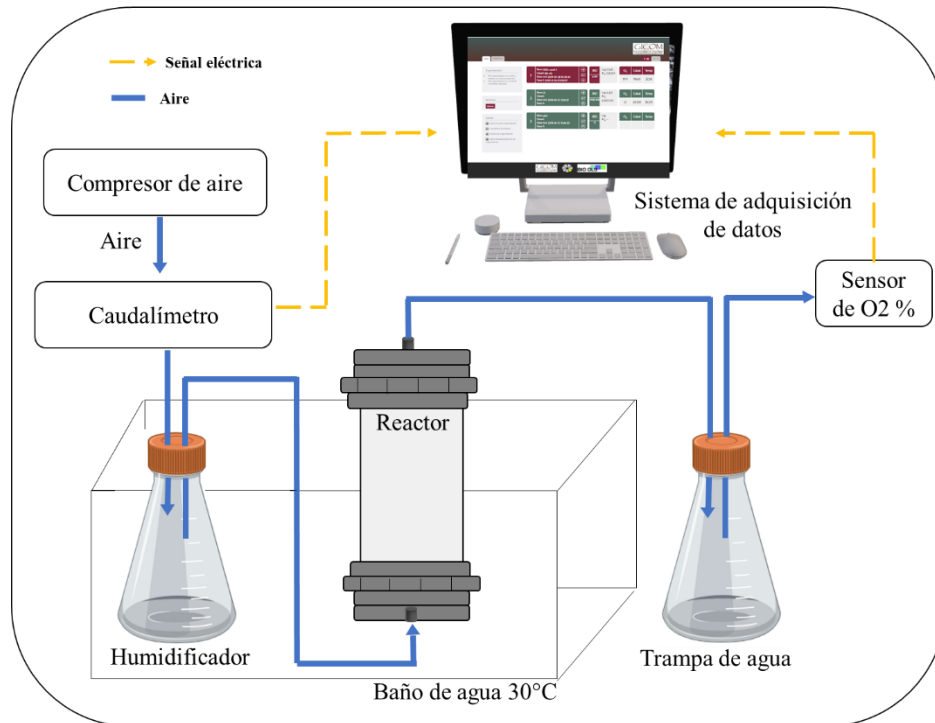


Figura 3.5. Esquema experimental del sistema de fermentación a escala de 0.5 L

3.4.2 Fermentación en reactor de 22 L

El sistema de fermentación de 22 L consistió en un reactor cilíndrico de acero inoxidable (70 cm de altura x 30 cm de diámetro). El reactor está conformado por un sistema de agitación compuesto por un eje helicoidal, el cual puede ser regulado mediante un control de velocidades, el llenado se realiza por la parte superior del reactor y se deposita en una cesta interna la cual puede ser extraída para la descarga del material. El reactor tiene una entrada de aire, previamente humidificado, en la parte inferior por la cual se suplementa el aire que viene de un compresor de aire y es regulado por un caudalímetro, en la parte superior del reactor, se encuentra una salida de aire que pasa por una trampa de agua y finalmente pasa a un sensor de oxígeno. Así mismo en la parte inferior cuenta con una entrada para una sonda de temperatura la cual registra los valores de temperatura en tiempo real en el software de adquisición de datos (Figura 3.6). El sistema fue llenado con un máximo de 3 kg de mezcla (soporte + sustratos) para lograr un 75% de la capacidad del reactor, ya que al llenarlo en su totalidad había problemas de compactación del material lo que impedía una homogénea distribución del aire. Con base al volumen del reactor se determinó el caudal específico de aireación, por lo que el reactor fue suplementado inicialmente a caudal de 1237 mL min^{-1} y

conforme fue incrementando la temperatura se incrementó el caudal hasta 2000 mL min^{-1} . La Figura 3.8 muestra la imagen real del reactor de 22 L.

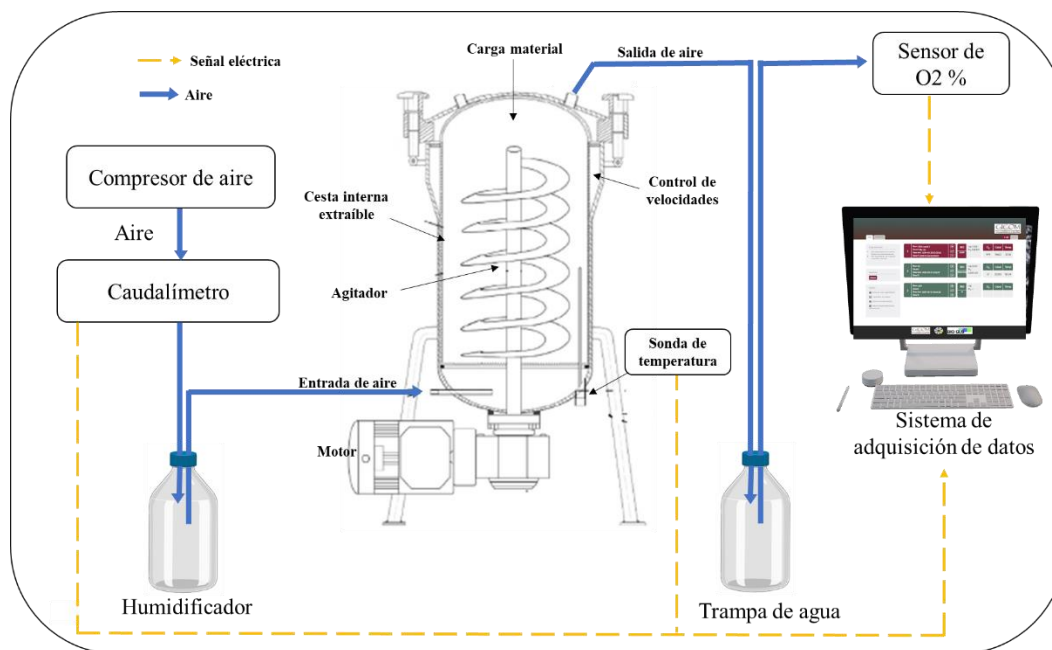


Figura 3.6. Esquema experimental del sistema de fermentación a escala de 22 L

3.4.3 Fermentación en reactor de 100 L

El sistema de 100 L consistió en un reactor cilíndrico de acero inoxidable (80 cm de altura x 46 cm de diámetro) con una capacidad de 100 L. El reactor está conformado por un sistema de agitación compuesto por un eje helicoidal de 80 cm de altura, el cual, puede ser regulado mediante un control de velocidades. El reactor cuenta con una tapa superior conformada por una tolva por donde se llena con el material para la fermentación y de una tapa inferior la cual permite el vaciado y cuenta con una entrada por la cual se suministra el aire. Así mismo, en una lateral del reactor se inserta una sonda de temperatura (Pt-100, Design, España) la cual es monitoreada en tiempo real durante todo el proceso. Así como en el sistema de fermentación de 22 L la salida de gases se encuentra en la parte superior del reactor y está conectada a una trampa de agua y a un sensor de oxígeno que van directo al sistema de adquisición de datos como se describe en la Figura 3.7. Con base al volumen del reactor se determinó el caudal específico de aireación, el reactor fue suplementado inicialmente a caudal de $7,500 \text{ mL min}^{-1}$ y conforme fue incrementando la temperatura se incrementó el caudal hasta $10,000 \text{ mL min}^{-1}$. La Figura 3.8 muestra la imagen real del reactor de 100 L.

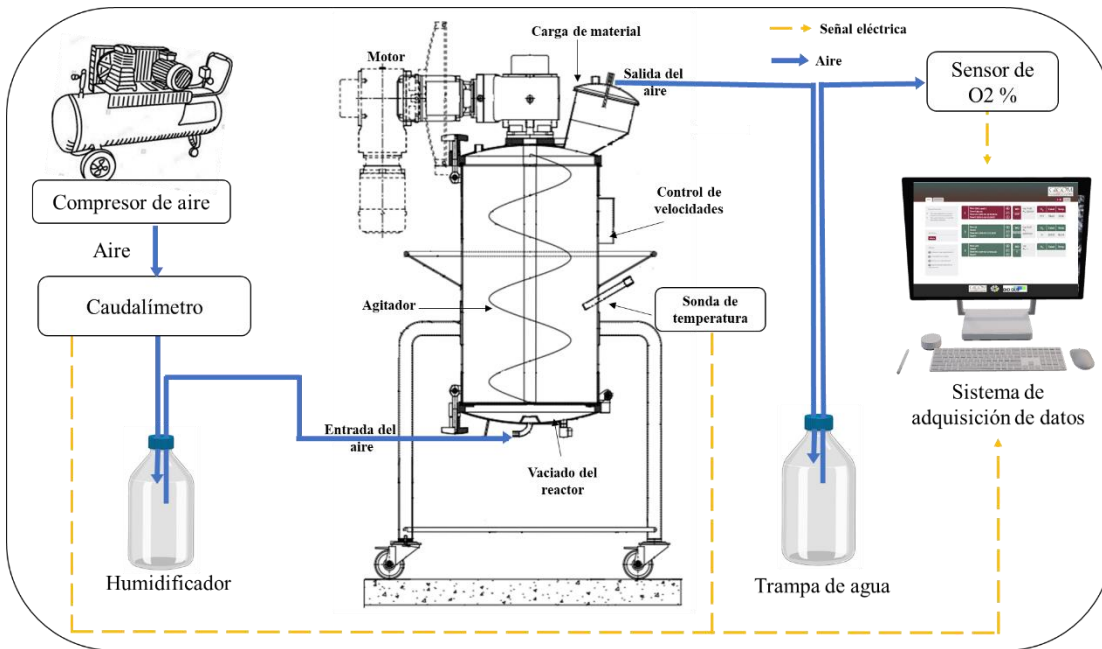


Figura 3.7. Esquema experimental del sistema de fermentación de 100 L.

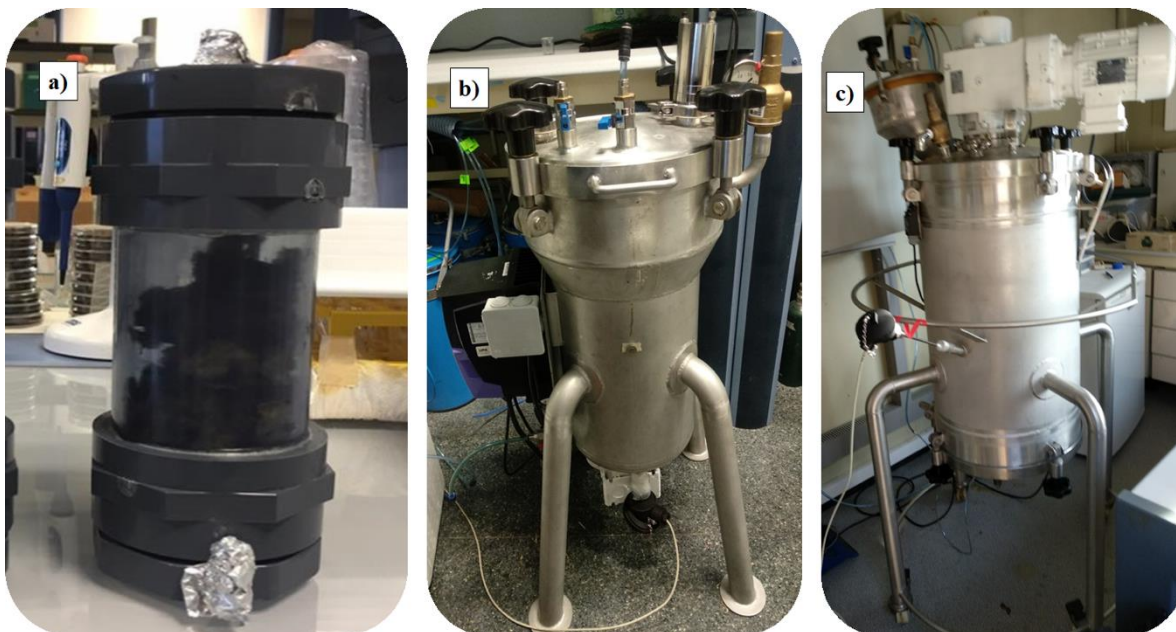


Figura 3.8. Reactores cilíndricos de acero inoxidable. a) 0.5 L, b) 22L, c) 100 L

3.5 Monitoreo y medición de la actividad biológica de los sistemas de fermentación

La tasa de consumo de oxígeno (OUR) y el consumo de oxígeno acumulado (COC) fueron los parámetros utilizados para monitorear la actividad biológica de los sistemas de fermentación (Ponsá *et al.*, 2010).

3.5.1 Tasa de consumo de oxígeno (OUR)

La tasa de consumo de oxígeno específico (sOUR) se calculó utilizando la siguiente fórmula (2).

$$sOUR = \frac{(O_{2i} - O_{2f}) * F * 31.98 * 60 * 1000^a}{1000^b * 22.4 * MS} \quad [2]$$

Donde:

sOUR: Tasa de consumo de oxígeno (mg O₂ g⁻¹ DM h⁻¹).

(O_{2i}-O_{2f}): diferencia del contenido de oxígeno entre el aire que entra y el aire que sale del reactor.

F: caudal de aire suplementado en el sistema (mL min⁻¹).

31.98: Peso molecular del oxígeno (g mol⁻¹).

60: factor de conversión (min h⁻¹).

1000^a: factor de conversión (mg g⁻¹).

1000^b: factor de conversión (mL L⁻¹).

22.4: volumen ocupado por un mol de un gas ideal bajo condiciones normales (1 atm y 273 K).

MS: Contenido de materia seca de la mezcla del reactor (g).

3.5.2 Consumo de oxígeno acumulado

El consumo de oxígeno acumulado (COC) fue calculado siguiendo la fórmula (3) descrita a continuación:

$$COC = \int_0^t sOUR_t * dt \quad [3]$$

Donde:

COC: consumo acumulado de oxígeno (mg O₂ g⁻¹ MS).

sOUR: Tasa de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$).

t: tiempo final de la fermentación en estado sólido (h).

3.6 Métodos analíticos estándares

Se realizaron evaluaciones analíticas estándares tanto para la parte de la caracterización de los soportes para la FES y como parte de los análisis rutinarios en los experimentos realizados, todos los análisis se realizaron por triplicado siguiendo los procedimientos del TMECC “Test Methods for the Examination of Composting and Compost” (The US Department of Agriculture and The US Composting Council, 2001).

3.6.1 pH

El pH de las muestras se determinó en los extractos acuosos obtenidos después de mezclar 5 g de muestra con agua destilada (1:5 p/v) y agitación durante 30 minutos en un agitador orbital a 200 rpm a temperatura ambiente, empleando un potenciómetro Crison®, micropH2001.

3.6.2 Humedad y materia seca

El contenido de humedad (HU) y materia seca (MS) de las muestras fueron determinadas mediante el secado de las mismas a 105°C durante 24 h, las muestras se dejaron enfriar en un desecador para posteriormente pesarlas y calcular los valores siguiendo las fórmulas 4 y 5.

$$\% \text{ HU} = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}} - P_{\text{crisol}}} * 100 \quad [4]$$

$$\text{MS} = 100 - \% \text{ H} \quad [5]$$

Donde

Pinicial: Peso de la muestra húmeda (g).

Pfinal: Peso final de la muestra seca (g).

Pcrisol: Peso crisol vacío (g).

MS: materia seca (%).

3.6.3 Materia orgánica

La cantidad de materia orgánica (MO) en la muestra se determinó tras la combustión de las muestras previamente secas en crisoles a 500°C en una mufla durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron enfriar en un desecador para posteriormente calcular el contenido de materia orgánica mediante la fórmula 6:

$$\% \text{ MO} = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{cenizas}}}{P_{\text{inicial}} - P_{\text{crisol}}} * 100 \quad [6]$$

Donde:

P_{inicial}: Peso inicial muestra seca (g).

P_{cenizas}: Peso cenizas (g).

P_{crisol}: Peso crisol vacío (g).

3.6.4 Análisis elemental

El análisis elemental se determinó mediante la combustión de una muestra seca a 1200 ° C en una atmósfera de oxígeno y la posterior cuantificación por cromatografía de gases (Elemental Analyzer CHNS Thermo Scientific Flash 2000). Dicho análisis fue desarrollado por el Servicio de Análisis Químico (SAQ) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

3.6.5 Determinación de grasas

El contenido de grasas se determinó según el procedimiento descrito en el manual 055/2010 Buchi para la determinación directa de grasas en muestras de alimentos. Las muestras fueron secadas previamente a durante 24 h a 105°C y el peso se determinó con base a la cantidad de grasa aproximada que se espera de las muestras según la tabla 3.1. La extracción se realizó sobre la muestra seca mezclada con 3 g de sulfato de sodio anhidro en cartuchos de celulosa en el equipo de extracción de grasas Soxhlet E-816 (Buchi) utilizando como solvente n-hexano (≥ 95 % de pureza, Sigma Aldrich) durante 2 horas. El contenido total de grasa se determinó gravimétricamente después de que el extracto se secase a un 105°C hasta peso constante siguiendo la fórmula 7:

$$\% \text{ grasas} = \frac{(P_{\text{final}} - P_{\text{vaso}})}{P_{\text{muestra}}} * 100\% \quad [7]$$

Donde:

P_{final}: Peso del vaso + grasa (g).

P_{vaso}: Peso del vaso vacío (g).

P_{muestra}: Peso de la muestra (g).

Tabla 3.1. Cantidad de muestra seca según el porcentaje de grasas aproximado esperado. Referencia. 055/2010 Buchi.

% grasa: muestra	% grasa: muestra	% grasa: muestra
80-100 %: 0.7-1 g	20-50 %: 1.5-3.5 g	<10 %: 7-10 g
50-80 %: 1-1.5 g	10-20 %: 3.5-7 g	

3.6.6 Densidad aparente (DAP) y porosidad

La densidad aparente se calculó a partir del peso por unidad de volumen de las muestras. Para esto se pesó una muestra en una probeta y se midió el volumen que ocupaba, para calcular la DA se utilizó la fórmula 8.

$$DA = \frac{P}{V} \quad [8]$$

Donde:

DA: Densidad aparente (g L⁻¹).

P: Peso de la muestra (g).

V: Volumen de la muestra (L).

La misma probeta se utilizó para determinar la porosidad, para ello se llenó de agua, se pesó y después se dejó drenar durante 1 h, transcurrido el tiempo, se volvió a pesar la muestra para calcularla por la diferencia de pesos.

3.6.7 Capacidad de retención hídrica (CRH)

Se determinó la capacidad que tienen los materiales para retener agua, el cual es un parámetro muy importante en el proceso de FES. Para esto, en un vaso de precipitado se pesó una muestra de material y se llenó de agua, con una rejilla, se dejó drenar el agua durante 1 h, transcurrido el tiempo la muestra se volvió a pesar y a calcular con la fórmula 9 :

$$CRH = \frac{Pf - Pi}{Pi} \quad [9]$$

Donde:

CRH: Capacidad de retención hídrica (g agua g⁻¹ material).

Pf: Peso final de la muestra saturada (g).

Pi: Peso inicial de la muestra original (g).

3.6.8 Microscopía electrónica de barrido

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la rugosidad de los materiales evaluados como soporte y la fijación de la cepa *S. bombicola* después del proceso de fermentación, para esto se tomaron muestras y se cortaron asépticamente en tamaños aproximados de 0.5 x 0.5 cm. Las muestras fueron fijadas según la metodología descrita por Kilonzo *et al.*, 2011. El análisis se realizó en el servicio de microscopia de la UAB mediante el microscopio electrónico Zeiss (EVO® MA 10, Alemania).

3.7 Métodos específicos para el monitoreo del proceso de producción de soforolípidos

Después del tiempo del proceso de FES se procedió a realizar el análisis de producto fermentado, entre estos análisis se encuentran el rendimiento de SLs producido por *S. bombicola*, el consumo de azúcares y la viabilidad celular durante el proceso.

3.7.1 Rendimiento de soforolípidos

La extracción de SLs se realizó conforme a la metodología descrita por Jiménez *et al.*, (2016) con algunas modificaciones (Figura 3.9). A partir del sólido fermentado (SF) se tomaron muestras de 10 g, se mezclaron con 100 ml de acetato de etilo (1:10 p/v) y se pusieron en agitación durante 1 hora a 200 rpm, dicho procedimiento se realizó 2 veces. Después de cada extracción se recolectó el solvente y al finalizar la segunda extracción, se mezclaron los dos extractos para obtener aproximadamente 200 mL (Figura 3.9). Posteriormente, se agregó al

extracto una pequeña cantidad de Na_2SO_4 anhidro para eliminar restos de humedad, se filtró con papel Whatman No.1, y se procedió a evaporar el solvente con un rotavapor a 40°C (Heidolph). El soforolípido crudo obtenido se lavó con 40 mL de n-hexano para eliminar impurezas y grasas residuales; primero se decantó y después se evaporó el hexano a bajo campana de extracción a temperatura ambiente hasta eliminar el solvente. Al finalizar el proceso de evaporación se obtuvo el soforolípido, el cual, presenta una consistencia similar a miel de color ámbar como se muestra en la Figura 3.10.

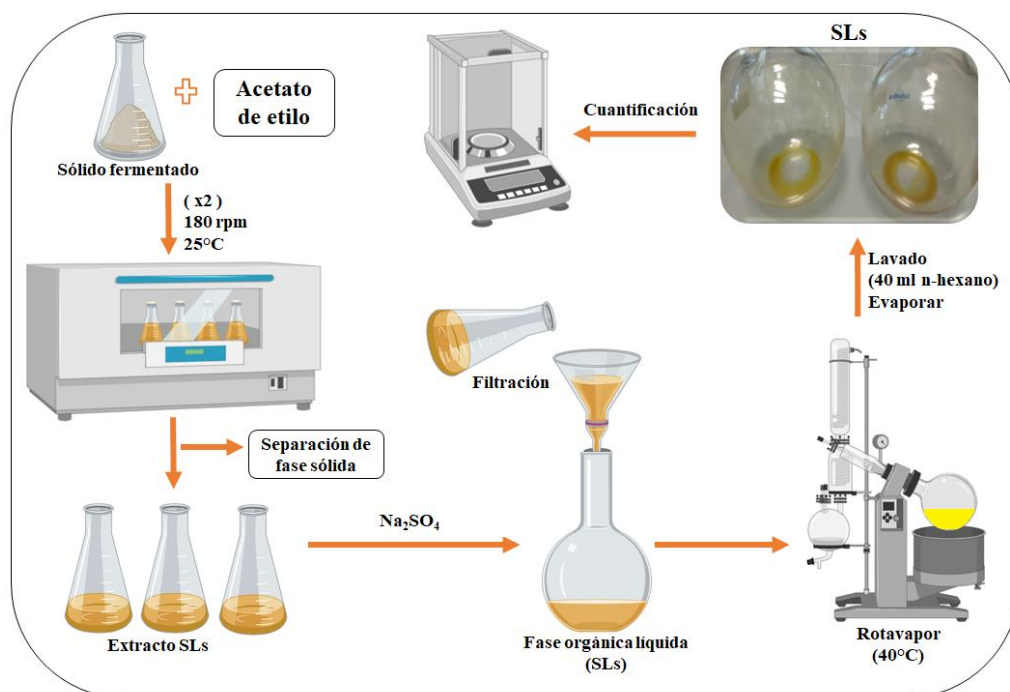


Figura 3.9. Esquema del proceso de extracción de soforolípidos.

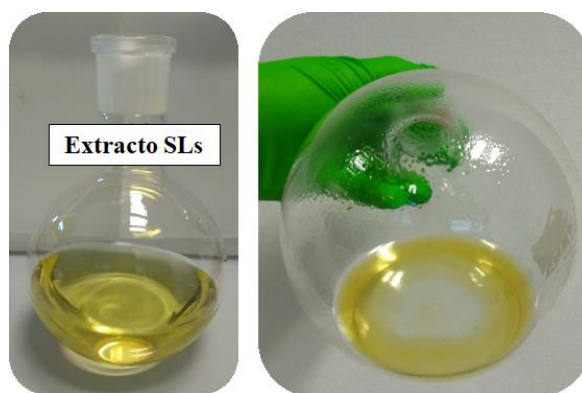


Figura 3.10. Izquierda: Extracto líquido (acetato de etilo + SLs). Derecha: extracto crudo de SLs.

La producción de SLs se reportó como: concentración por gramo de materia seca (g SL g⁻¹ MS); producción volumétrica (g SL por volumen en el reactor, g SL L⁻¹); y rendimiento de producto/sustrato (g SL g⁻¹ substratos), en donde los sustratos es la suma de MEL y WOC.

Se calcularon los gramos de SLs en base húmeda al finalizar el proceso de fermentación mediante la fórmula 10:

$$\mathbf{g\ SL\ g^{-1}\ MH} = \frac{Pf - Pi}{P} \quad [10]$$

Donde:

g SL g⁻¹ MH: gramo de SLs por gramos de materia húmeda.

Pf: Peso final del matraz de evaporación con los SLs (g).

Pi: Peso inicial del matraz de evaporación con los SLs (g).

P: Peso de la muestra en base húmeda (g MH).

Se calcularon los gramos de SLs crudo obtenidos en total; fórmula 11:

$$\mathbf{g\ SL} = P_{\text{final reactor}} * SLs\ g^{-1}\ MH \quad [11]$$

Donde:

g SL: gramos de Soforolípido crudo.

P_{final reactor}: Peso final del sólido fermentado.

g SL g⁻¹ MH: gramo de SLs por gramos de materia húmeda.

Concentración de soforolípidos:

La concentración de SLs se expresó como gramos por gramos de materia seca según la siguiente fórmula 12:

$$\mathbf{g\ SL\ g^{-1}\ MS} = \frac{gSLs}{(P_{\text{inicial reactor}} * gMS)} \quad [12]$$

Donde:

g SL g⁻¹ MS: gramo de SLs por gramos de materia seca.

g SL: gramos de Soforolípido crudo (g).

P_{inicial reactor}: Peso total de la mezcla inicial (g).

gMS: gramos de materia seca de la mezcla inicial (g^{-1} MS).

Mezcla inicial: Peso de Paja + Melaza + WOC + Inóculo.

Producción volumétrica:

El rendimiento volumétrico se expresó en gramos de SLs por litro referido al volumen de fermentación según el sistema de fermentación (fórmula 13):

$$\mathbf{g\ SL\ L^{-1}} = \frac{gSLs}{VR} \quad [13]$$

Donde:

g SL L^{-1} : gramos de SLs por litro.

g SL: gramos de Soforolípido crudo (g).

VR: volumen del reactor (L).

Rendimiento de producto/sustrato:

Se calculó el rendimiento de producto por gramo de sustrato según la fórmula 14, en donde el sustrato es la suma de los gramos de melaza más los gramos de WOC.

$$\mathbf{g\ SL\ g^{-1}\ sustratos} = \frac{gSLs}{gsustratos} \quad [14]$$

Donde:

g SL g^{-1} sustratos: gramos de SLs por gramo de sustratos.

g SL: gramos de Soforolípido crudo (g).

gsustratos: suma de sustratos; MEL (g) + WOC (g).

3.7.2 Determinación del contenido total de azúcares (Método Antrona)

Los azúcares se extrajeron de las muestras húmedas agregando agua destilada en una proporción 1:10 (p/v). La mezcla se puso a extraer en un incubador orbital a 250 rpm durante 30 minutos a 50°C. El sobrenadante se recuperó y se repitió la extracción 2 veces más, al finalizar, los sobrenadantes se juntaron y se filtraron con filtros de membrana de 0.45 μ m. Los extractos filtrados fueron lavados 3 veces con acetato de etilo en una proporción 1:1 v/v con el objetivo de eliminar SLs presentes en la fase orgánica que pudieran causar

interferencia en los resultados. Los extractos obtenidos fueron utilizados para la determinación de azúcares totales.

Se determinó el consumo de azúcares totales durante el proceso de fermentación siguiendo el método propuesto por Scott y Melvin (1953). Se preparó el reactivo antrona (Acros Organics) disolviendo 200 mg en 100 mL de ácido sulfúrico al 95 % incubado en hielo (el reactivo se preparó cada vez que se utilizó). La reacción se realizó en tubos de ensayo de 25 mL y se agregaron 4 mL de antrona + 1 mL de extracto, la mezcla se agitó utilizando un agitador vortex y se mantuvo durante 8 minutos en un baño de agua en ebullición; posteriormente se enfrió rápidamente en un cubo con hielo. Se midió la absorbancia de la reacción a 630 nm utilizando un espectrofotómetro (Cary 50, Bio, UV-Visible). Como blanco se preparó un tubo con 1 mL de agua destilada (en vez de extracto) y 4 mL de antrona. La curva de calibración (Tabla 3.2) se preparó utilizando glucosa con una concentración desde 0 a 0.1 g L⁻¹; la Figura 3.11 presenta los datos obtenidos de la curva de calibración.

Tabla 3.2. Concentraciones de la curva de calibración de glucosa

Tubo	Estándar (mL)	Agua destilada (mL)	Reactivo Antrona (mL)	Concentración (mL)
0	0	1	4	0
1	0.2	0.8	4	0.02
2	0.4	0.6	4	0.04
3	0.6	0.4	4	0.06
4	0.8	0.2	4	0.08
5	1	0	4	0.1

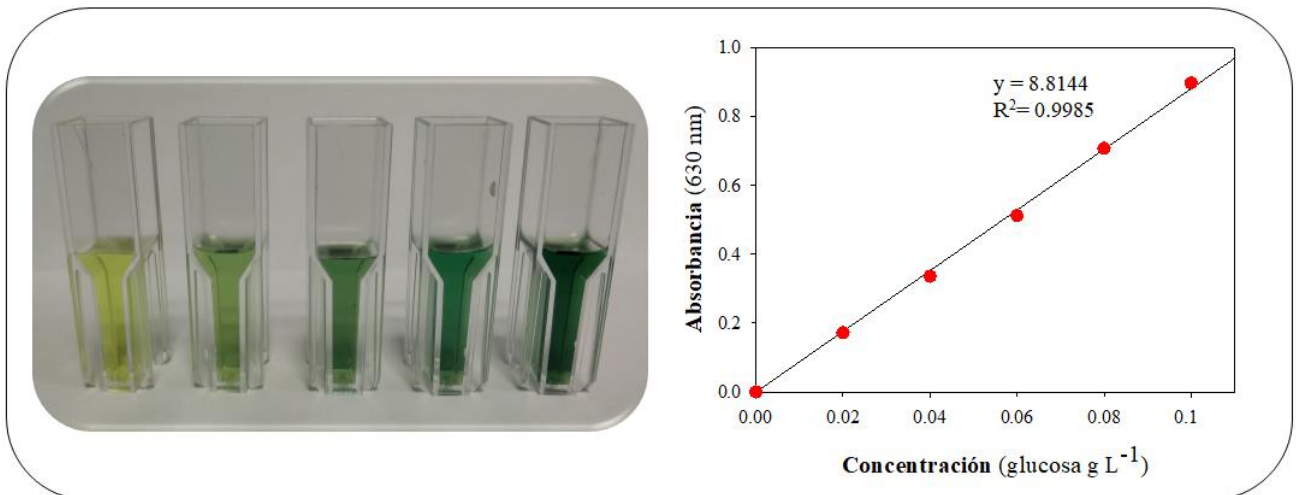


Figura 3.11. Izquierda: Colorimetría curva de calibración (de 0 a 0.10 g L⁻¹). Derecha.

Curva de calibración para el contenido total de azúcares.

La concentración total de azúcares se calculó siguiendo la fórmula 15 expresada como gramos de glucosa equivalente por gramo de materia seca:

$$\text{Contenido total de azúcares} = \frac{C}{P} * V \quad [15]$$

Donde:

Contenido total de azúcares: (g g⁻¹ MS).

C: Concentración equivalentes de glucosa (g L⁻¹).

P: Peso de la muestra (g).

Volumen total del extracto (L).

3.7.3 Unidades Formadoras de colonias (UFC)

Se cuantificó el contenido de microorganismos viables durante la fermentación mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Se diluyeron 10 g de muestra en 90 ml de solución salina estéril (Ringer®), la mezcla inicial se agitó en un incubador orbital a 200 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. A partir de la mezcla inicial como se describe en la Figura 3.12, se prepararon diluciones seriadas en tubos cónicos de 15 mL agregando 9 ml de Ringer y 1 mL mezcla, posteriormente se inocularon 100 µl en placas de agar (sección 3.1.2) y se incubaron a 30°C durante 72 h. Después del tiempo de incubación se contaron las colonias formadas con ayuda de un contador de colonias. Los análisis se

realizaron por triplicado, los cálculos se realizaron mediante la fórmula 16 y los resultados se expresaron en Unidades formadoras de colonias por gramo de materia seca (UFC g⁻¹ MS).

$$\text{UFC} = \frac{N}{DM} * D * E \quad [16]$$

Donde:

UFC: Unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹ MS).

N: número de colonias (unidades).

D: factor de dilución (mL).

E: ratio de la extracción (10g en 90 mL) (g mL⁻¹).

MS: Materia seca de la muestra.

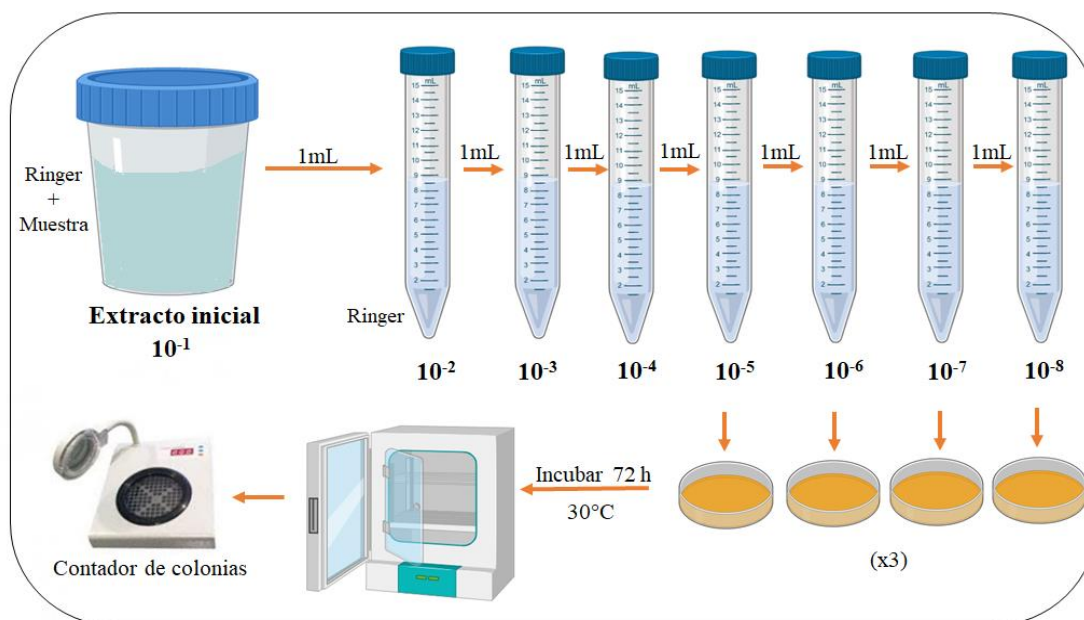


Figura 3.12. Esquema para la determinación de UFC.

3.7.4 Caracterización de sofrolípidos (HPLC-MS)

La caracterización de los tipos de sofrolípidos producidos y extraídos de la FES se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS) utilizando el equipo LCMS 2010 A SHIMADZU (Figura 3.13). Las muestras de sofrolípidos se disolvieron en una solución de 50:50 acetonitrilo/agua en una concentración de 1 g L⁻¹ y se filtraron mediante un filtro de membrana de 0.2 μm para inyectarlo en el equipo. La separación de moléculas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución usando una

columna Kinetex 2.6 μm C8 100 Å, LC 100 x 2.1 mm. El gradiente de elución que se utilizó fue de acetonitrilo/agua 50/50 (v/v) a acetonitrilo/agua 100/0 (v/v) durante 32 minutos a un caudal de 0.2 mL min^{-1} . La respuesta se midió con un detector de arreglo de diodos UV-Visible a 205 nm. Luego las muestras se ionizaron por electrospray (en modo negativo) en donde se identificaron por su masa/carga (m/z).



Figura 3.13. Equipo HPLC-MS 2010 A SHIMADZU

Así mismo se utilizó el estándar de tipo C18:1 Lactónico 1',4''-Sophorolactone 6',6''-diacetate con \pm 80% de pureza (Cayman Chemical) y se realizó una curva de calibración con una concentración desde 0 a 1 g L^{-1} (Tabla 3.3, Figura 3.14) para determinar la concentración del tipo de soforolípido en nuestra muestra.

Los análisis de cromatografía del Capítulo 6 que se realizaron durante la estancia de investigación en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Monterrey utilizando el equipo HPLC-ELSD-DAD (Agilent 1200) y el HPLC semipreparativo (Agilent 1100).

Tabla 3.3. Concentraciones curva de calibrado con el estándar 1',4''-Sophorolactone 6',6''-diacetate (C18:1)

Tubo	Estándar (mL)	Acetonitrilo/agua 50:50 v/v (mL)	Concentración (g L^{-1})
0	0	1	0
1	0.4	0.6	0.4
2	0.7	0.3	0.7
3	1	0	1

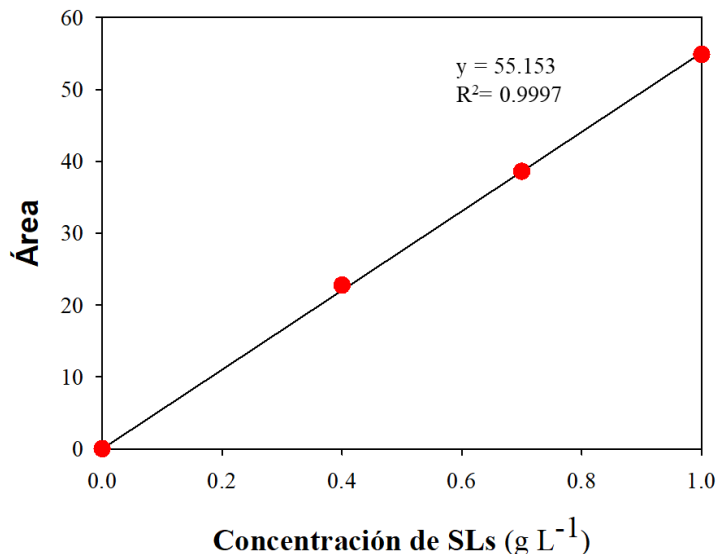


Figura 3.14. Curva de calibración estándar 1',4"-Sophorolactone 6',6"-diacetate (C18:1)

3.8 Procesos para la recuperación de compuestos (*Downstream processing*)

3.8.1 Extracción de soforolípidos con solventes orgánicos

Con el objetivo de evaluar diferentes solventes y comparar con el solvente convencional (acetato de etilo) se evaluó la extracción de SLs utilizando acetato de etilo (como blanco), agua y etanol. Se realizaron dos etapas de experimentos; el primero fue con el sólido fermentado sin tratar (SF) y el segundo triturando el SF (SFT) con un molino para café (Moulinex). Las extracciones se realizaron en una relación de SF: solvente (1:10 p/v), durante 1 hora en un incubador orbital a 200 rpm utilizando tres temperaturas diferentes (25°C, 35°C y 45°C), esto con el objetivo de evaluar si la temperatura tiene algún efecto durante la extracción. Transcurrido el tiempo de extracción los extractos fueron filtrados con papel Whatman No. 1, evaporados en un evaporador centrífugo EZ-2 (Genevac, USA) y lavados con n-hexano y se evaporó a temperatura ambiente bajo una campana de extracción para obtener los extractos crudos y calcular su rendimiento mediante las fórmulas explicadas en la sección 3.7.1. Posteriormente los extractos crudos obtenidos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC-ELSD-DAD (Agilent 1200) para identificar los compuestos extraídos; las muestras se prepararon siguiendo la metodología descrita en la sección 3.7.4. La cuantificación de SLs se realizó mediante las áreas de los picos del SL C18:1 obtenidos en los cromatogramas resultantes de los análisis de HPLC.

3.8.2 Sistemas de dos fases acuosas

La extracción de SLs por sistemas de dos fases acuosas (ATPS) se hizo en 5 sistemas de 10 g de diferente composición de alcohol y sal (etanol:sulfato de amonio) por triplicado. El sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) se preparó al 35% p/p (35 g de sulfato de amonio y 65 g de H₂O desionizada) y pH 5.6. Los ATPS se prepararon en tubos graduados de 15 mL. Los experimentos se realizaron en dos fases. La composición de los sistemas se presenta a detalle en el capítulo 6 correspondiente a la extracción con ATPS. En la primera, se construyeron los sistemas agregando 1 g del extracto de SLs sin evaporar (SE) obtenido de la extracción con etanol a 25°C (sección 3.8.1), después de adicionar el SE, los sistemas fueron mezclados manualmente por inversión durante 1 minuto y se dejaron reposar en posición vertical hasta la formación de las dos fases. En la segunda fase los sistemas se construyeron agregando 0.5 g de sólido fermentado triturado (SFT) como muestra, el cual tenía un 46% de humedad. Los sistemas fueron agitados en un vórtex a 1250 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Del mismo modo, se prepararon sistemas blancos (sin extracto ni SFT), los cuales fueron tratados y analizados bajo las mismas condiciones de operación. Posteriormente para la separación de las fases las muestras fueron centrifugadas durante 2 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente para la formación de las dos fases. Se midieron los volúmenes de cada una de éstas, sin contar el volumen de la interfase (fase formada entre la fase inferior y superior conteniendo los SF) para calcular la proporción de los volúmenes de las fases según la fórmula 17. Finalmente, se extrajeron dichos volúmenes de las fases con ayuda de una micropipeta para su posterior análisis mediante HPLC (Semipreparativo Agilent 1100). Todos los análisis fueron realizados por triplicado. La cuantificación de SLs se realizó mediante las áreas de los picos del SL C18:1 obtenidos en los cromatogramas resultantes de los análisis de HPLC.

$$V_R = \frac{FS}{FI} \quad [17]$$

Donde

VR: Proporción de fases

FS: Volumen de la fase superior

FI: Volumen de la fase inferior

3.8.3 Extracción de soforolípidos con fluidos supercríticos

La extracción de SLs mediante fluidos supercríticos (FSC) se realizó al SF, el cual, previamente fue liofilizado para eliminar la humedad contenida; la muestra fue utilizada para la extracción usando un extractor de dióxido de carbono supercrítico (Thar 1000 F, Thar Technologies, Inc., Pittsburgh, PA) y se complementó con un co-solvente (etanol al 96 %) para la extracción eficaz de los compuestos polares que no se extraen con el CO₂ cuya polaridad es similar a la del hexano (Figura 3.15). Se utilizaron 50 g de muestra los cuales se colocaron en el recipiente de extracción, el cual es cerrado herméticamente (Figura 3.15c). Se evaluaron 3 niveles de presión (100, 200 y 300 bar) a una temperatura constante de 40°C, un flujo de co-solvente 10 g/min (etanol al 96%) y un caudal de CO₂ de 40 g CO₂/min. El tiempo total de extracción fue de 50 minutos y se realizó una cinética de 5 fracciones (recolectando los extractos cada 10 minutos). Al finalizar los 50 minutos de extracción se hizo una purga con el co-solvente y se aumentó el flujo de CO₂ para hacer la limpieza del sistema y recolectar la fracción restante.

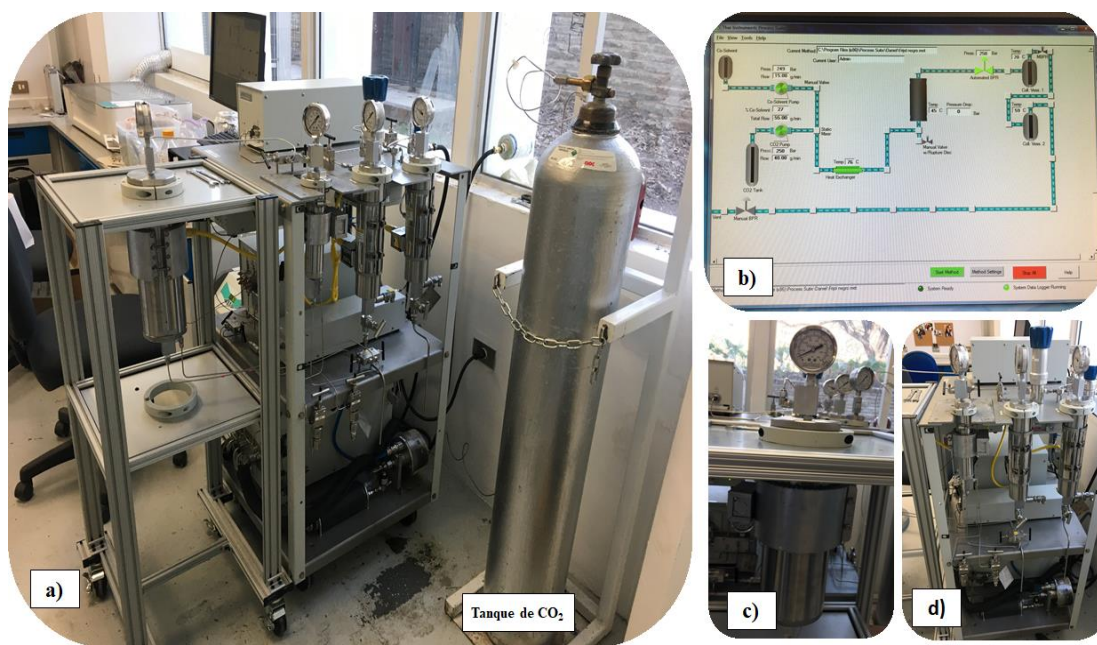


Figura 3.15. a) Equipo fluidos supercríticos. b) Software para control de parámetros. c) Recipiente de extracción herméticamente cerrado. d) Colector y/o salida de extractos

Al finalizar el proceso, el solvente presente en los extractos obtenidos fue evaporado mediante la aplicación directa de N₂ durante 24 h, se almacenaron a -80°C y después se

lioofilizaron durante 24 h (Labconco Freezone 12) para posteriores análisis. Una vez liofilizados, los extractos concentrados se utilizaron para analizarlos por cromatografía HPLC (Semipreparativo Agilent 1100) preparando las muestras según la sección 3.7.4. La separación de moléculas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución usando una columna Kinetex 2.6 μm C8 100 Å, LC 100 x 2.1 mm. El gradiente de elución que se utilizó fue de acetonitrilo/agua 50/50 (v/v) a acetonitrilo/agua 100/0 (v/v) durante 26 minutos a un caudal de 0.2 mL min⁻¹. La cuantificación de SLs se realizó a partir de las áreas de los picos del SL C18:1 obtenidos en los cromatogramas resultantes de los análisis de HPLC.

3.8.4 Métodos específicos para determinación de impacto ambiental del proceso

Es de gran importancia determinar el impacto ambiental que tiene el proceso de FES en la producción de SLs, para esto se evaluaron tanto las emisiones gaseosas que hay durante el proceso como la capacidad que tienen los sólidos residuales para ser degradados y generar biogás y metano.

3.8.4.1 Determinación de emisiones gaseosas

Durante el proceso de fermentación se determinó la concentración de diferentes compuestos gaseosos que se producen a lo largo del proceso. Se determinaron los compuestos orgánicos volátiles (COVs), amoníaco (NH₃), ácido sulfhídrico (H₂S) y metano (CH₄). Primero, se midieron las concentraciones de COVs, NH₃ y H₂S, para ello se adaptó a la salida de gases del reactor una conexión dirigida a una caja herméticamente cerrada con los analizadores portátiles de emisiones (Figura 3.16). Los COVs se midieron con el analizador portátil MiniRae 300 PID equipado con una lámpara de 9.8 eV (RAE Systems MiniRAE 3000, San José, CA, USA), con un rango de detección de COVs de 0.1 a 15,000 ppmv. Por otro lado, el NH₃ y H₂S se midieron con el analizador portátil IBrid MX6 (Industrial Scientific Corporation, USA) con un rango de detección de NH₃ de 0 a 500 ppmv; resolución 1 ppmv y de H₂S de 0 a 500 ppm; resolución 0.1 ppmv. Los gases se dejaron pasar hacía el sistema de medición de emisiones durante un tiempo de residencia, el valor de concentración de los gases se registró una vez que se mantuvo estable.



Figura 3.16. Izquierda: Reactor de 22 L acoplado al sistema para medición de emisiones.

Derecha: Analizadores portátiles para medir COVs, NH₃ y H₂S

Para el análisis de CH₄ y N₂O se tomaron muestras de gas en bolsas de muestreo de aire Tedlar de 1 L, las bolsas se llenaron y vaciaron 2 veces, siendo la tercera muestra la utilizada para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases (CG) Agilent Technologies 6890N (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU) equipado con un detector de ionización de llama y un detector de captura de electrones para la detección de CH₄ y N₂O respectivamente. La columna usada fue una columna Agilent Technologies HP-LOT W semi-capilar (30 m x 0.53 mm x 40.0 μm) usando N₂ como gas portador a una presión de 2 psi y una post columna Agilent Technologies trampa de partículas (2 m, n° 5181-3352). El volumen de inyección de muestras fue de 500 μl. Las condiciones para medir los gases fueron las siguientes; para el CH₄ la temperatura de inyección fue de 240°C, una temperatura de 250°C del detector y el horno a 60°C, durante un tiempo de análisis de 4 minutos. Para el N₂O la temperatura del inyector fue de 120°C, el detector a 345°C y el horno a 60°C, con un tiempo de análisis de 6 minutos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.8.4.2 Ensayo de potencial de producción de biogás

Se realizó un análisis de potencial de producción de biogás (BMP) a los sólidos residuales de la extracción de SLs, para esto, se recolectaron las muestras sólidas después de la extracción de SLs con acetato de etilo, y fueron utilizadas como sustrato en la prueba de biogás; cuando fue necesario el solvente residual se evaporó usando un evaporador rotatorio. El inóculo que se utilizó fue un lodo activado anaerobio procedente de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales de Sabadell, Barcelona. El inóculo y los sustratos fueron caracterizados

según los métodos antes descritos (The US Department of Agriculture and The US Composting Council, 2001), se analizaron el pH y el contenido de MO a partir de los sólidos totales o materia seca (MS) y la materia orgánica (MO), La prueba para la determinación del potencial metanogénico (PM) se realizó con base a los procedimientos descritos por Ferrer *et al.* (2008) (Figura 3.17). El inóculo se mantuvo en proceso de desgasificación por 5 días a 37°C. Se utilizaron reactores de 250 ml (botella de vidrio) que constaban con un septo hermético de clorobutilo, especial para punción, para la toma de muestras de biogás. Se realizó una mezcla Inóculo: Sustrato (I:S) con una relación 2:1, la mezcla constó de 150 ml de inóculo y 1.7 g sólidos volátiles (SV). Así mismo, se realizó un ensayo de referencia que contenía únicamente inóculo, para determinar el biogás procedente del inóculo y un ensayo control, que además de inóculo contenía 0.48 g de celulosa con el objetivo de asegurar la calidad del inóculo. (Ferrer *et al.*, 2008). Las botellas se purgaron con nitrógeno durante 30 segundos y se cerraron herméticamente para crear un entorno anaerobio. Los reactores se incubaron a 37°C durante un período de 43 días. El biogás producido en las botellas se midió a lo largo del ensayo utilizando un manómetro digital (SMC ZSE30, Japón) para determinar la presión de biogás acumulado en el interior del reactor. El valor de presión se convirtió a volumen de biogás mediante la fórmula 18. Así mismo para la cuantificación de metano se tomaron muestras de 100 µL de gas para determinar el contenido de CH₄ y CO₂ utilizando un cromatógrafo de gases (CG5890Emp), los resultados fueron expresados en ml de metano por g⁻¹ SV. Los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\mathbf{Biogás} = \frac{(\Delta P * V_{ca} * T_{amb})}{(1.013 * T_{med})} \quad [18]$$

Donde:

Biogás: volumen de biogás producido (ml).

DP: Incremento de presión (bar).

T_{amb}: Temperatura standard (298°K) o Temperatura normal (273°K)

1.013: Factor de conversión de atm. a bar.

T_{med}: Temperatura ensayo (310°K).

V_{ca}: volumen de espacio vacío en el reactor (ml).

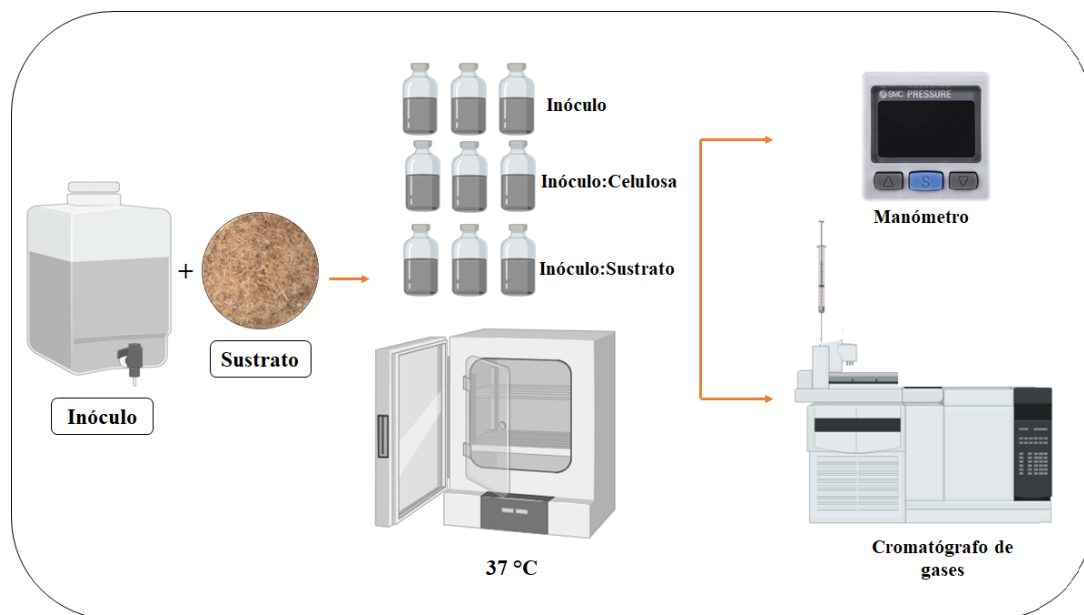


Figura 3.17. Esquema experimento test de digestión anaerobia del residuo de la paja fermentada.

Capítulo IV

PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO USANDO AGRORESIDUOS Y MATERIALES INERTES COMO SOPORTE.

Parte de este capítulo fue presentado como poster en el 7th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation. Julio, 2018, Praga, Republica Checa. Screening of support materials for the production of sophorolipids through solid state fermentation. Rodríguez Alejandra, Font, X., Gea, T.

Parte de este capítulo se encuentra publicado en la revista Waste and Biomass Valorisation. 1-14. Agro-wastes and inert materials as supports for the production of biosurfactants by solid-state fermentation. Rodríguez, A., Gea, T., Sánchez, A., Font, X. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01148-5>.

Resumen

El presente capítulo está conformado por un completo estudio que explora 9 diferentes materiales (biomateriales o agro-residuos y materiales inertes) para ser usados como soporte en fermentación en estado sólido para la producción de SLs con la levadura *Starmerella bombicola* ATCC 22214. Como sustratos se utilizaron el residuo de winterización del aceite de girasol y melazas de remolacha azucarera. Los biomateriales tuvieron mejores resultados en comparación con los materiales inertes. Los rendimientos más altos se obtuvieron con la cascara de arroz (0.15 g SL g⁻¹MS) y la paja de trigo (0.20 g SL g⁻¹MS). Los SLs obtenidos en la fermentación con cada soporte se caracterizaron por HPLC-MS, encontrándose que el tipo de SL predominante en la mezcla de SLs fue la forma Lactónica C18:1. Posteriormente, se realizó una cinética del proceso de fermentación con los tres materiales que mostraron mejores resultados. En este caso la paja y cáscara de arroz resultaron ser los mejores materiales para producir SLs. Se encontró una correlación proporcional entre el rendimiento y el consumo de oxígeno acumulado, lo que se sugiere que éste puede ser utilizado como una medida indirecta para medir la producción de SLs por fermentación en estado sólido. Por otro lado, se realizó un análisis para comparar el rendimiento del residuo de winterización con tierras de decoloración; los resultados demostraron que el residuo de winterización es el que mantiene un mejor rendimiento.

4.1 Materiales

Los sustratos y materiales descritos en la sección 3.2 y 3.3 fueron utilizados para la evaluación de diferentes soportes para la producción de SLs. Se seleccionaron 9 materiales los cuales fueron clasificados en dos grupo según su naturaleza; el primer grupo en biomateriales: cáscara de arroz (CA), paja de trigo (PT), fibra de coco (FC) y corteza de pino (CP) y el segundo grupo en materiales inertes: perlita (PR), arcilla (AR), arcilla volcánica (AV), espuma de poliuretano negra (EN) y espuma de poliuretano amarilla (EA); la Figura 4.1 muestra la apariencia de cada uno de los materiales.

Como sustratos para los experimentos se utilizaron la melaza de remolacha azucarera (MEL) y el residuo de winterización del aceite de girasol (WOC) el cual es un residuo rico en grasas que se obtiene del enfriamiento del aceite de girasol (5°C por 24 h) seguido por la eliminación de ceras por filtrado con perlita, este residuo presenta un alto contenido de grasas, normalmente entre el 60-70% de grasas de las cuales el 81% corresponde a ácido oleico (C18:1), el 8% a ácido linoleico (C18:2), el 4% a ácido palmítico (C16:0), el 3 % a ácido esteárico y el 4% corresponde a las ceras (Tesis Jiménez Peñalver, 2017), sin embargo, presentó una variación en el contenido de grasas de 73% (en los experimentos de evaluación de los soportes) a 44 % en los experimentos correspondientes a la cinética de producción de SLs), esta variación se debió a una serie de modificaciones que la empresa implementó en el proceso de producción del aceite, lo cual disminuyó el contenido de grasas. En la evaluación de sustratos, adicionalmente al WOC se utilizaron tierras de decoloración (TD) el cual es un residuo que se obtienen de proceso de purificación y decoloración del aceite, las cuales tenían un porcentaje de grasa del 37%.

4.2 Condiciones experimentales

Los experimentos de este capítulo están conformados en tres etapas: evaluación de soportes, selección de soporte y evaluación de sustratos (Figura 4.1).

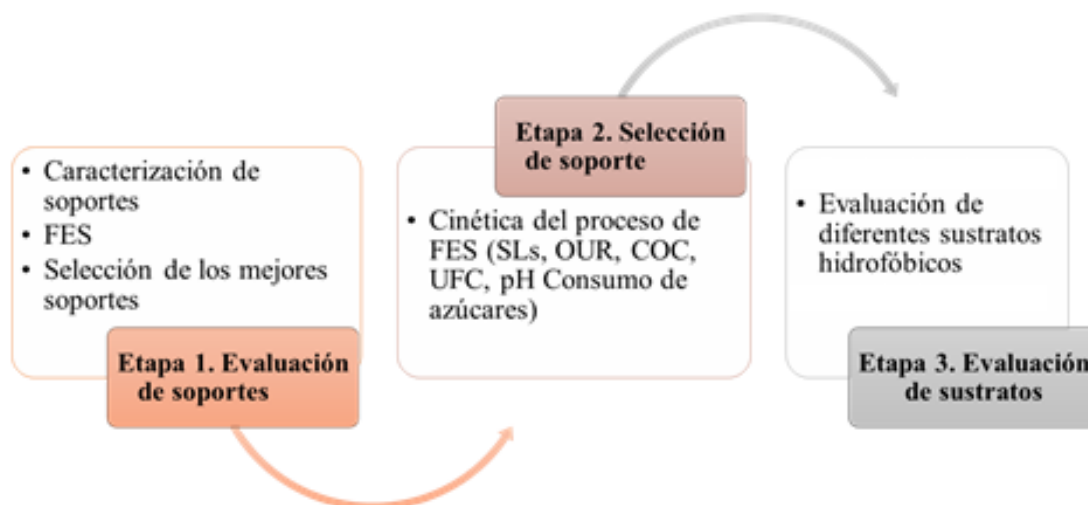


Figura 4.1. Diagrama de las etapas y experimentos descritos en el presente capítulo.

En la primera etapa, enfocada a la evaluación de los diferentes soportes para la producción de SLs por FES con *Starmerella bombicola*, se realizó, en primer lugar, la caracterización de todos los materiales siguiendo las metodologías descritas en la sección 3.6 correspondientes al pH, humedad (HU), materia seca (MS), materia orgánica (MO), densidad aparente (DAP), porosidad y capacidad de retención hídrica (CRH), contenido de grasas, análisis elemental (H, C, N, S). Así mismo, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar su estructura y rugosidad. Para los experimentos de evaluación de sustratos mediante FES se seleccionaron los materiales que resultaron con una CRH por encima de 1 g de agua retenida por g de material. Este valor fue seleccionado debido a que a niveles menores al 50% de humedad, la actividad biológica en los procesos de FES se ve afectada negativamente (Barrios-González *et al.*, 2012 y Chen, 2013). Las fermentaciones se llevaron a cabo según lo descrito en el capítulo 3 sección 3.4.1 en reactores cilíndricos de 0.5L. La Tabla 4.1 muestra las cantidades añadidas en los reactores con cada uno de los materiales y sustratos. Se calculó la cantidad de cada soporte según su DAP para un volumen de trabajo de 0.4 L; los componentes hidrofílicos fueron añadidos en una relación 1:4:1 (MEL:Agua:Inóculo) y el WOC (compuesto hidrofóbico) se agregó en una relación de 4:1 (WOC:MEL). Las proporciones de los componentes del medio de cultivo fueron calculadas según los datos optimizados previamente por Jiménez-Peñalver *et al.* 2016. La mezcla fue esterilizada a 121°C durante 30 minutos y después inoculada con la cepa *S. bombicola* (sección 3.1.2). Los reactores fueron incubados en un baño termostático a 30°C y suplementados con 30 mL min⁻¹

¹ de aire humidificado durante 7 días. La OUR y el COC fueron calculados a partir de lo descrito en el capítulo 3 sección 3.5.1 y 3.5.2. Después del tiempo de fermentación los reactores se desconectaron y abrieron para su análisis. El sólido fermentado fue homogenizado y se tomaron muestras para medir el pH, el rendimiento de SLs (extracción con acetato de etilo 1:10 p/v), humedad y materia seca siguiendo la metodología del capítulo 3, sección 3.6. Así mismo, se tomaron muestras las cuales fueron tratadas para ser analizadas por SEM (capítulo 3, sección 3.6.9).

Tabla 4.1 Composición de las mezclas para las fermentaciones en los reactores de 0.5 L.

Material	Soporte (g)	MEL (g)	WOC
Paja de trigo	14	5.8	23.2
Cáscara de arroz	47	5.4	21.5
Fibra de coco	23	5.8	23.3
Perlita	50	9	36
Espuma negra	13	9	36
Espuma amarilla	12	9	36

La segunda etapa consistió en la evaluación de los tres soportes que tuvieron los mejores resultados en la etapa uno. El análisis consistió en el monitoreo de la fermentación para la producción de SLs a las 24, 48, 72, 120, 144 y 168 h; se prepararon 6 reactores y se sacrificó uno cada día de muestreo para analizar el contenido de SLs, OUR, COC, consumo de glucosa y el crecimiento de colonias (UFC) durante el proceso.

La tercera etapa consistió en hacer una evaluación para comparar la producción de SLs utilizando otro residuo hidrofóbico y CA como soporte; se analizaron las TD y el WOC, la fermentación se llevó a cabo durante 5 días en los reactores de 0.4 L. Esta última etapa se realizó en colaboración con la estudiante Margalida Servera Monserrat del Máster en Ingeniería Biológica y Ambiental

4.3 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas a un nivel de confianza de $p < 0.05$. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Minitab 17

(Minitab Inc.). Las correlaciones entre el rendimiento de SLs y COC se realizaron mediante la correlación de Pearson.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Caracterización de materiales biológicos e inertes

Los 9 materiales que se caracterizaron fueron seleccionados de acuerdo con una revisión de literatura. La tabla 4.2 muestra los resultados de la caracterización. La humedad (HU) y la capacidad de retención hídrica (CRH) son dos de los parámetros más importantes en FES ya que el bajo contenido de agua en el sistema limita el crecimiento de los microorganismos y puede afectar la actividad biológica (Dorado *et al.*, 2010); mientras que un contenido de humedad alto puede disminuir la porosidad e incrementar el riesgo de contaminación del sistema (El Barky *et al.*, 2015). Las espumas de poliuretano fueron los materiales que presentaron el valor más alto de capacidad de retención hídrica en un rango de 10.1 y 11.9 g de agua por gramo de material. La paja de trigo (PT), perlita (PE), fibra de coco (FC) y cáscara de arroz (CA) mostraron valores de 1 a 3.5 g por gramo de material. Finalmente, la arcilla (AR), arcilla volcánica (AV) y la corteza de pino (CP) mostraron unos valores muy bajos (por debajo de 0.5 g por g de material) lo cual nos indica que estos materiales no son capaces de retener la suficiente agua para el apropiado crecimiento de *S. bombicola*. La CP mostró el mayor porcentaje de humedad (15%), seguido por la CA (12.7%), el resto de los materiales presentaron valores por debajo del 10% mientras que la EN y EA no presentaron humedad. Aunque la CRH es un parámetro clave para evaluar el comportamiento de los soportes, el contenido de humedad es importante para el proceso FES y para determinar tanto las necesidades de agua como los costes del proceso.

Por otro lado, la porosidad es también uno de los parámetros más importante en términos de aireación y disponibilidad de nutrientes. A altas porosidades, el oxígeno se distribuye homogéneamente, asegurando un ambiente aerobio (Chen *et al.*, 2013; Cerda *et al.*, 2018)). Por el contrario, la baja porosidad de los materiales puede propiciar zonas con baja oxigenación en el reactor, limitando la producción de SLs. La porosidad de los materiales evaluados se observó en un rango de 44 a 93%, donde la AR y FC presentaron los valores más altos. Por ejemplo, para la producción de aromas con bagazo de caña de azúcar se

reportaron valores entre el 73-78% (Martínez *et al.*, 2017). Por otro lado, a una escala pequeña (sistemas de 100 x 15 mm en placas de Petri), reportaron una porosidad de 12.8% como un buen valor para producir enzimas con aceite de palma por FES con diferentes especies de *Aspergillus* (Roslan *et al.*, 2018), sin embargo, probablemente esta baja porosidad puede que no sea suficiente en el momento de escalar el proceso. Rahardjo *et al.* 2005 reportaron un incremento en el rendimiento de α -amilasas cuando se incrementó la porosidad en el sistema de producción. Esto nos indica que nuestros valores se encuentran dentro de los rangos de porosidad comúnmente reportados con buenos resultados. Por otro lado, todos los materiales presentaron alto contenido de materia orgánica, con la excepción PE, AR y AV ya que son materiales inorgánicos. En todos los casos, el contenido de grasa fue muy bajo, y el rango de pH entre 5.5 y 9.0. El contenido de C, H, N y S de cada material se presenta en la tabla 4.2, en nuestro sistema estos materiales actúan solamente como soporte físico por lo que el C y N insoluble no estarán disponibles para la levadura (Rosa y Lachance 1988), por lo tanto, estos elementos necesarios para que produzcan SLs se añaden como sustratos (WOC, MEL) en el sistema de FES.

Finalmente, la rugosidad de la superficie de los materiales es también uno de los factores clave, ya que permite y favorece que los microorganismos se fijen en el soporte (El Dorado *et al.*, 2010; Kilonzo *et al.*, 2011) facilitando su crecimiento en las condiciones de FES en las que se encuentra. Por esta razón, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) la rugosidad de la superficie de todos los materiales. La Figura 4.2 muestra la morfología de los materiales, observándose que los biomateriales (PT, CA, FC, CP) y algunos materiales inertes (AV y AR) presentan una superficie rugosa en la que la levadura podría fijarse bien, mientras que el resto de los materiales inertes (PE, EN, EA) presentan una superficie mucho más lisa. A pesar de ello, los materiales inertes presentan una estructura macroscópica de poros abiertos, lo cual podría resultar beneficioso, ya que este hecho ha sido señalado como un factor clave en los procesos de biofiltración de gases. Se ha demostrado que una estructura de poros abiertos ayuda a capturar agua para la formación de la biopelícula, lográndose mayores eficiencias (Gabriel y Deshusses *et al.*, 2003).

Para los fines del presente estudio se seleccionaron los materiales con CRH mayor o igual a 1 g de agua por g de materia húmeda, con la finalidad de asegurar una humedad adecuada

durante el proceso de fermentación. Por lo que la PT, CA, FC, PE, EN y EA fueron los materiales seleccionados como soportes para evaluar la producción de SLs por FES, descartándose AR, AV y CP.

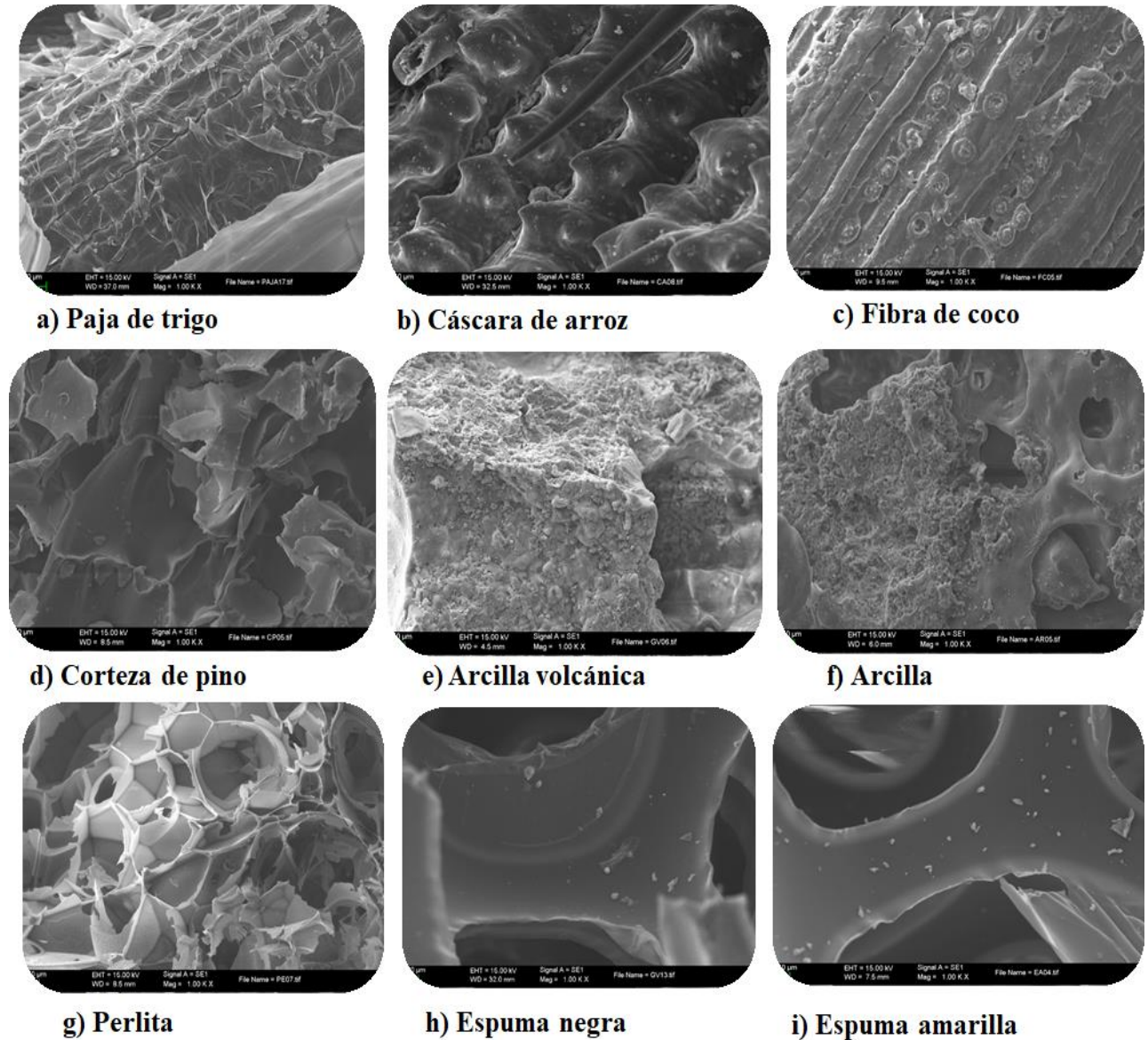


Figura 4.2. Imágenes SEM de los materiales. Biomateriales: a), b) c) d). Materiales inertes e), f), g) h) i).

Tabla 4.2. Principales características de los diferentes materiales. La capacidad de retención hídrica (CRH) se expresa en base húmeda y la composición elemental se expresa en porcentajes en base a materia seca.

Material	pH	Humedad %	Materia seca %	Materia orgánica %	Contenido de grasas %	Densidad aparente g L ⁻¹	Porosidad %	CRH gH ₂ O/g MH	H %	C %	N %	S %
Cascara de arroz	7.2	12.7	87.3	83.4	0.9	117.6	62.6	1.0	41.0	5.2	0.5	<0.1
Paja de trigo	7.2	5.6	94.4	95.5	1.4	35.2	72.1	3.5	44.2	5.8	0.5	ND
Fibra de coco	5.6	8.7	91.3	98.6	0.3	54.4	86.5	1.2	47.6	5.8	0.2	ND
Corteza de pino	4.6	14.5	85.7	97.7	0.5	183.5	47.0	0.4	52.1	5.1	1.7	ND
Perlita	7.3	0.4	99.6	1.3	0.0	122.7	44.1	2.0	ND	0.2	ND	ND
Espuma negra	6.9	0.0	100	100	0.5	16.3	59.5	11.9	68.5	8.0	7.2	ND
Espuma amarilla	7.0	0.0	100	100	0.9	15.9	64.3	10.1	66.0	8.2	6.4	ND
Arcilla	9.0	0.4	99.6	0.5	0.5	221.5	93.2	0.2	0.2	ND	ND	ND
Arcilla volcánica	8.8	6.3	93.7	2.1	0.0	1071.6	50.4	0.1	0.3	0.2	ND	ND

*ND: No detectable

4.4.2 Producción de soforolípidos en FES con diferentes materiales de soporte

Los rendimientos de los SLs producidos después de 7 días de fermentación con cada uno de los soportes seleccionados se muestran en la Figura 4.3. Los valores más altos fueron obtenidos cuando se usaron biomateriales como soporte (PT, FC y CA), mientras que con los materiales inertes (EN y EA) se reportaron los niveles más bajos. Esto es muy interesante ya que esos biomateriales son principalmente residuos agroindustriales, por lo que contribuyen a hacer el proceso de producción de SLs más rentable y sostenible, lo que le permitiría a nuestro proceso ajustarse en el marco de la economía circular.

La producción volumétrica de SLs para CA y PT no tuvo diferencia significativa entre sí, con valores de 24.90 y 20.5 g SL L⁻¹, respectivamente. El valor para FC (14.18 g SL L⁻¹) fue más bajo y estadísticamente similar al de la PE, mientras que las espumas presentaron los rendimientos más bajos. Como se explicó en la sección 4.2 cada sistema de FES fue preparado de acuerdo a la densidad de cada uno de los soportes para tener un volumen de 400 mL en el reactor, los sustratos y el agua que se agregaron para tener un 75% de la CRH, por lo que cada set de experimentos tenía cantidades diferentes de soporte y sustrato. Este hecho explica por qué algunos materiales presentaron mayores rendimientos volumétricos pero menores rendimientos por gramo de sustrato o por gramo de materia seca, cuando se compararon unos con otros, por ejemplo, la densidad aparente de la CA es 3.3 veces mayor que la de la PT, sin embargo, la PT tiene una CRH 3.5 veces más alta. Esto significa que se usaron cantidades similares de sustratos en ambos sistemas de fermentación, sin embargo, la masa total de la PT fue mucho menor que la de CA. Por esa razón, aunque se obtuvo un mayor rendimiento de SLs por sustrato con la CA, se obtuvo un mayor rendimiento en masa con la PT. El rendimiento de SLs por gramo de sustrato fue estadísticamente diferente para CA (0.37 g SL g⁻¹ sustrato), PT (0.28 g SL g⁻¹ sustrato) y FC (0.19 g SL g⁻¹ sustrato).

Los materiales inertes no mostraron diferencias significativas entre sí. Los resultados con CA y PT son superiores a los valores reportaron previamente por Jiménez-Peñalver *et al.*, (2016) usando paja de trigo (0.17 g por g de sustrato en 7 días de fermentación), y aquellos reportados por Parekh y Pandit, 2012, usando glucosa y ácido oleico mezclados con fibra de trigo (0.18 g SL por g⁻¹ sustrato en 8 días). El mayor rendimiento obtenido de SLs por gramo

de materia seca fue usando PT ($0.20 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$), siendo estadísticamente diferente de CA ($0.15 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$) y FC ($0.12 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$).

Con el uso de soportes inertes se obtuvieron los rendimientos más bajos de SLs comparado con aquellos obtenidos con biomateriales. No se encontraron diferencias significativas entre estos valores. La PE mostró un rendimiento 10.0 g SL L^{-1} , 0.09 g SL g^{-1} sustrato, y $0.06 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$. Finalmente, la EA mostró rendimientos de 6.9 g SL L^{-1} y 0.06 g SL g^{-1} sustrato y $0.03 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$. Solamente se ha encontrado una referencia en la producción de SLs por FES usando materiales inertes como soporte (Jiménez-Peñalver *et al.* 2018). En dichos experimentos se usó ácido esteárico mezclado con melazas y espumas de poliuretano como material de soporte, obteniéndose valores de 0.18 g SL g^{-1} sustrato a 7 días de fermentación.

En la producción de RLs, Gong *et al.* (2020), obtuvieron un mayor rendimiento cuando usaron espumas de poliuretano que usando cáscara de arroz o bagazo de caña de azúcar y aceite de palma como sustrato. Los buenos resultados obtenidos por estos autores, a diferencia a los obtenidos en el presente trabajo utilizando materiales inertes, pueden ser debidos a que los sustratos hidrofóbicos que utilizaron eran sustratos puros, como el ácido esteárico y el aceite de palma, a diferencia de nuestro estudio donde como fuente hidrofóbica utilizamos un residuo del proceso de winterización del aceite de girasol (WOC). Para facilitar la filtración se añade perlita, que está presente en el residuo de WOC en cantidades significativas, la cual pudo haber obstruido los poros de las espumas de poliuretano, reduciendo la disponibilidad de la superficie de contacto de la levadura con el medio de cultivo y limitando la fermentación.

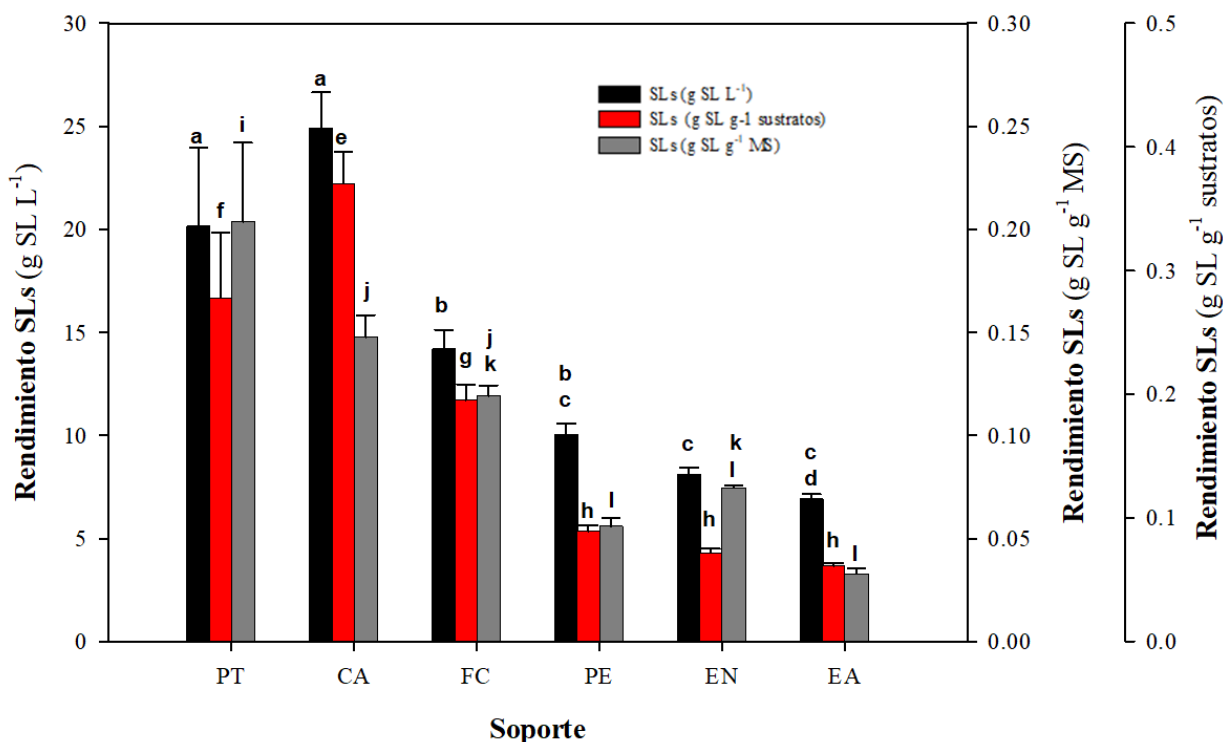


Figura 4.3. Rendimientos de SLs obtenido en el día 7 de fermentación con los diferentes materiales para FES: paja de trigo (PT); cáscara de arroz (CA); fibra de coco (FC); perlita (PE); espuma negra (EN); espuma amarilla (EA). Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas a un valor de $p < 0.05$.

La actividad biológica durante la fermentación fue medida mediante la sOUR y el COC (Figura 4.4). Los valores máximos de sOUR se presentaron después de las 48h con los biomateriales PT y CA (2.91 y 1.57 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ respectivamente), y un COC de 309.37 mg O₂ g⁻¹MS en la PT y de 160.43 mg O₂ g⁻¹MS en la CA. En contraste, los valores más bajos fueron obtenidos con las espumas de poliuretano, EN (0.41 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹) y EA (0.44 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹) y un COC de 51.83 mg O₂ g⁻¹MS en la EN y 53.59 mg O₂ g⁻¹MS en la EA.

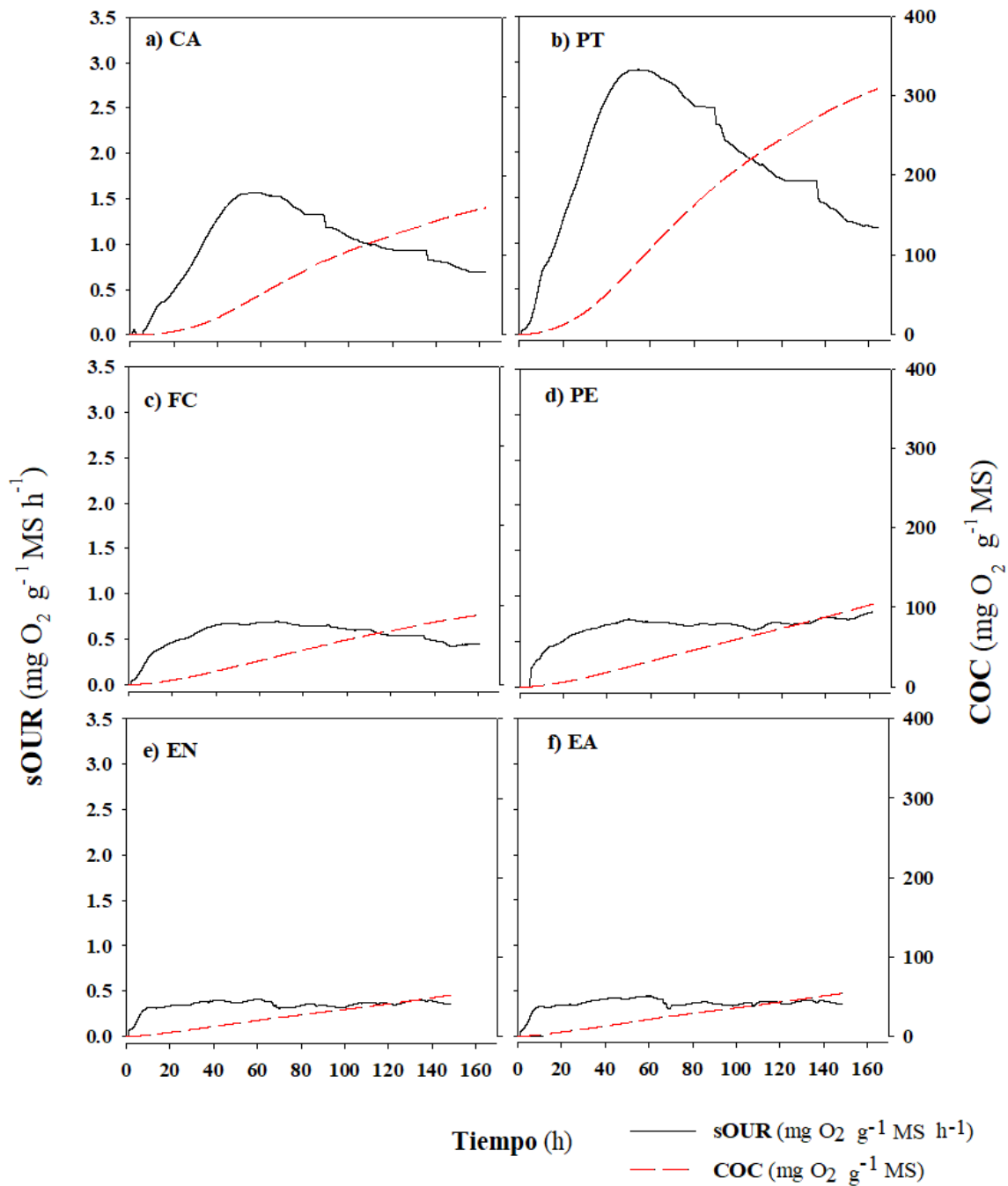


Figura 4.4. Perfiles de sOUR y COC de los biomateriales y materiales inertes durante los 7 días de fermentación. a) Cáscara de arroz, b) Paja de trigo, c) Fibra de coco, d) Perlita, e) Espuma de poliuretano negra, d) Espuma de poliuretano amarilla.

Después del proceso de fermentación los materiales fermentados se analizaron por SEM. La Figura 4.5 demuestra que, a pesar de que *S. bombicola* es un microorganismo que no forma biopelículas, es capaz de crecer en todos los soportes después de 7 días de fermentación. Como se mencionó anteriormente los mayores rendimientos se obtuvieron con los biomateriales; esto coincide también con los valores de sOUR y COC en donde la PT y CA muestran los mejores resultados y una evidente colonización del soporte por parte de la levadura. Estos resultados coinciden con Kilonzo *et al.*, 2011, en donde reportan que los biomateriales presentan una estructura y rugosidad que favorece la fijación de microorganismos en los soportes que, en combinación con las condiciones óptimas, permitirá obtener un mayor rendimiento en la producción. Aunque el uso de soportes inertes permite manipular el medio de cultivo y evitar que la naturaleza (contaminación por otros microorganismos) pueda tener alguna interferencia en el proceso (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995), en nuestro caso los materiales inertes presentaron muy poco crecimiento de la levadura (Figura 4.5).

Así mismo, es muy importante diferenciar si el biomaterial va a actuar solo como soporte físico o si también se biodegrada a lo largo de la FES. En el caso de la producción de SLs por *S. bombicola*, los materiales lignocelulósicos actúan solo como soporte ya que esta levadura no tiene la capacidad de asimilar compuestos de la degradación de la lignocelulosa, como la celobiosa (Rosa y Lachance, 1998). Por lo tanto, las diferencias de rendimiento encontradas entre los biomateriales y los soportes inertes no pueden ser causadas por la disponibilidad de nutrientes de los biomateriales en los experimentos de FES.

Estos resultados confirman que la selección de soporte es un factor clave en los procesos de FES, ya que se ha demostrado que la producción de SLs varía en función del soporte seleccionado. En el presente estudio, los biomateriales cáscara de arroz y paja de trigo, presentaron los mejores resultados para ser utilizados como matriz sólida para producir soforolípidos a través de FES. Estos biomateriales son de bajo coste y muestran rendimientos más altos que los soportes inertes, como las espumas de poliuretano y la perlita que tienen rendimientos de productividad más bajos y podrían implicar mayores costes de producción. Además, otros residuos agrícolas similares disponibles en diferentes regiones funcionarían bien, ayudando así a la implementación de procesos de FES en todo el mundo.

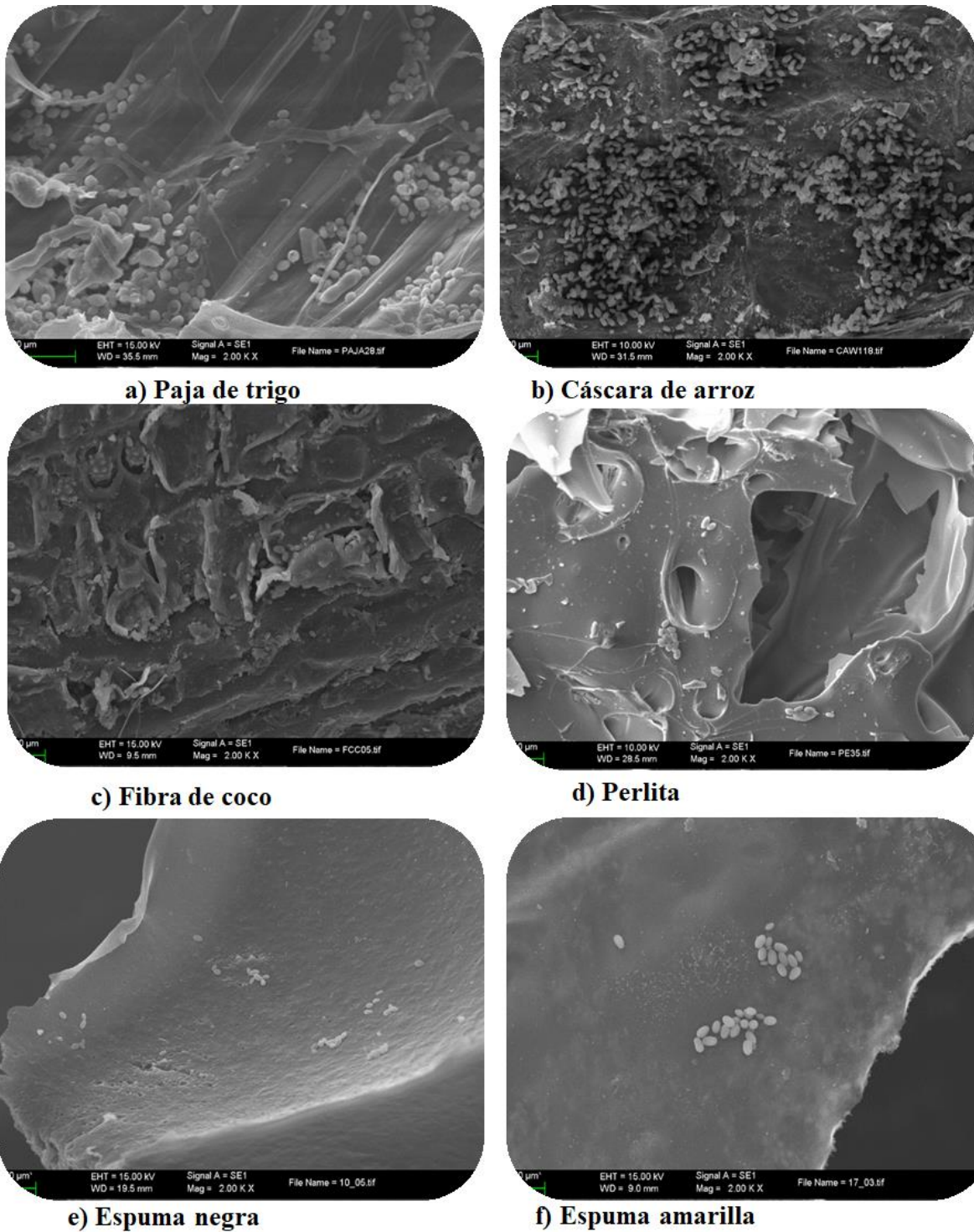


Figura 4.5. Imágenes SEM de materiales después del proceso de FES. Biomateriales: a), b), c). Materiales inertes d) e) f)

Finalmente, hay que señalar que se realizó un análisis estadístico multivariado para buscar correlaciones entre variables (características de soporte y rendimiento) y predecir si un material es un buen soporte para la producción de SLs. Sin embargo, no encontramos una correlación satisfactoria entre las características analizadas (Tabla 4.2) y la producción de SLs. Por otro lado, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual, pudo agrupar los materiales por tipos: lignocelulósicos, espumas e inorgánicos. Según sus características, la PT y la FC se agruparon en el mismo cuadrante, mientras que la CA resultó en un cuadrante diferente (Figura 4.6). El mismo comportamiento se observó con las espumas de poliuretano (EN y EA) y la perlita, sin embargo, como se discutió anteriormente, esto no es suficiente para predecir el éxito de la producción de SLs ya que tanto la paja de trigo, la fibra de coco y la cascara de arroz se desempeñaron de manera similar entre ellas, como la perlita con las espumas orgánicas. Tampoco permitió determinar cual de los parámetros, o su combinación, ejerce mayor influencia sobre la producción de SLs.

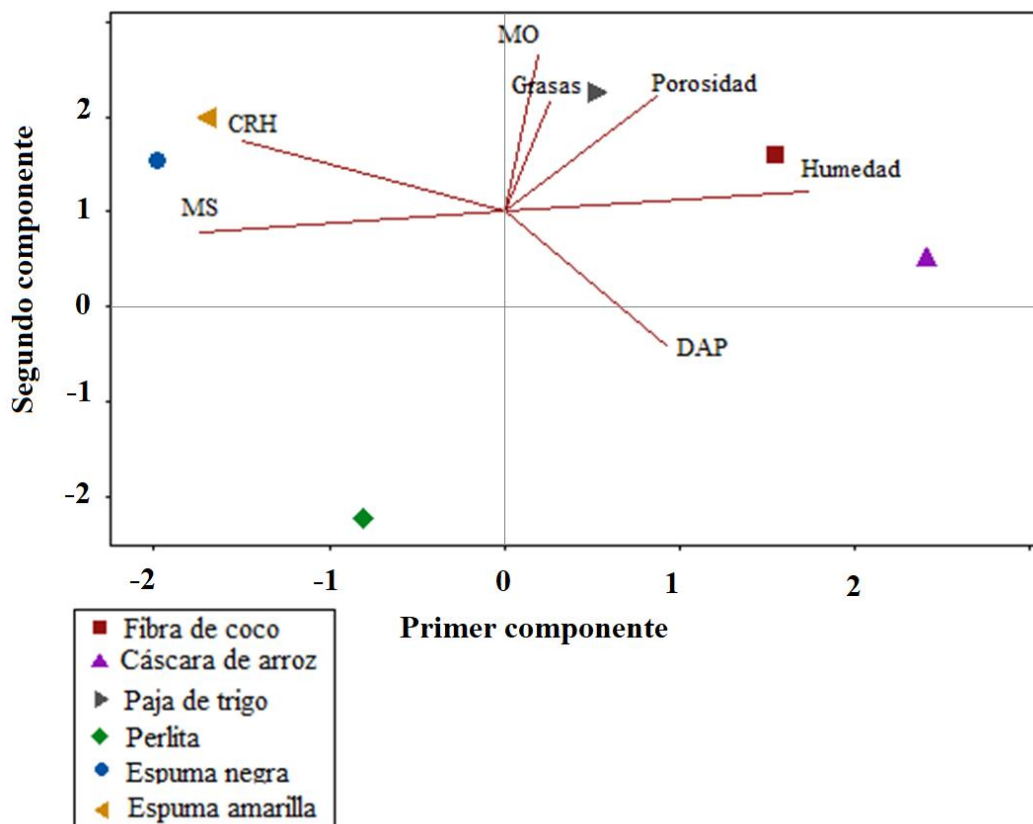


Figura 4.6. Análisis de componentes principales con las características de los diferentes materiales.

4.4.3 Caracterización de SLs por HPLC-MS

Los SLs extraídos de cada proceso de FES anteriormente descrito, fueron analizados por HPLC-MS con el objetivo de elucidar sus estructuras e identificarlas. Los SLs se separaron según su hidrofobicidad, lo cual, explica los diferentes tiempos de retención de cada tipo de SL en los cromatogramas (Figura 4.7). Los SLs de forma ácida elucidaron durante los primeros 5 minutos gracias a su baja hidrofobicidad (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019; Jadhav *et al.*, 2019), mientras que los lactónicos lo hicieron tiempo después. Como se observa en la Figura 4.7 se obtuvo una compleja mezcla de SLs tanto en forma lactónica (C18:2, C16:0, C18:1 y C18:0 con una m/z de 686, 662, 688 y 690, respectivamente), como en forma ácida (C18:0, C18:1 diacetilado, C16:0 y C18:2 con una m/z de 708, 706, 680 y 704, respectivamente) (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019).

La tabla 4.3 muestra los porcentajes de las áreas obtenidas de cada tipo de SLs identificado según el tipo de material (biomateriales e inertes). En general, la forma lactónica C18:1 fue la predominante en la mezcla de SLs en una proporción de 43.7 al 57.6% seguido de la forma ácida C18:1 en una proporción del 14.4 al 33.6 %. La fuente hidrofóbica utilizada como sustrato en las FES (WOC) está conformada principalmente por ácido oleico el cual es un ácido graso de 18 carbonos (C18:1), esta es la razón por la cual las formas C18:1 son predominantes en las mezclas de SLs. De modo similar, Jiménez-Peñalver *et al.* (2018), obtuvieron en mayor proporción la forma lactónica y ácida C18:0 como el SL más abundante ya que utilizaron ácido esteárico (C18:0) como fuente hidrofóbica.

La espuma negra fue el soporte con el mayor porcentaje de C18:1 lactónico, mientras que la paja de trigo reportó el valor más alto para C18:1 ácido. Los porcentajes muestran que el tipo de SLs mayoritario que se produce en los materiales inertes es el lactónico (EN: 82.5%, EA: 76.1 % y PE:75.1%) al igual que en los biomateriales (CA:67.0%, PT:59.2% y FC:65.8%), mientras que el tipo de SL ácido se encuentra en mayor proporción en los biomateriales (CA:33%, PT:40.8% y FC:34.5%) en comparación con los materiales inertes (EN:17.5%, EA: 23.9 % y PE:24.9%), lo cual pudiera estar relacionado con el pH del sistema (Ma *et al.*, 2011), los biomateriales presentaron un pH final ligeramente más ácido que en los materiales inertes; así mismo por la actividad biológica y el rendimiento de SLs ya que en los

biomateriales estos últimos dos valores fueron mayores en comparación con los materiales inertes.

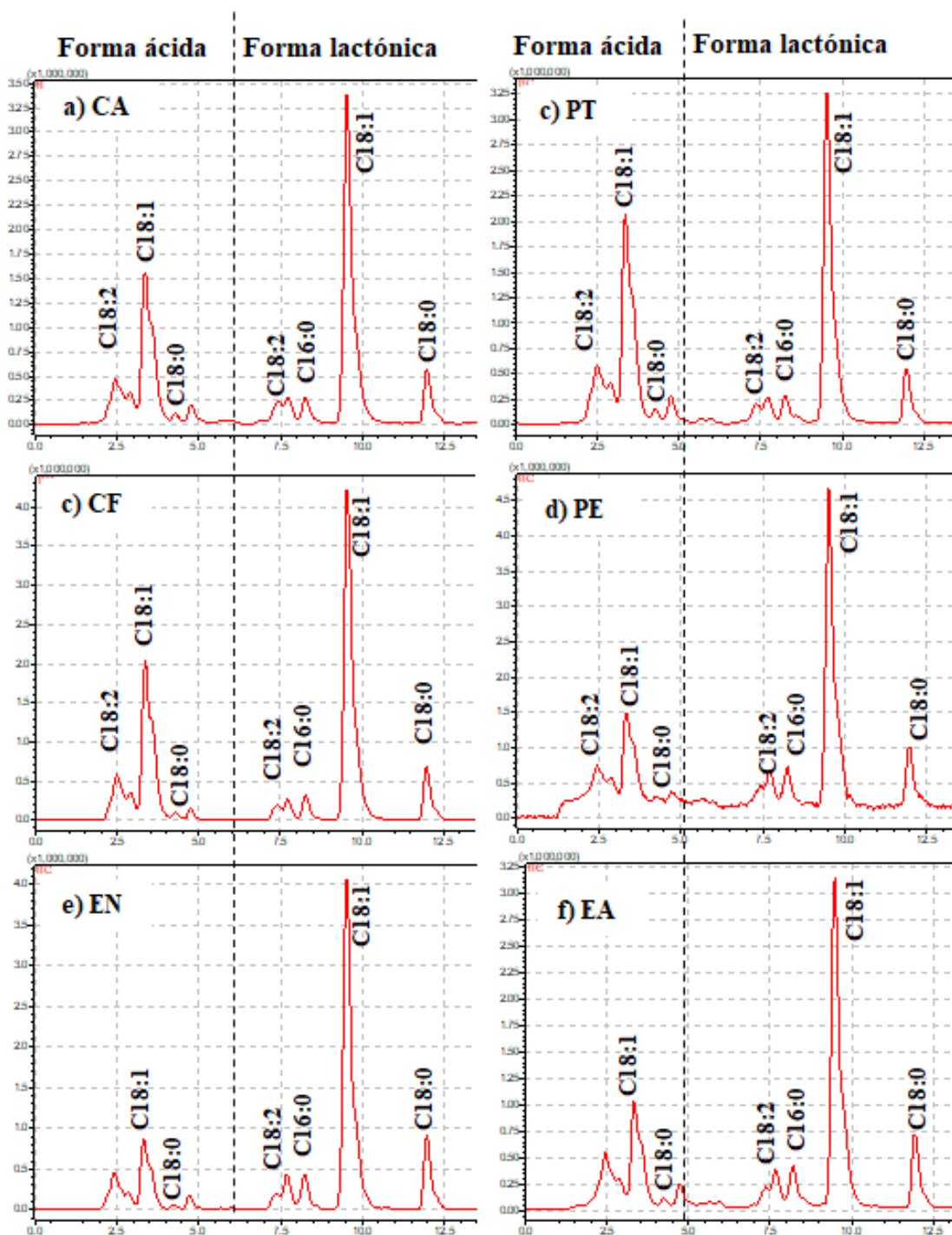


Figura 4.7. Perfil de cromatografía de iones totales (TIC) de SLs producidos a partir de diferentes materiales por *S. bombicola* en FES.

Tabla 4.3 Porcentajes de SLs ácidos y lactónicos según el tipo de soporte.

Tipo de SLs	Tiempo de retención (min)	Cáscara de arroz	Fibra de coco	Paja de trigo	Espuma negra	Espuma amarilla	Perlita
C16:0 A	2.6	0.7	0.7	0.9	0.8	0.6	1.2
C18:2 A	2.6	2.3	2.3	2.6	1.5	2.0	2.0
C18:1 A	3.0	26.9	28.2	33.6	13.4	19.1	19.4
C18:0 A	3.2	3.0	3.0	3.6	1.7	2.2	2.3
% total formas ácidas		33.0	34.2	40.8	17.5	23.9	24.9
C18: 2 L	7.0	3.1	2.2	2.4	2.9	2.5	2.4
C16:0 L	7.5	3.4	3.6	3.1	6.1	5.9	5.8
C:18 1 L	9.0	49.5	49.1	43.7	57.6	53.0	53.0
C18:0 L	11.5	11.1	10.9	10.1	15.9	14.7	13.9
% total formas lactónicas		67.0	65.8	59.2	82.5	76.1	75.1

4.4.4 Cinética de producción de SLs en los soportes seleccionados

De acuerdo con los resultados previos, se seleccionaron los 3 biomateriales con los que se obtuvieron los mejores resultados (PT, CA y FC) para estudiar más a detalle la producción de SLs mediante FES. El objetivo de estos experimentos fue llevar a cabo para cada soporte, un monitoreo a las 48, 72, 130, 144, y 168 h. Como se mencionó en la sección 4.1 del presente capítulo el WOC utilizado presentó diferencias entre experimentos, concretamente, para estos experimentos presentó un menor contenido de grasas debido a cambios que realizó la empresa en el proceso de la producción del aceite (44% en lugar del 73% correspondiente al WOC de los experimentos de evaluación de los soportes).

La tabla 4.4 presenta los rendimientos en términos volumétricos, de sustrato y materia seca desde las 24 hasta las 168 h de fermentación. Como se observa, los máximos rendimientos volumétricos y de sustrato no presentaron diferencias significativas entre los tres materiales evaluados, reportando valores alrededor de los 15 g SL L⁻¹ y 0.2 g SL g⁻¹ sustrato. Sin embargo, en términos de materia seca, observamos diferencia significativa entre PT, CA y FC (Tabla 4.4). La concentración de SLs por gramo de MS es relevante para el proceso posterior de la recuperación del producto. Este hecho puede ser también observado en la

Figura 4.8, que presenta el perfil de producción de SLs. A las 168 h, se observó la producción más alta para PT (0.16 g SL g⁻¹ MS), seguido por FC a 144 h (0.14 g SL g⁻¹ MS), y finalmente la CA (0.09 g SL g⁻¹ MS) a las 168 h. Las máximas productividades fueron de 0.114, 0.119 y 0.105 g SL L⁻¹ h⁻¹ a las 120 h para PT, CA y FC, respectivamente. Incluso, aunque los resultados obtenidos en estos experimentos fueron ligeramente más bajos que aquellos obtenidos durante los experimentos previos de evaluación de los soportes, los resultados muestran que la reducción en contenido de grasa en el WOC (de 73 a 44%) no tuvo un impacto negativo sobre la producción de SLs. Este hecho se debe a que las grasas que están presentes en el medio de fermentación no son degradadas en su totalidad por la levadura, ya que ésta consume alrededor del 75% durante el proceso (Jiménez-Peñalver, 2017) por lo que, al final de la fermentación se observa un porcentaje elevado de grasa residual, lo cual indica que la reducción de grasas del WOC no afectará el proceso. Por lo tanto, estos son buenos resultados operacionales, ya que significa que se pueden alcanzar buenas productividades usando cantidades más bajas de sustratos.

Tabla 4.4. Cinética de producción de SLs. Rendimiento de SLs de paja de trigo, cáscara de arroz y fibra de coco. Las letras iguales indican que los valores no presentan diferencias significativas a $p < 0.05$.

Tiempo (h)	g SL g ⁻¹ MS		g SL L ⁻¹		g SL g ⁻¹ sustrato	
Paja de Trigo						
0	0.00	0.000	0.0	0.000	0.00	0.000
24	0.01	±0.003	0.9	±0.242	0.01	±0.003
48	0.04	±0.002	3.5	±0.000	0.05	±0.002
72	0.08	±0.012	7.6	±0.000	0.11	±0.015
120	0.14	±0.007	13.7	±0.145	0.19	±0.009
144	0.15	±0.001	14.6	0.000	0.20	±0.001
168	0.16 ^a	±0.002	14.8 ^d	0.000	0.20 ^e	±0.002
Cáscara de arroz						
0	0.00	0.000	0.0	0.000	0.00	0.000
24	*	*	*	*	*	*
48	0.03	±0.014	4.6	±0.388	0.07	±0.006
72	0.05	±0.000	8.2	±0.011	0.12	±0.000
120	0.08	±0.002	14.3	±0.282	0.21	±0.004
144	0.08	±0.001	14.3	±0.101	0.21	±0.002
168	0.09 ^b	±0.000	15.2 ^d	±0.055	0.23 ^e	±0.001

Fibra de coco						
0	0.00	0.000	0.0	0.000	0.00	0.000
24	0.01	±0.001	0.8	±0.090	0.01	±0.001
48	0.04	±0.011	3.9	±1.177	0.05	±0.016
72	0.06	±0.004	5.8	±0.387	0.08	±0.005
120	0.12	±0.000	12.6	±0.022	0.17	±0.000
144	0.14 ^c	±0.003	14.8 ^d	±0.277	0.20 ^e	±0.004
168	0.11	±0.006	11.5	±0.662	0.16	±0.009

* Datos no reportados por problemas técnicos

Para todos los experimentos, el consumo de glucosa se inició inmediatamente (Figura 4.8), disminuyendo continuamente durante el proceso hasta casi agotarse en el último día de fermentación. En el caso de la fibra de coco se observa un incremento de glucosa a las 144 h, sin embargo, esto pudo haber sido a un ineficiente lavado con acetato de etilo para remover SLs presentes. En todos los experimentos se observaron crecimientos similares considerando las UFCs, con un incremento inicial (0-40 h), y un máximo crecimiento hasta 10^{11} UFC g^{-1} MS y una disminución final a 10^{10} (120 a 168 h) que pudiera deberse a la falta de glucosa en el medio ya que para este momento la cantidad de azúcares está en los niveles más bajos. Estos resultados demostraron, una vez más, la capacidad de los microorganismos para colonizar los soportes seleccionados y producir buenos rendimientos de SLs.

En cuanto a la actividad biológica, la sOUR para PT y CA fueron similares a las obtenidas en experimentos previos, con valores de 2.67 y 1.57 mg O_2 g MS^{-1} h^{-1} , respectivamente (Figura 4.8). Sin embargo, la FC mostró los valores más altos, alrededor de 1.89 mg O_2 g MS^{-1} h^{-1} . Jiménez-Peñalver *et al.* 2016 reportó una correlación entre los SLs producidos y el oxígeno consumido (0.502 g SL por g O_2 ; $n = 35$; $R^2 = 0.946$; $p < 0.001$) lo que sugiere que el COC puede ser empleado como una manera indirecta para medir la producción de SLs. La Figura 4.9 muestra la correlación a partir de los valores experimentales entre la producción de SLs y el COC. Se obtuvieron las siguientes correlaciones; para la PT se produjeron 0.632 g SL por g O_2 consumido ($n=7$, $R^2=0.991$, $p<0.001$), para la CA 0.526 gde SL por g O_2 consumido ($n=6$, $R^2=0.987$, $p<0.001$), y para la FC 0.788 g SL por g de O_2 consumido ($n=7$, $R^2=0.956$, $p<0.001$). Las diferentes correlaciones obtenidas indican que los soportes afectan el rendimiento de la levadura. Sin embargo, una vez que el soporte ha sido seleccionado, el COC puede ser usado para monitorear la producción de SLs. Cabe destacar que este tipo de

correlaciones no siempre son factibles para otros bioproductos, como por ejemplo las enzimas (Cerdea *et al.*, 2016), por lo que el uso de esta correlación puede ser muy útil para el monitoreo del proceso a escalas mayores.

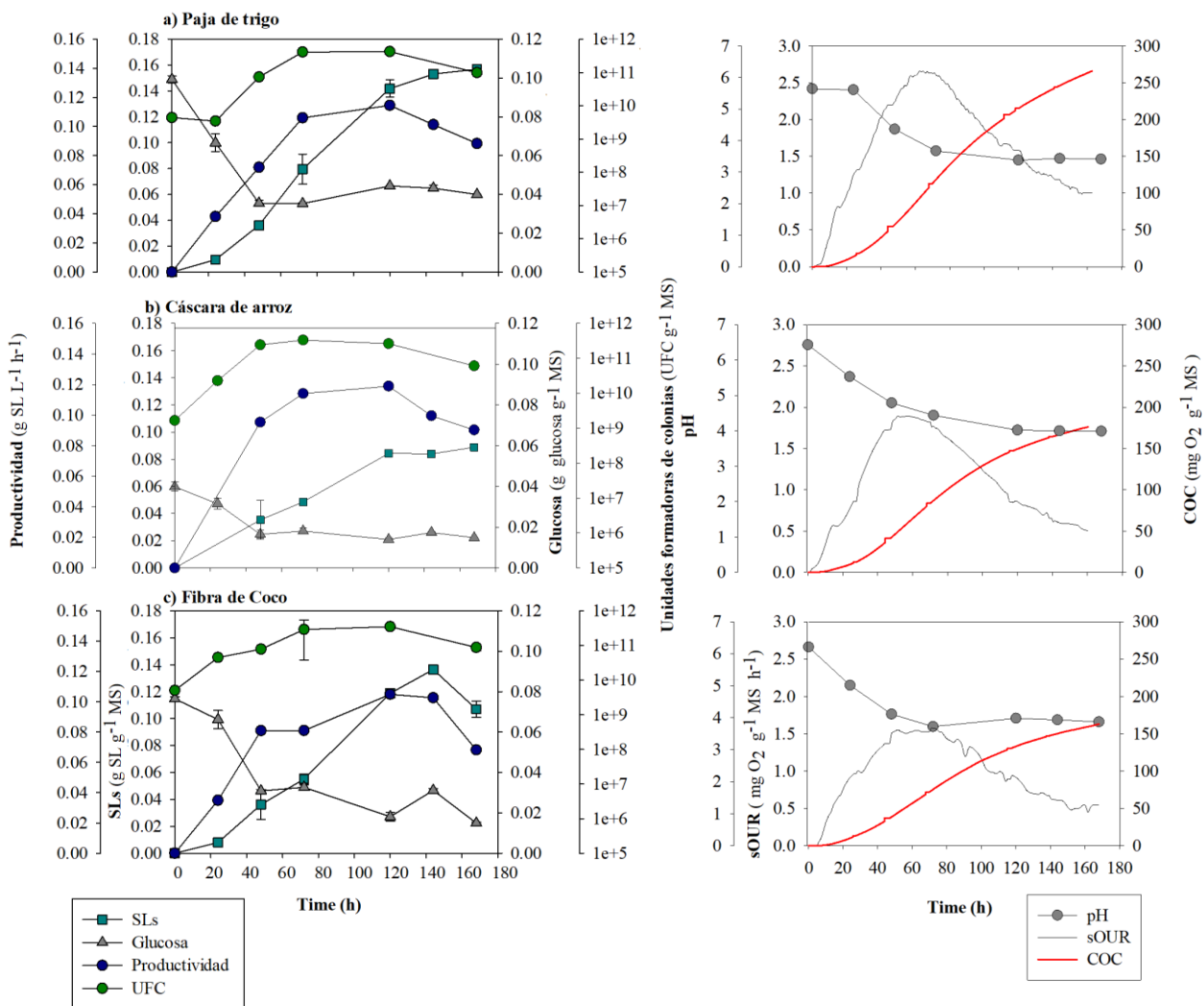


Figura 4.8 Cinética del proceso de FES. Izquierda: producción de SLs, consumo de azúcares (glucosa), unidad formadora de colonias (UFC) y productividad. Derecha: tasa de consumo de oxígeno específica (sOUR) y consumo de oxígeno acumulado (COC).

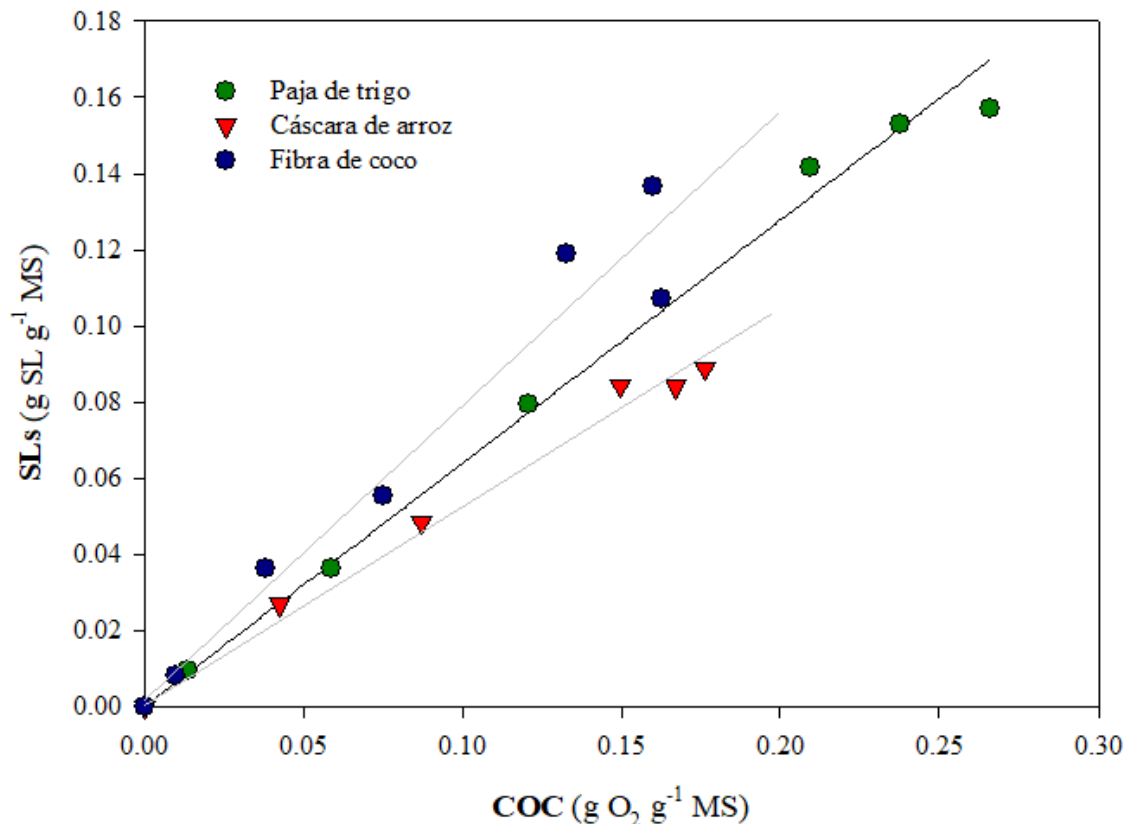


Figura 4.9 Correlaciones entre el consumo de oxígeno acumulado (COC) y la producción de SLs para PT, FC y CA

4.4.5 Evaluación de tierras de decoloración como sustrato

Los resultados con la CA de la sección 4.4.2 y la disponibilidad del biomaterial, nos llevaron a realizar un experimento para evaluar la cinética de producción de SLs con la CA y con el residuo de winterización (WOC) durante un periodo mayor al analizado anteriormente (336 h) y de esta manera determinar si existe una mayor producción de SLs conforme al tiempo y a su vez determinar el momento en que hay mayor producción. Los resultados se presentan en la Figura 4.10, en donde el mayor rendimiento fue de 0.11 g SL g⁻¹ MS a las 120 h con una producción volumétrica de 18.1 g SL L⁻¹ y una productividad de 0.15 g SL L⁻¹ h⁻¹. Estos resultados, nos llevaron a realizar un experimento para evaluar el potencial de otro sustrato hidrofóbico (Tierras de decoloración) como alternativa para la producción de SLs.

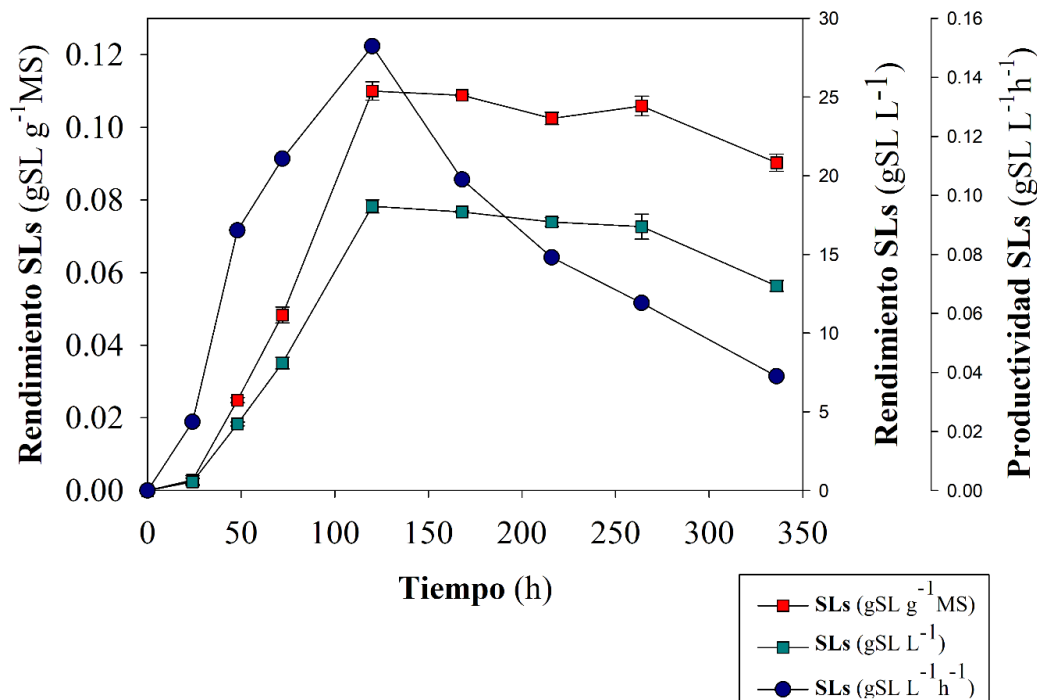


Figura 4.10. Producción de SLs durante 336 h con cáscara de arroz como soporte.

La CA se evaluó tanto con las TD (CA:TD) como con el WOC (CA:WOC) para la producción de SLs a las 120 h ya que fue el tiempo en el que se presentó la máxima productividad, así mismo se evaluó el pH y la actividad biológica mediante el monitoreo de la sOUR y el COC.

Los resultados demuestran que *S. bombicola* tiene la capacidad de producir SLs con ambos residuos (Figura 4.11). Entre los parámetros que se midieron, el pH del medio de fermentación disminuyó en ambos casos, para la CA:WOC de 6.2 a 4.3 y para la CA:TD de 6.5 a 5.5. Este descenso del pH se asocia a la producción de SLs con *S. bombicola* (Van Bogaert *et al.*, 2011). Los máximos valores de OUR ($1.9 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$) y COC ($119.6 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$) se presentaron con CA:WOC, mientras que CA:TD presentó una sOUR de $1.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ y un COC de $85.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$. Los datos de COC y SLs correlacionan con los obtenidos con la CA (Figura 4.9) con una R^2 de 0.9892, lo cual indica que, aunque se cambie el residuo hidrófobo, la relación COC vs SLs quedará fijada por el soporte. En cuanto a la producción de SLs, los valores obtenidos a las 120 h fueron de 0.07 y $0.05 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$ con CA:WOC y CA:TD respectivamente. Estos valores son más bajos en comparación con

los obtenidos en experimentos anteriores (cinética de producción con CA a los 7 días y el experimento a las 336 h).

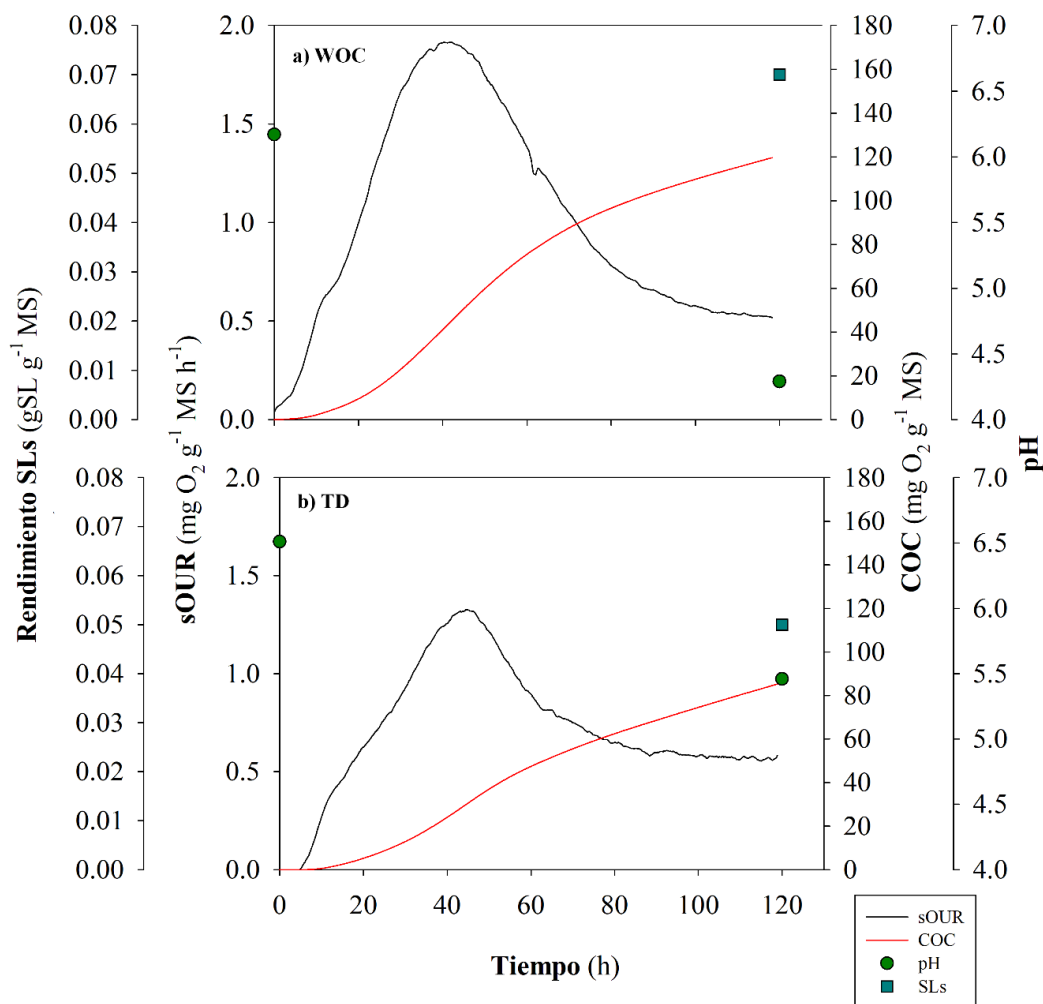


Figura 4.11. Perfil del proceso para la producción de SLs utilizando WOC y TD como sustrato. OUR, COC, pH y rendimiento de SLs.

Finalmente, la apariencia del SL crudo obtenido al finalizar el proceso de extracción para cada residuo presentó grandes diferencias. Como se observa en la Figura 4.12 con el WOC se obtuvo una consistencia similar a la miel de color ámbar ya reportado por otros autores (Parek y Pandit *et al.*, 2012; Jiménez- Peñalver *et al* 2016). Por el contrario, con las TD se observa un aspecto sucio y un color más oscuro, lo cual indica que las impurezas que se eliminan del aceite y están presentes en las TD se extraen junto con los SLs en el proceso de extracción con acetato de etilo, lo que afecta directamente tanto la producción como la

calidad de los SLs, por lo cual se descartó el sustrato. Este hecho nos indica la necesidad de valorar otras configuraciones o tecnologías en la etapa de recuperación del producto para evitar la extracción de impurezas contenidas en los sustratos.

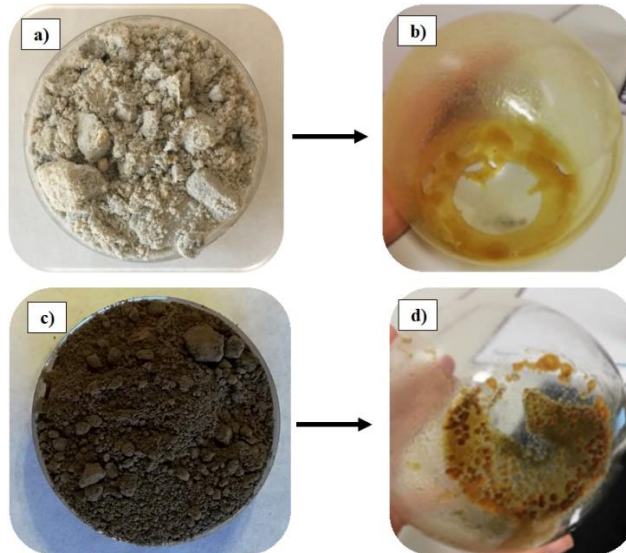


Figura 4.12. Apariencia de los SLs producidos con los diferentes sustratos. a) WOC, b) SLs producidos con CA:WOC, c) TD d) SLs producidos con CA:TD.

Estos resultados demuestran que el mejor residuo sólido hidrofóbico para nuestro proceso es el residuo de winterización, lo que nos confirma que es la opción más viable ya que en otros experimentos, reportados en los siguientes capítulos, se obtienen valores similares.

4.5. Conclusiones

Este trabajo demuestra la importancia de la selección del soporte para los procesos de FES. Se evaluaron 9 materiales diferentes para su uso como soporte en FES. Los resultados obtenidos demuestran que según el soporte que se utiliza existe una influencia en el proceso de la fermentación como se ha observado en los diferentes perfiles de respiración y rendimientos de producción. Los resultados muestran que los biomateriales funcionan mejor como soportes en comparación con los materiales inertes para la producción de soforolípidos utilizando residuo de winterización como fuente de carbono hidrofóbica y melazas como fuente de carbono hidrofílica, específicamente la paja de trigo que tuvo los mejores resultados. La producción de SLs se correlaciona con el COC para cada material de soporte utilizado, por lo que este parámetro puede ser de interés para monitorear y estimar la producción de SLs.

La presencia de ácidos grasos C18:1 en el sustrato WOC, da como resultado la predominancia del SL C18:1, siendo la forma lactónica la que predomina en la mezcla de SLs producidos.

Los biomateriales utilizados en este estudio tiene una gran disponibilidad a nivel mundial, siendo los resultados obtenidos una oportunidad para nuevas aplicaciones en procesos de FES para el desarrollo de bioproductos de interés comercial.

Finalmente, se comprobó que es posible producir SLs a partir de otros residuos análogos al residuo de winterización como lo son las tierras decolorantes, sin embargo, es necesario utilizar sustratos que no contengan impurezas que afecten la calidad de los SLs obtenidos o que estas impurezas puedan ser separadas fácilmente de los SLs.

Capítulo V

ESTUDIO DEL EFECTO DE ESCALA EN LA PRODUCCIÓN DE SOFOROLÍPIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Parte de este capítulo fue presentado como poster en el congreso Biosurfactants 2019 International Conference, Hohenheim, Alemania. Sophorolipids production by solid-state fermentation: Process scale-up and temperature dynamics. Rodríguez, A., Font, X; Gea, T.

Resumen

El presente capítulo está conformado por el estudio del efecto de escalado de la producción de soforolípidos (SLs) mediante FES (22 y 100 L). Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores demuestran que el residuo de winterización y la melaza son buenos sustratos para producir los compuestos usando como soporte tanto la paja de trigo como la cáscara de arroz con la cepa *S. bombicola*. Primero se evaluó la producción de SLs a un volumen de 22 L tanto con la cáscara de arroz como con la paja de trigo. Se evaluó la actividad biológica (OUR), la producción de SLs (rendimiento), el crecimiento microbiano (UFC) y el consumo de azúcares. Uno de los grandes desafíos para el escalado del proceso es el incremento de temperatura y la correcta transferencia de masa en el proceso. Por ello, al realizar estos experimentos se observaron las dinámicas de temperatura durante el proceso y se probaron diversas estrategias de aireación para controlarla, ya que a diferencia de los sistemas de escala laboratorio (0.5 L) donde la temperatura fue controlada en un baño termostático a 30°C, en los reactores utilizados en el escalado esto no era posible. Una vez establecidas las condiciones de proceso en el reactor de 22 L, se realizó un experimento de fermentación por lote alimentado con el objetivo de incrementar la producción de SLs suplementándole al microorganismo una solución de glucosa al 70%.

Después de los experimentos de 22 L se llevó a cabo la producción de SLs a una escala de 100 L. Al igual que en los experimentos de 22 L se observaron las dinámicas de temperatura durante el proceso, la producción de SLs y el comportamiento del microorganismo.

Finalmente, con el objetivo de determinar si es posible establecer una estrategia cero residuos, se realizó un estudio para realizar un inventario de las cargas ambientales relacionadas al proceso; para esto se determinaron las emisiones gaseosas y se realizó una digestión anaerobia del sólido fermentado residual.

5.1 Materiales

Los materiales que se usaron para las fermentaciones fueron la cáscara de Arroz (CA) proporcionada por Husk Ventures S.L. (Barcelona, España) y la paja de trigo (PT) proveniente de las granjas experimentales de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Los sustratos que se utilizaron fueron la melaza de azúcar de remolacha (MEL) y el residuo de winterización (WOC), el cual debido a modificaciones en los procesos de la empresa que nos proporcionó el residuo (LIPSA), tuvo una variación en el contenido de grasas en los diferentes experimentos (FES 22 L: 43% grasas y FES 100 L: 72% grasas).

En los ensayos para determinar el potencial de producción de biogás, el inóculo que se utilizó fue un lodo activado anaerobio procedente de un digester anaerobio de lodos de la planta municipal de tratamiento de aguas residuales de Sabadell y como sustrato se utilizó el sólido fermentado residual (SFR) tras la extracción de SLs. Algunas de las características de los materiales y sustratos se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Características de materiales y sustratos utilizados en los experimentos

Material	Humedad (%)	Materia seca (%)	Materia Orgánica (%)	Grasas (%)
Cáscara de arroz	12.7	87.3	83.4	0.9
Paja de trigo	5.6	94.4	95.5	1.4
WOC	4.4	95.6	43.9 70.2	22 L:43 100 L: 72
MEL	17.1	82.9	87.1	-
Inóculo (CA)	95.8	4.2	58.6	-
SFR CA	41.7	58.3	72.9	-
Inóculo (PT)	97.2	2.8	65.5	-
SFR PT	6.6	93.4	83.2	-

5.2 Condiciones experimentales

5.2.1 Sistemas de fermentación 22 y 100 L

Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores de 22 L y 100 L, los cuales antes de cada experimento fueron totalmente limpiados con agua y lejía para eliminar suciedad y microorganismos que pudieran estar presentes de procesos anteriores. Los sistemas se encuentran descritos en la sección 3.4.2 y 3.4.3 respectivamente de la sección de Materiales y Métodos.

Las condiciones de los experimentos se presentan en la tabla 5.2 en donde se presentan las cantidades al 100% de la capacidad del reactor según cada escala evaluada; cada uno de los experimentos se ajustó según la capacidad correspondiente analizada, todos los sustratos fueron esterilizados a 121°C durante 30 minutos (a los experimentos de paja se les hicieron 3 ciclos de esterilización, 1 cada 24 h). Las mezclas sólidas se presentan en la Figura 5.1.

Tabla 5.2 Relación de la mezcla sólida al 100% de la capacidad del reactor según la escala y el soporte utilizado

Tipo de soporte	Escala (L)	Volumen de trabajo %	Masa total (g)	Soporte (g)	MEL (g)	WOC (g)	Agua (ml)	Tiempo de muestreo (h)
Cáscara de Arroz	22	100	5,385	2,585	297	1,188	1,314.5	24, 48, 72, 120 y 168
		75						
Paja de Trigo	22	75	3,784	770	319	1,276	1,419	72, 120 y 168
	100	60	17,200	3,500	1,450	5,800	6,450	96, 144 y 168

Sólo el primer experimento de 22 L con cáscara de arroz se realizó al 100 % de la capacidad del reactor. El segundo experimento de 22 L con CA y los experimentos de 22 L PT se realizaron al 75% de la capacidad del reactor y los experimentos en el reactor de 100 L se ajustaron las cantidades para realizarlos al 60% de la capacidad de cada reactor.

El tiempo de fermentación en todos los experimentos fue de 168 h (7 días). Se midió la actividad biológica mediante el monitoreo de la OUR y el COC y se tomaron cuidadosamente muestras en los diferentes tiempos para medir el pH, el contenido de humedad, las UFC, el consumo de azúcares y el rendimiento de SLs de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 3 sección 3.5, 3.6 y 3.7 de Materiales y Métodos.

Los caudales de aireación fueron diferentes según cada experimento y se fueron modificando según las dinámicas de temperatura durante el proceso, estos caudales fueron variando según el aumento de la escala manteniendo el caudal volumétrico por unidad de volumen según el reactor.

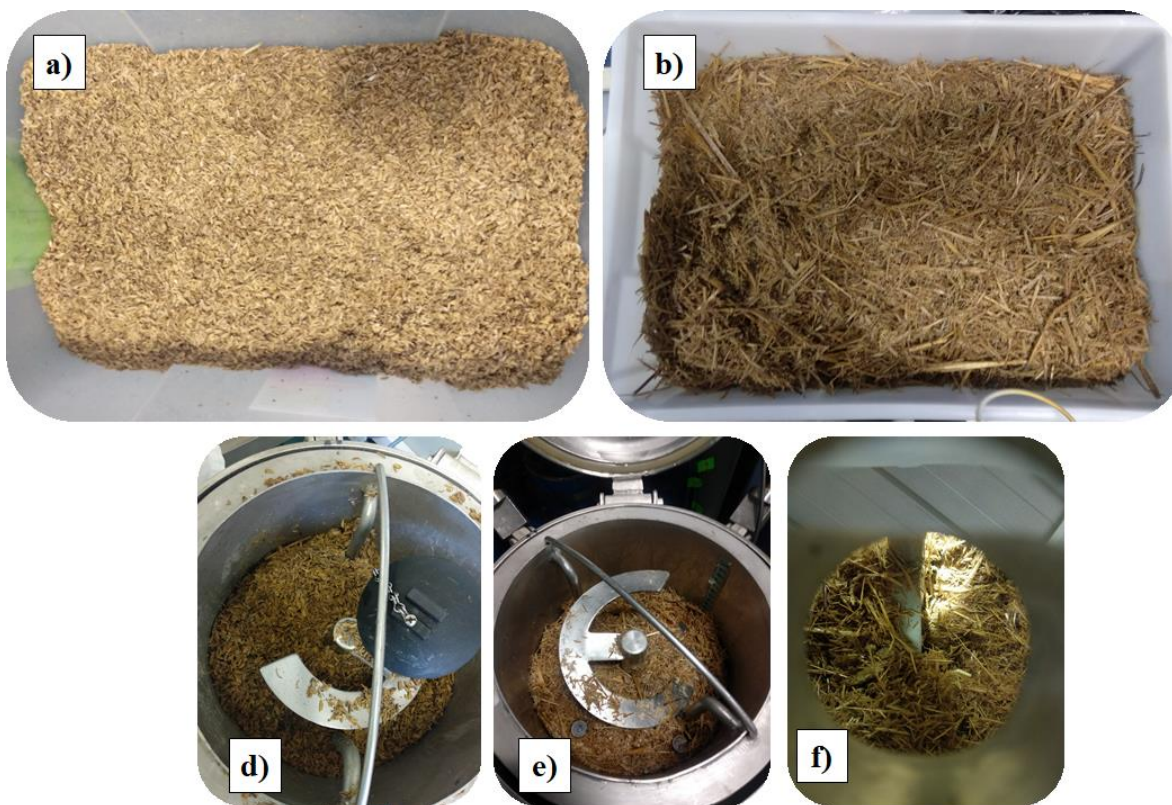


Figura 5.1. Arriba: Mezcla soporte, WOC, MEL, agua para FES. a) Cáscara de arroz, b) Paja de trigo. Abajo: Llenado del reactor d) Cáscara de arroz (22L) e) Paja de trigo (22L) f) Paja de trigo (100 L).

En la escala de 22 L con PT se realizó un experimento para determinar si es posible incrementar la producción de SLs mediante una estrategia de fermentación por lote alimentado, por lo que se realimentó el sistema a las 48 h y a las 120 h con una solución de

glucosa al 70% y se analizó la producción de SLs, el pH y las UFC para el monitoreo del proceso.

Por otro lado, se realizó un inventario ambiental midiendo las emisiones del proceso (compuestos orgánicos volátiles (COVs), amoníaco (NH_3), ácido sulfhídrico (H_2S) y metano (CH_4)) que se producen en la fermentación. El análisis se llevó a cabo en el reactor de 22 L con PT, según lo descrito en la sección 3.8.4.1 de Materiales y Métodos. Las emisiones fueron analizadas a las 24, 72, 96, 120, 144 y 168 h de fermentación. La toma de muestras y los análisis de emisiones fueron realizados por duplicado. Finalmente, se realizó un ensayo de potencial de producción de biogás del sólido fermentado residual siguiendo la metodología descrita en la sección 3.8.4.2 del capítulo de Materiales y Métodos.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Escalado de la producción de SLs a 22 L con cáscara de arroz como soporte

Los resultados en el capítulo 4 nos mostraron que, de los soportes analizados, los mejores para producir SLs fueron la paja de trigo y la cáscara de arroz, por lo tanto, fueron los materiales que se utilizaron para hacer las pruebas de escalado. Los primeros experimentos de escalado a 22 L se realizaron con la CA al 100% de la capacidad del reactor a un caudal de $1,300 \text{ ml min}^{-1}$ equivalente a $0.48 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$, el cual se mantuvo durante todo el experimento para observar el comportamiento del proceso. La Figura 5.2 muestra el perfil de producción de SLs a 22 L con la CA al 100% de la capacidad del reactor. Uno de los principales indicadores asociados a la formación de SLs es que el pH del sistema de fermentación disminuye conforme pasa el tiempo (Van Bogaert *et al.*, 2011); el pH inicial fue disminuyendo a partir de las 24 h de 6.2 hasta 4.2 al finalizar la fermentación. La producción de SLs se identificó a partir de las 24 h alcanzando un valor máximo de $0.08 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$ a las 120 h. Sin embargo, después de ese tiempo hubo un problema eléctrico que afectó el sistema y detuvo la aireación; por lo que el rendimiento disminuyó a $0.07 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$, además de la falta de aire, a las 120 h se observó contaminación por hongos lo cual impidió a que la cepa *S. bombycolia* pudiera desempeñar su función para producir SLs. Esto se comprobó con las UFC en donde a las 48 h de fermentación la concentración inicial de

7×10^8 UFC g^{-1} MS incrementó hasta 3.5×10^{10} UFC g^{-1} MS y a las 72 h las UFC disminuyeron a 4.4×10^9 UFC g^{-1} MS, después de ese tiempo (120 y 168 h) no fue posible contar las UFC en las placas de agar ya que, como se observa en la Figura 5.3, la aparición de hongos invadió la placa e inhibió el crecimiento de *S. bombicola*. La Figura 5.3 también muestra el sólido final fermentado en donde se observa una importante contaminación por hongos, a lo que se le atribuye la inhibición del crecimiento de la levadura para producir SLs. La máxima OUR fue de $0.9 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ aproximadamente a las 48 h, sin embargo, a las 120 h debido al problema eléctrico antes mencionado, no fue posible calcular el COC hasta el final de la fermentación.

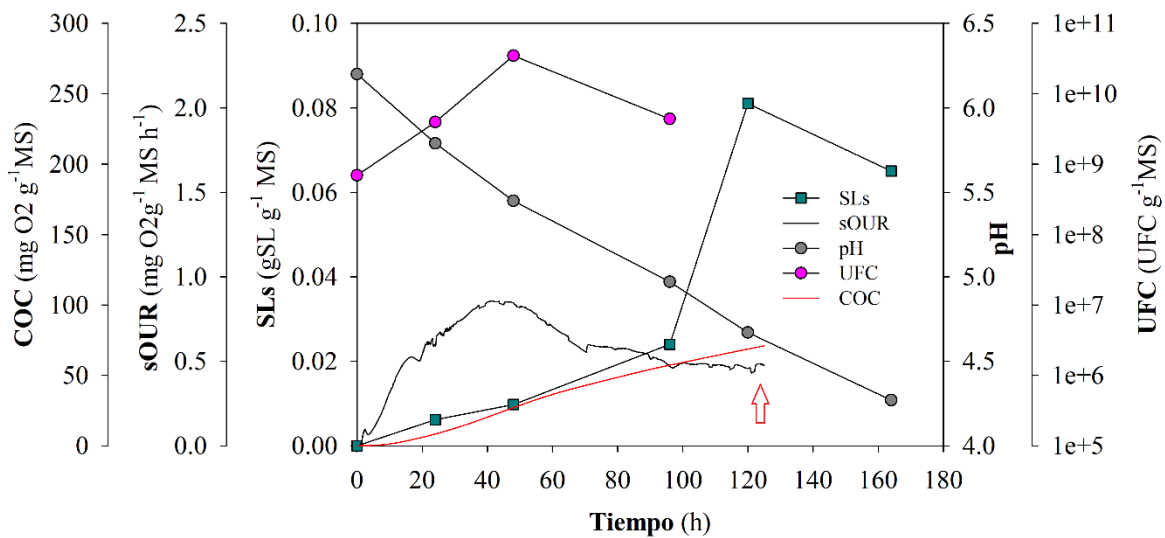


Figura 5.2. Perfil de producción de SLs al 100% de la capacidad del reactor de 22 L con cáscara de arroz. La flecha indica el tiempo en el que hubo el corte eléctrico en el sistema.

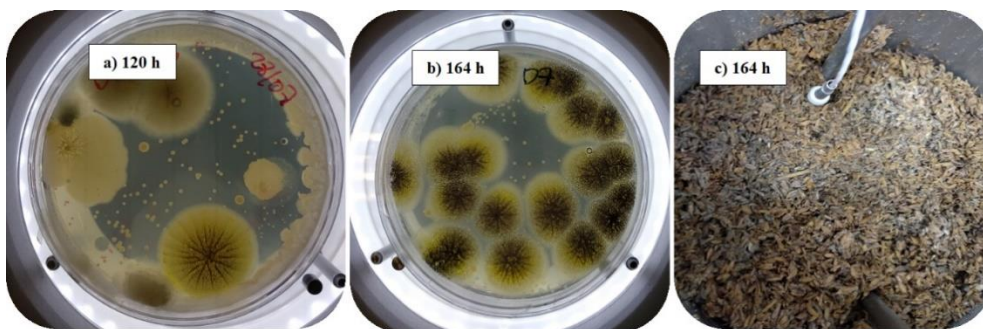


Figura 5.3. Placas UFC de los muestreos a las a) 120 y b) 168 h. c) Sólido fermentado final contaminado con hongos.

La temperatura es uno de los principales parámetros en una fermentación, se sabe que el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos incrementan la temperatura en el sistema por lo que es necesario suplementar suficiente oxígeno y ventilación en el sistema de fermentación (Chen *et al.*, 2013). La temperatura óptima para la producción de SLs es de 21°C (Arab y Mulligan, 2018), sin embargo, la mayoría de los estudios se realizan entre los 25 y 30 °C (Van Bogaert *et al.*, 2011). La dinámica de temperatura que se observó en el experimento se muestra en la Figura 5.4 en donde se observa que a las 16 h la temperatura incrementó hasta los 37°C y disminuyó manteniéndose en un rango entre los 26 y los 30°C.

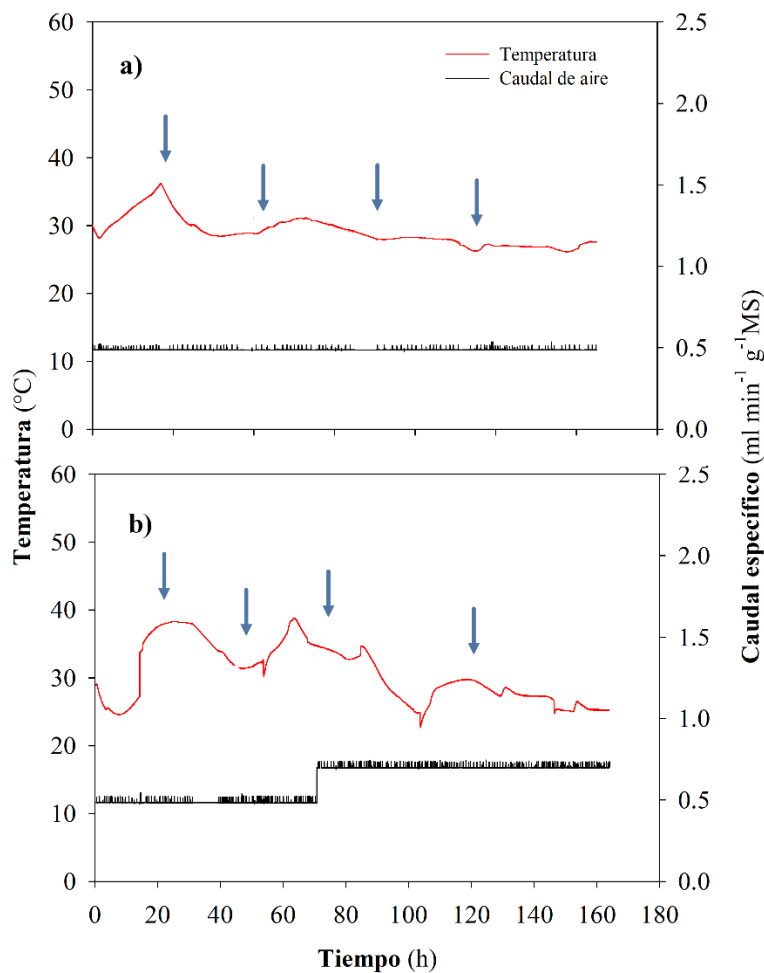


Figura 5.4. Perfil de temperatura de los experimentos a 22 L con cáscara de arroz a) 100% de la capacidad del reactor b) 75% de la capacidad del reactor. Las flechas indican el tiempo de muestreo.

El segundo experimento se redujo al 75% de la capacidad del reactor para dejar un espacio vacío para una mejor circulación del aire y evitar problemas de compactación del material lo que pudiera provocar un mayor aumento de temperatura. El experimento se realizó a un caudal de aire inicial de $0.48 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$. Los resultados se muestran en la Figura 5.5. Al igual que el experimento anterior el pH disminuyó conforme el transcurso de la fermentación de 6.2 a 4.6. La producción de SLs inició a partir de las 24 h, sin embargo, la producción de SLs se mantuvo entre los 0.02 y los $0.04 \text{ g SL gMS}^{-1}$ siendo a las 168 h la mayor producción. Estos resultados son inferiores a los obtenidos en el experimento anterior; las UFC incrementaron de 7×10^8 a $2 \times 10^{10} \text{ UFC g}^{-1}\text{MS}$ y hubo menor presencia de hongos que el experimento anterior. Los azúcares se consumieron gradualmente, el consumo total fue de 90% ($0.123 \text{ g glucosa g}^{-1}\text{MS}$); el 75 % los azúcares se consumieron a las 24 h (de 0.137 a $0.035 \text{ g glucosa g}^{-1}\text{MS}$) y el 15% de los azúcares entre las 24 y 168 h (de 0.035 a $0.015 \text{ g glucosa g}^{-1}\text{MS}$). La máxima OUR fue de $2.1 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$ y el COC $259.9 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS}$.

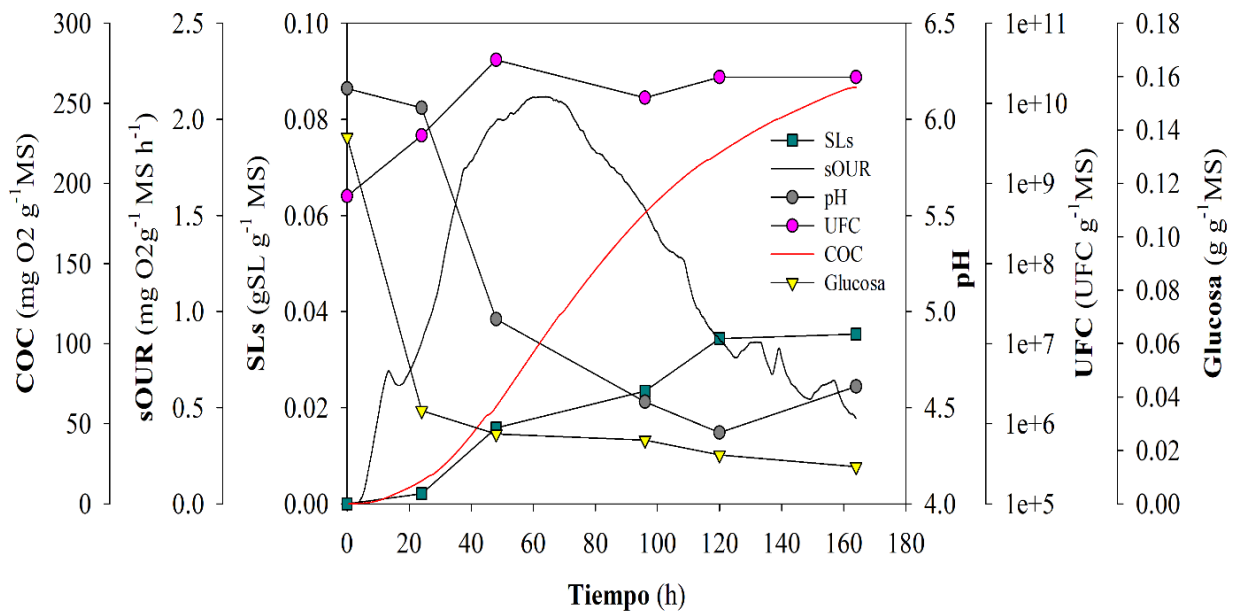


Figura 5.5. Perfil de producción de SLs al 75% de la capacidad del reactor de 22 L con cáscara de arroz.

El perfil de temperatura se presenta en la Figura 5.4 en donde se observa que a partir de las 24 h la temperatura incrementó hasta los 38.8 °C por lo que el caudal de aire se aumentó a $2,000 \text{ ml min}^{-1}$ equivalente a $0.70 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$ para intentar disminuir la temperatura y

evitar impacto negativo en la producción de SLs. Tras aumentar el caudal de aireación se observó que tuvo un efecto, ya que la temperatura disminuyó, sin embargo, a las 65 h volvió a incrementar alcanzando nuevamente los 38°C, después de ese tiempo la temperatura volvió a disminuir manteniéndose entre los 25 y 30°C. Esto indica que las temperaturas de 38°C afectaron directamente al microorganismo para producir SLs, lo cual explica los bajos rendimientos obtenidos en el experimento, sin embargo, los valores de OUR son mayores en comparación con el experimento anterior, por lo que a pesar de que la actividad biológica fue mayor, la levadura no fue capaz de producir una mayor cantidad de SLs. Un comportamiento similar fue observado por Jiménez-Peñalver (2017) en donde a mayores temperaturas y mayor actividad biológica (OUR) la producción de SLs fue muy baja, por lo que el metabolismo de la levadura a temperaturas altas podría haberse desviado y en su defecto afectar la producción de SLs.

5.3.2 Escalado de la producción de SLs a 22 L con paja de trigo como soporte

La paja de trigo mostró tener un buen potencial para ser utilizado como soporte para la producción de SLs a escala laboratorio. Se realizaron tres experimentos de 22 L con PT (E1 PT-22L), (E2 PT-22L) y (E3 PT-22L); los cuales se realizaron al 75% de la capacidad del reactor a un caudal inicial de 1,237 ml min⁻¹ equivalente a 0.78 ml min⁻¹ g⁻¹MS, el cual se fue modificando según la dinámica de temperatura durante el proceso. La contaminación fúngica observada en los experimentos anteriores con la CA llevó a realizar una serie de ciclos de esterilización para eliminar esporas presentes en los materiales que pudieran ser resistentes, provocar una contaminación mayor e impactar negativamente en el proceso para la producción de SLs. Para esto, la paja de trigo fue esterilizada en 3 ocasiones a 121°C durante 30 min (1 esterilización cada 24 h), la tercera esterilización se realizó ya con la mezcla PT:WOC:MEL.

La cinética de producción de SLs se evaluó en 3 puntos de la fermentación (72, 120 y 168 h) para disminuir el riesgo de contaminación, ya que en cada muestreo el reactor se tiene que abrir. Los resultados del experimento 1 (E1 PT-22L) y del experimento 2 (E2 PT-22L) se presentan en el perfil de producción de SLs en la Figura 5.6. Se observa que el pH disminuyó consecutivamente en ambos casos de un pH inicial de 5.6 a un valor de 3.3 al final de la fermentación. La producción de SLs fue incrementando conforme al tiempo de fermentación;

la máxima producción de SLs se presentó a las 168 h, para el E1 PT-22L fue de 0.17 ± 0.011 g SL g^{-1} MS y para el E2 PT-22L 0.19 ± 0.016 g SL g^{-1} MS. El consumo de azúcares para las 72 h es del 60 al 70 % del contenido inicial, sin embargo, en ambos casos se observa un aumento a las 72h, el cual es una interferencia de los resultados con la producción de SLs ya que la soforosa contenida en la estructura de los SLs se reflejada en los valores, lo cual podría deberse a que los lavados con acetato de etilo para eliminar los SLs de los extractos para azúcares no fueron suficiente para evitar la interferencia. El crecimiento del microorganismo se ve reflejado en el incremento de UFC de 2.3×10^9 a 2.1×10^{11} y 2.3×10^9 a 1.05×10^{11} en el E1 PT-22L y el E2 PT-22L respectivamente; la aparición de hongos en los sistemas de fermentación no se detectó en las primeras 120 h del proceso, sino hasta el último día de fermentación fue cuando se observó el crecimiento de hongos, por lo que los ciclos de esterilización fueron una buena estrategia para evitar la contaminación de otros microorganismos en el sistema. La Figura 5.7 presenta las diferentes placas de agar del E1 PT-22L del análisis de UFC en donde hasta las 168 h no se observa el crecimiento de un hongo y una colonia de gran tamaño (no identificada), un comportamiento similar se observó en el experimento 2 a diferencia que la placa a las 168 h hubo menor cantidad de colonias (placas no mostradas). A pesar de que hubo presencia de hongos y otros microorganismos en las últimas horas de la fermentación estos no interfirieron en la producción de SLs ya que, en comparación con el primer experimento con la CA, se inhibió el crecimiento de la levadura y la producción de SLs fue más baja. Probablemente, la aparición de hongos en la fermentación en las primeras horas, como fue con la CA a partir de las 72 h, tendría un impacto negativo en la producción de SLs, a diferencia de cuando aparecen en las últimas horas de la fermentación como fue el caso de la fermentación con la PT.

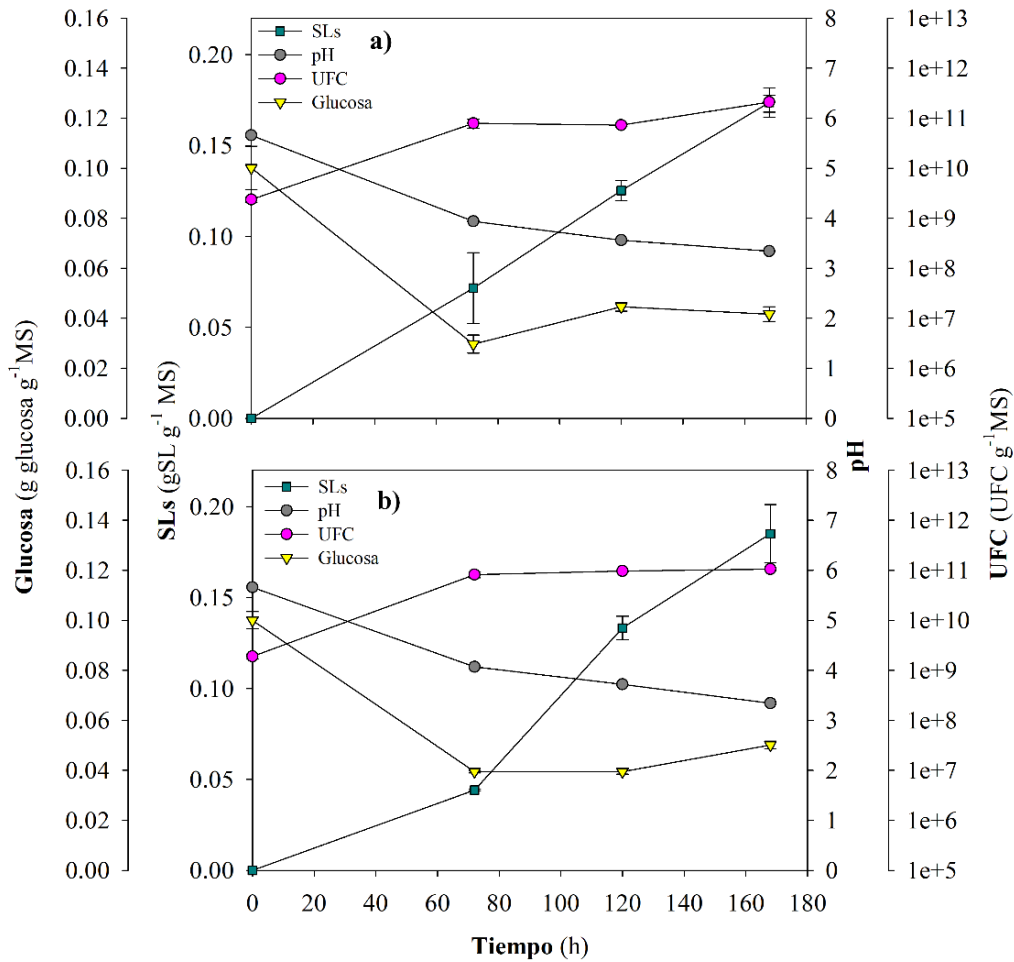


Figura 5.6. Perfil de producción de SLs a escala de 22 L con paja de trigo como soporte.

a) E1 PT-22L b) E2 PT-22L.

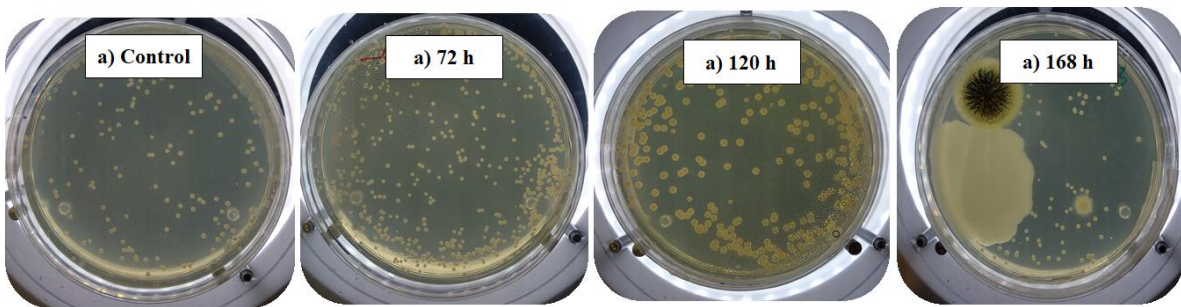


Figura 5.7. Placas UFC de los diferentes tiempos de análisis de la fermentación E2 PT-22

L. El control representa el día 0 (día de inicio de la fermentación).

La actividad biológica en los reactores de 22 L con la PT como soporte se presenta en la Figura 5.8 en donde se muestra la sOUR, sin embargo, por problemas técnicos no fue posible

presentar el perfil completo de los experimentos, sin embargo, el comportamiento de la sOUR presenta una tendencia similar en las primeras horas, siendo el valor máximo de $3.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ a las 60 h.

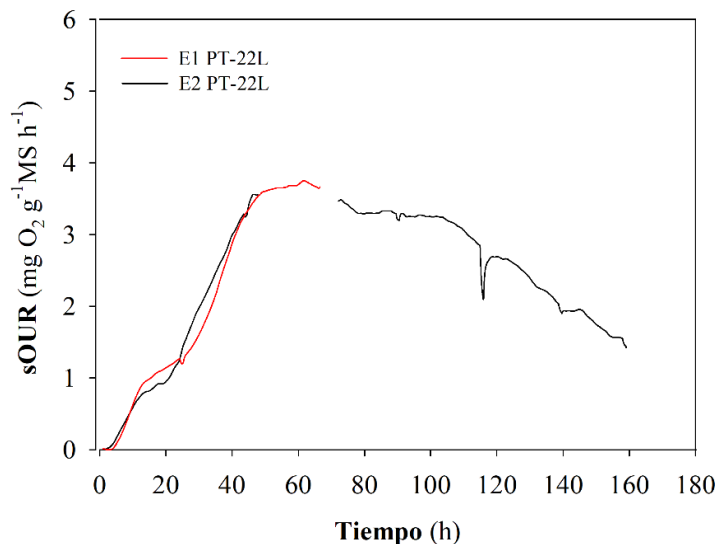


Figura 5.8. Perfil sOUR de los experimentos con paja de trigo en el reactor de 22 L.

Finalmente, las dinámicas de temperatura durante los experimentos se monitorearon mediante sensores portátiles para medir la temperatura en diferentes puntos del reactor durante todo el proceso. La Figura 5.9, muestra los perfiles de temperatura (mínima y máxima) que se presentaron en las dos fermentaciones que se realizaron con la PT a 22 L; ya que cada experimento presentó una dinámica de temperatura diferente, a pesar de eso no tuvo ningún impacto negativo para la producción de SLs. En los experimento de CA se detectaron picos de temperatura por encima de los 40°C y se vio un impacto negativo en la producción de SLs que pudo haber sido causada por la contaminación de otros microorganismos en el sistema, sin embargo, con la PT en el E1 PT-22L a pesar de que se detectaron picos de hasta 39°C se observa que no tuvo un impacto negativo en la producción de SLs, ya que el rendimiento promedio es de $0.18 \pm 0.008 \text{ g SL g}^{-1} \text{MS}$. Estos resultados indican que a pesar de que se presentaron temperaturas elevadas, al ser un perfil de temperatura dinámico y al haber gradientes en el reactor la levadura es capaz de adaptarse y aun así producir buenos rendimientos.

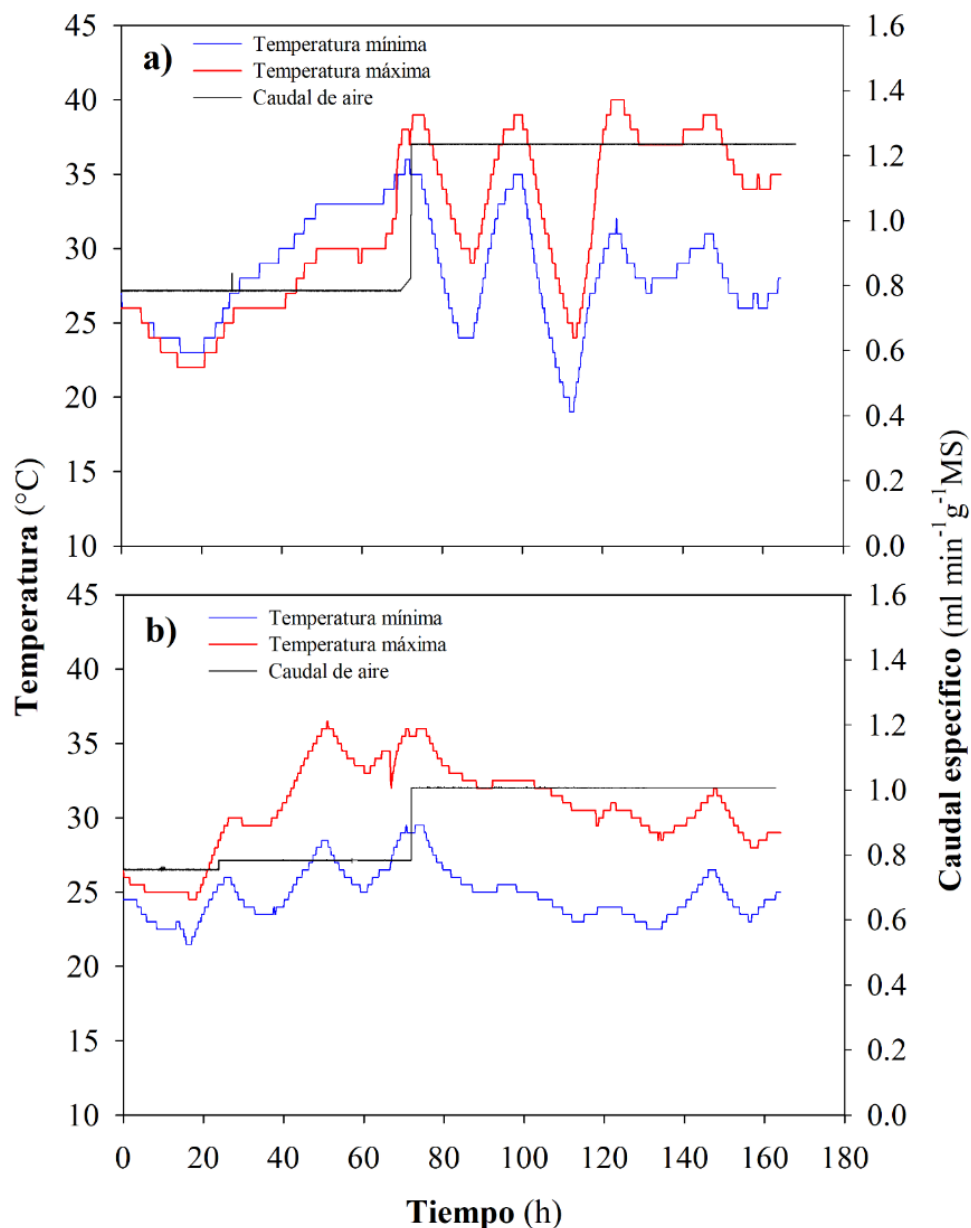


Figura 5.9. Perfiles de temperaturas máximas y mínimas en los experimentos con paja de trigo a 22 L. a) E1 PT-22L b) E2 PT-22L.

La acumulación de calor es un efecto de temperatura típico en los procesos de FES debido al crecimiento del microorganismo (Chen *et al.*, 2011). En ambos experimentos el caudal de aire inicial fue de $0.78 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{MS}$. A medida que avanza el proceso de fermentación, se va acumulando el calor metabólico en la mezcla sólida. En el perfil de temperatura (Figura 5.9) se observa que, en ambos experimentos a partir de las 40 h del proceso, la temperatura empezó a incrementar hasta llegar a 38°C en el E1 PT-22L a las 72 h y en el E2 PT-22L a

36° C a las 48 h, por lo que se incrementó el caudal de aire a 2,000 ml min⁻¹ equivalente a 1.2 y a 1.0 ml min⁻¹ g⁻¹MS respectivamente; lo que hizo que disminuyera la temperatura. Después de ese tiempo la temperatura osciló en el E1 PT-22L entre una temperatura mínima de 19°C y una máxima de 39 °C. Mientras que en el E2 PT-22L a partir de las 72 h la temperatura descendió y se mantuvo entre los 23 y 31 °C. Estos experimentos nos muestran que, el implementar estrategias de aireación permite controlar las temperaturas dentro del reactor. A pesar de que se ha reportado que las fermentaciones por lo general se llevan a cabo entre los 25 y 30°C (Van Bogaert *et al.*, 2011) con *S. bombicola*, en nuestros experimentos encontramos que la levadura se adaptó a esta dinámica de temperatura y mantuvo la producción de SLs. Los resultados del escalado de la producción de 0.5 a 22 L son alentadores para estudiar la producción a una escala mayor.

Adicionalmente, se realizó un tercer experimento E3 PT-22L para comprobar la producción de SLs con paja de trigo a una escala de 22 L, el experimento duró 168 h y a diferencia de los experimentos anteriores el reactor no se abrió para muestreo durante todo el proceso, lo cual redujo considerablemente la contaminación por otros microorganismos al finalizar el proceso, ya que, al abrir el reactor, la cantidad de hongos que se observó era mínima. Los resultados de producción de SLs, actividad biológica y el perfil de temperatura se presentan en la Figura 5.10 en donde se produjeron 0.20 g SL g⁻¹MS a las 168 h del proceso, rendimientos similares a los obtenidos en los E1 PT-22L y E2 PT-22L. La máxima sOUR fue de 3.7 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ a las 60 h y un COC de 562.44 mg O₂ g⁻¹MS. En el perfil de temperatura se muestra la dinámica que siguió la temperatura durante en el proceso (13 sensores de temperatura distribuidos dentro del reactor). A las 30 h del proceso se registró una temperatura de 35°C solamente en dos de los sensores y en el resto entre los 30 y 33°C. Después de las 48 h se aumentó el caudal de aire a 2,000 ml min⁻¹ equivalente a 1.0 ml min⁻¹ g⁻¹MS y la temperatura se mantuvo estable entre los 28 y 32°C. Así mismo, en la Figura 5.10 se presenta la temperatura ambiente del espacio en donde se encontraba el reactor, en donde la temperatura se mantuvo durante todo el proceso entre los 19 y 22°C, lo cual ayudó a que no se incrementara la temperatura como en los experimentos anteriores. Las fluctuaciones noche-día de la temperatura ambiente se reflejaron en la temperatura del reactor observándose un comportamiento similar entre ambas temperaturas; por lo que, además del

calor metabólico que se genera, la temperatura ambiente del lugar en el que se encuentra el reactor tendrá un efecto sobre el comportamiento de la temperatura.

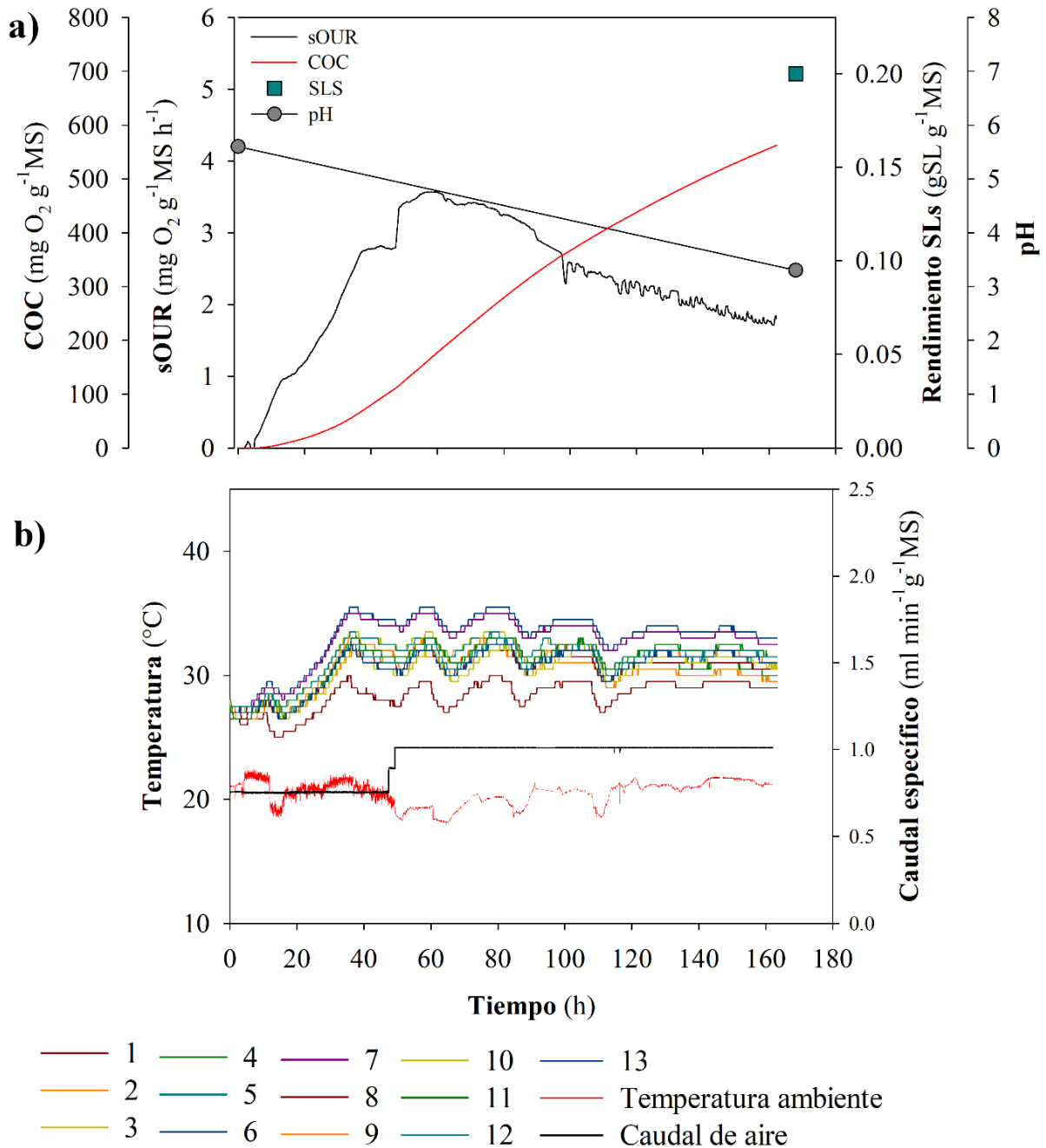


Figura 5.10. Producción de SLs E3 PT-22L. a) Perfil sOUR, COC y rendimiento de SLs.

b) Perfil de temperatura (los números 1-13 representan los diferentes sensores).

5.3.3 Estrategia de producción de SLs mediante FES por lote alimentado a 22 L

La producción de SLs mediante Fms por lote alimentado ha demostrado tener muy buenos resultados, ya que se ha logrado incrementar la producción hasta $1,146 \text{ g L}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2019) utilizando residuos alimenticios como sustrato y alimentando el reactor con glucosa concentrada en el momento en el que disminuyeron los azúcares. Rendimientos de SLs de 400 g L^{-1} usando como sustratos glucosa y aceite de maíz, sustituyendo la glucosa cuando se consumía, por una solución de miel (Pekin *et al.* 2005). Maddikeri *et al.* (2015) compararon la producción de SLs por Fms mediante la operación de lotes alimentados reportando un aumento de 24.7 a 55.6 g L^{-1} . Por otro lado, investigaciones mediante FES en otros compuestos como aromas, enzimas y otros compuestos (Mártínez-Ávila *et al.*, 2019; Astolfi *et al.*, 2011) han demostrado gran potencial al presentar incremento considerable al utilizar la estrategia por lote alimentado. Estos resultados nos llevaron a implementar una estrategia por lote alimentado en nuestra FES para producir SLs; para esto, nuestro sistema fue alimentado con una solución de glucosa al 70% después de las 48 h de fermentación, tiempo en el que se consume la mayoría de los azúcares disponibles y a las 120 h (tiempo en que ya se consumió la mayoría de los azúcares), la glucosa fue agregada en el reactor y se agitó durante 5 minutos. El tiempo total de fermentación fue de 168 h y se tomaron muestras para medir la producción de SLs antes y después de que se alimentó el reactor.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de la levadura se vio afectada al implementar la estrategia de alimentación ya que fue imposible contar las UFC a partir de las 120 h, como se observa en la Figura 5.11 la presencia de otros microorganismos no permitió tener datos confiables como para tomarlos en cuenta. Probablemente, la manipulación del reactor para la alimentación y la adición de glucosa favoreció el crecimiento de otros microorganismos lo que le impidió a la levadura crecer adecuadamente. Al mismo tiempo (120 h) se presentó una sOUR de $3.0 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ llegando hasta un máximo de $6.8 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ a las 140 h, estos valores tan altos de actividad biológica confirman la presencia de otros microorganismos (Figura 5.12, los datos de las 40 a las 118 h no se muestran debido a un error que se presentó en el sistema de adquisición de datos).

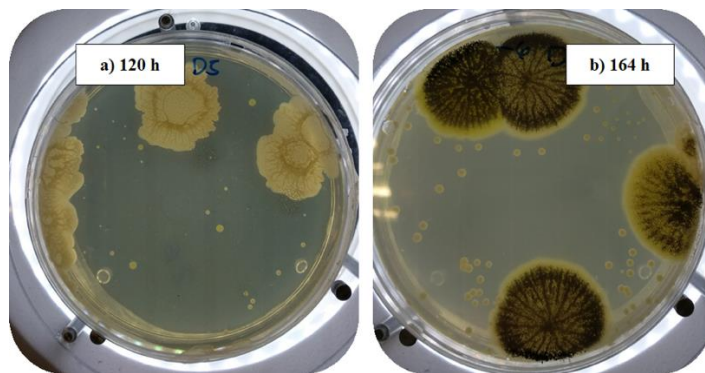


Figura 5.11. Placas de cultivo a las a) 120 h y b) 164 h del proceso de FES por lote alimentado.

La Figura 5.12 muestra el perfil de producción de SLs. El pH fue disminuyendo conforme al paso del tiempo de la fermentación, lo cual es un indicativo de que los SLs se producen. La producción de SLs a las 120 h después de que se alimentó por primera vez el sistema (48 h) fue de $0.11 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$. Estos valores, en comparación con los resultados anteriormente mencionado del reactor de 22 L al 75% con PT al mismo tiempo son similares ($0.13 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$) a lo obtenido en este experimento, sin embargo, a las 164 h la producción de SLs se mantuvo en los $0.11 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$, los cuales son inferiores a los $0.20 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$ que se produjeron en el experimento con la paja cuando el proceso fue mediante fermentación discontinua. Con estos resultados, se observa que al agregar una fuente de carbono fácilmente asimilable como lo es la glucosa, otros microorganismos presentes tienen ventaja competitiva con la levadura lo cual, impide su uso para la producción de SLs; estos resultados indican que con la estrategia por lote alimentado no se logra incrementar la producción de SLs en nuestro sistema de FES si no se controla mejor la esterilidad del medio. Los resultados nos llevaron a descartar la estrategia de producción de SLs por FES por lote alimentado ya que el proceso implica un consumo extra en insumos y los rendimientos son menores. Sin embargo, a pesar de estos resultados, esta estrategia podría ser evaluada en un futuro más a detalle mediante operaciones que permitan reducir el riesgo de contaminación y de esta manera descartar en su totalidad o implementar nuevas estrategias por lote alimentado para producir SLs.

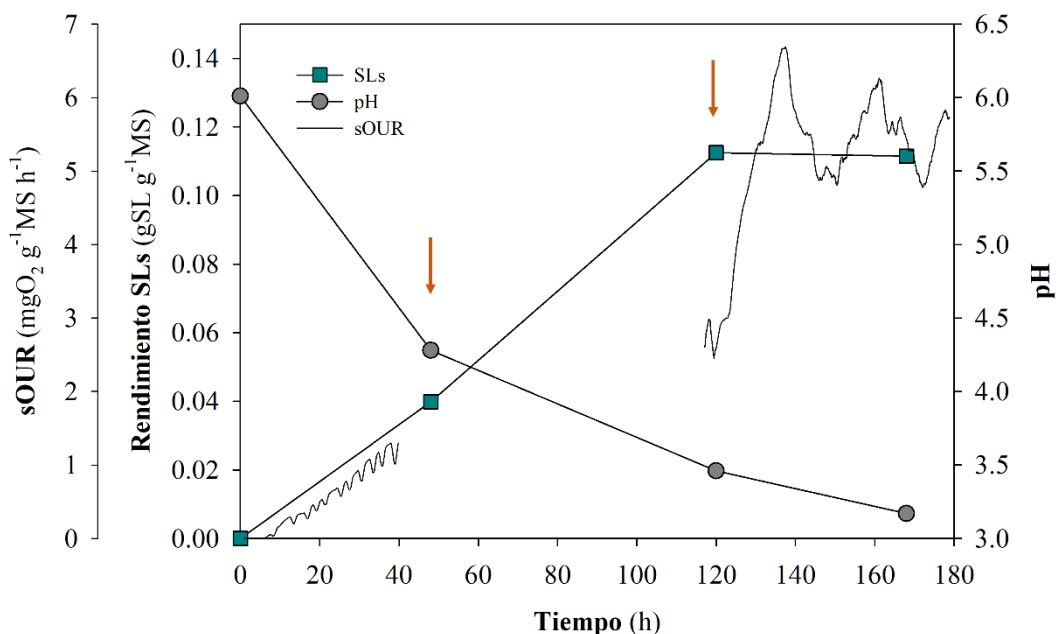


Figura 5.12. Perfil de producción de SLs por FES por lote alimentado. Las flechas indican el tiempo en el que se alimentó el sistema de fermentación.

5.3.4 Escalado de la producción de SLs a 100 L con paja de trigo como soporte

La producción de SLs a escala de más de 100 L ha sido estudiada en algunas ocasiones, sin embargo, estos estudios son mediante fermentación sumergida; por ejemplo, a una escala de 100 L la producción de SLs fue 12 g L⁻¹ (Daniel *et al.*, 1999) y a la escala de 150 L la producción de SLs fue de 199 g L⁻¹ (Delbeke *et al.*, 2016). En la actualidad, hasta nuestro conocimiento, la producción de SLs a escala piloto por FES no ha sido estudiada, por lo que los resultados obtenidos con la PT a escala de 22 L nos llevaron a evaluar la producción de SLs a una escala mayor (100L).

Se realizaron dos experimentos a escala de 100 L (E1 PT-100L y E2 PT-100L); para estudiar la dinámica de producción de SLs se realizó a una capacidad menor del reactor (60%) ya que en experimentos anteriores (Jiménez-Peñalver, 2017) realizados a una mayor capacidad (20 kg) no hubo producción de SLs y las temperaturas incrementaron hasta los 45°C. El muestreo se hizo a partir de las 96 h para disminuir los riesgos de contaminación al momento de manipular el reactor, y se continuó con el muestreo para los análisis a las 144 y a la 168 h

cuando finalizó el experimento. El caudal de aire inicial fue de $5,625 \text{ ml min}^{-1}$ equivalente a $1.06 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ el cual se modificó conforme al comportamiento de la fermentación.

La humedad de la mezcla sólida de la FES se mantuvo aproximadamente en un 45% durante ambos experimentos, lo que permitió confirmar que no hubo pérdidas de humedad en el sistema. Los SLs obtenidos después del proceso de extracción presentaron la apariencia característica, mencionada anteriormente, parecida a una miel color ámbar; la Figura 5.13 muestra la apariencia de los SLs obtenidos en los muestreos que se realizaron.

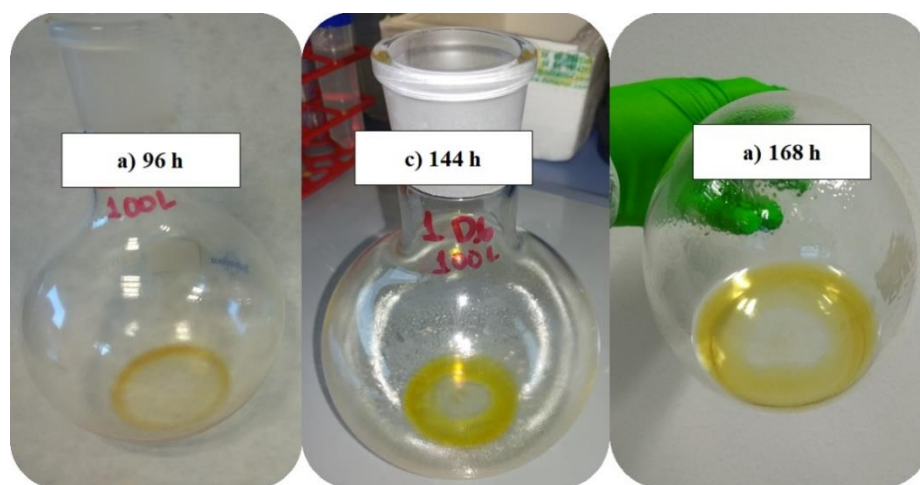


Figura 5.13. Apariencia de los SLs obtenidos en la FES a 100 L (aspecto similar en ambos experimentos).

El perfil de producción de SLs de los experimentos en el reactor de 100 L se presenta en la Figura 5.14. El comportamiento del pH fue similar al de los experimentos anteriores, en donde en ambos casos fue disminuyendo gradualmente de 5.9 a 3.9 en el E1 PT-100L y de 5.8 a 3.6 en el E2 PT 100-L, lo cual fue el indicativo de la formación de los SLs, a diferencia con el trabajo de Jiménez-Peñalver, 2017 que durante el proceso el pH de las fermentaciones incrementó en el cual no hubo producción de SLs. La producción de SLs a las 96 h fue de $0.07 \pm 0.001 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$ en ambos experimentos e incrementó gradualmente hasta alcanzar los 0.13 ± 0.002 y los $0.14 \pm 0.005 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$ a las 168 h en el E1 PT-100L y el E2 PT-100L respectivamente; estos valores fueron inferiores a los presentados en la escala de 22 L con la PT ($0.18 \text{ g SL g}^{-1} \text{ MS}$). Se observó un comportamiento similar de UFC en los dos experimentos, en el E1 PT-100L para las 96 h incrementaron de 2.4×10^9 a 3.0×10^{11} y a partir de las 144 h disminuyeron hasta llegar a 1.1×10^{10} y en el E2 PT-100L de 2.6×10^9 a 5.9×10^{11}

disminuyendo hasta 7.5×10^{11} al finalizar el proceso. La presencia de hongos en las fermentaciones se presentó después de las 144 h, la Figura 5.15 muestra las placas de agar del E2 PT-100L, a pesar de los hongos en los sistemas, la producción de SLs continuó hasta las 168 h en que se finalizó el experimento. El valor máximo de OUR fue de $2.0 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ después de las 48 h estuvo oscilando en el valor hasta aproximadamente las 120 h y un COC de $224.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$.

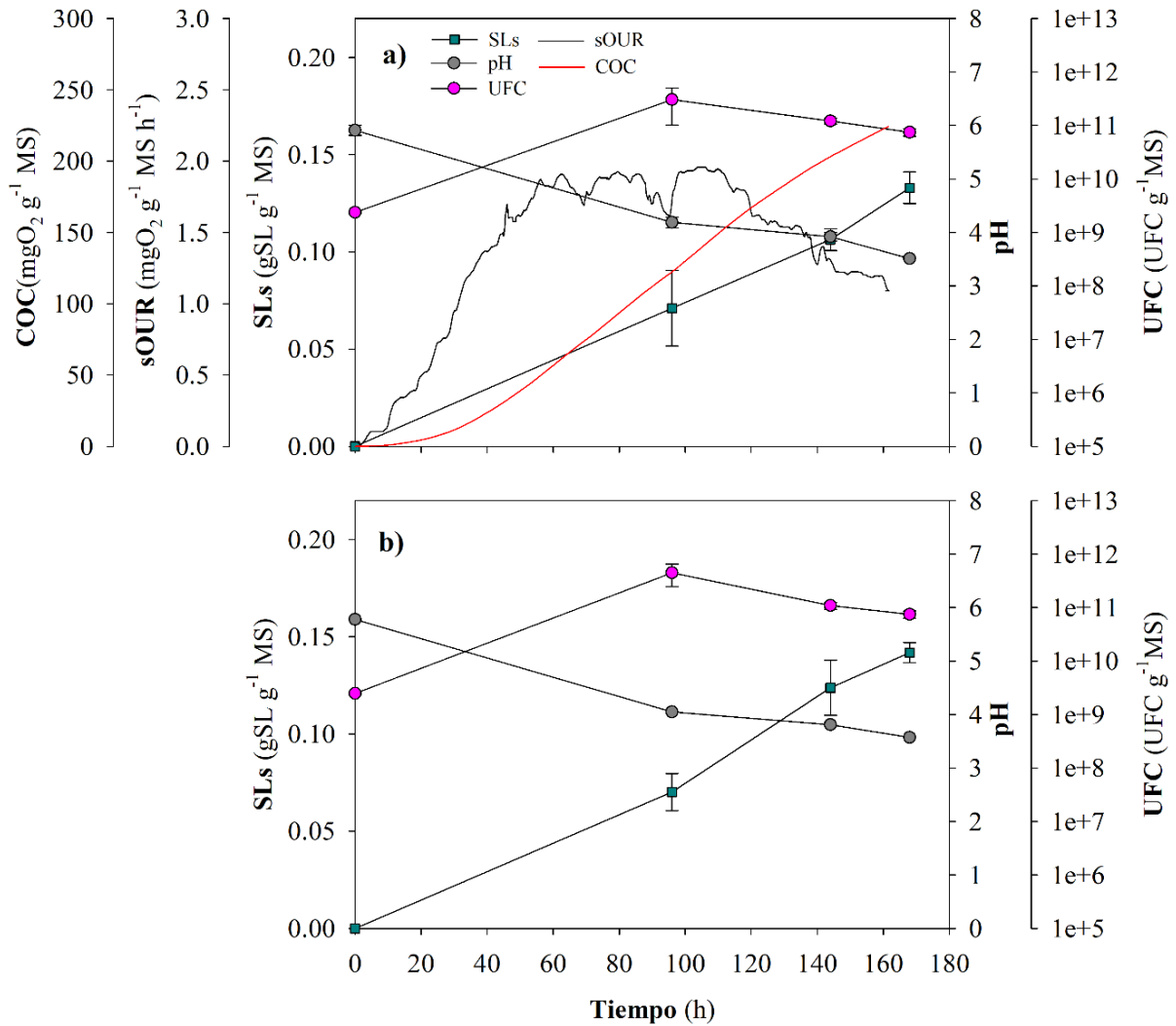


Figura 5.14 a) Perfil de producción de SLs E1 PT-100L b) Perfil de producción de SLs E2 PT-100L.

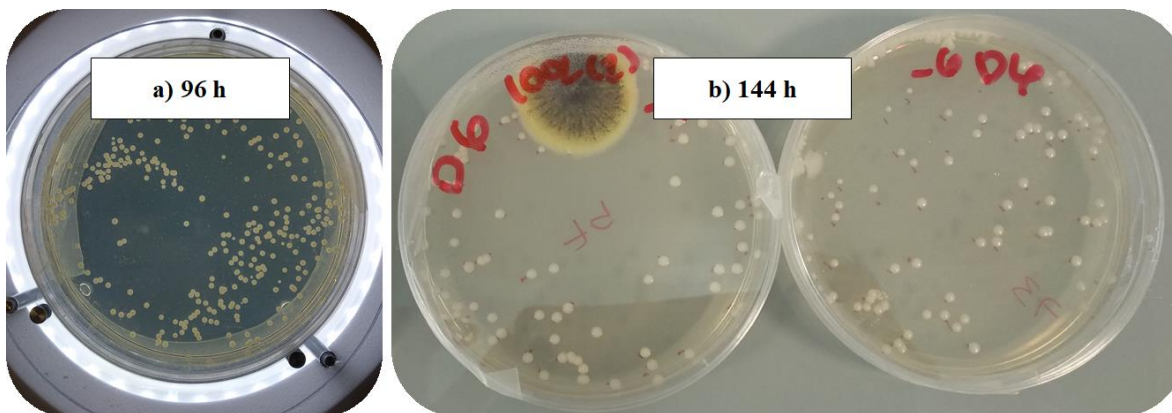


Figura 5.15. Placas UFC de los diferentes tiempos de análisis de la fermentación.

Las temperaturas en ambos experimentos presentaron una dinámica diferente. A pesar de esto, la producción de SLs fue muy similar entre las réplicas (a las 168 h: 0.13 y 0.14 g SL g⁻¹MS en el experimento 1 y 2 respectivamente). La temperatura fue monitoreada con sensores portátiles de temperatura, colocándose 13 sensores en diferentes puntos en el interior el reactor. A las 48 h del proceso, (cuando se detectó que la temperatura empezó a incrementar) el caudal de aire se aumentó a 10,000 ml min⁻¹ equivalente a 1.8 ml min⁻¹g⁻¹MS. Se midió la temperatura ambiente del espacio en que se encontraba el reactor; la Figura 5.16 representa la temperatura ambiente del laboratorio y las temperaturas mínimas y máximas registradas en los dos experimentos realizados. En el E1 PT-100L la temperatura ambiente estuvo entre los 21 y 31°C, mientras que la temperatura mínima entre los 19 y 27°C y la temperatura máxima entre los 31 y 42°C. Mientras que en el E2 PT-100L la temperatura ambiente en el rango de 21 y 25°C, la mínima entre 19 y 24°C y la máxima entre los 29 y 37°C; cómo podemos observar la temperatura ambiente afecta directamente la amplitud de la temperatura dentro del reactor, los datos experimentales demuestran que el hecho de que el reactor no se encuentre aislado, el volumen del reactor y la energía térmica que hay tendrán influencia sobre la dinámica de temperatura. El mismo comportamiento se observó en el E3 PT-22L en donde la temperatura ambiente por debajo de los 20°C favoreció que los valores de temperatura no sobrepasaran los 35°C; por lo que una de las estrategias es mantener el espacio en el que se encuentre el reactor a temperaturas entre los 18 y 20°C.

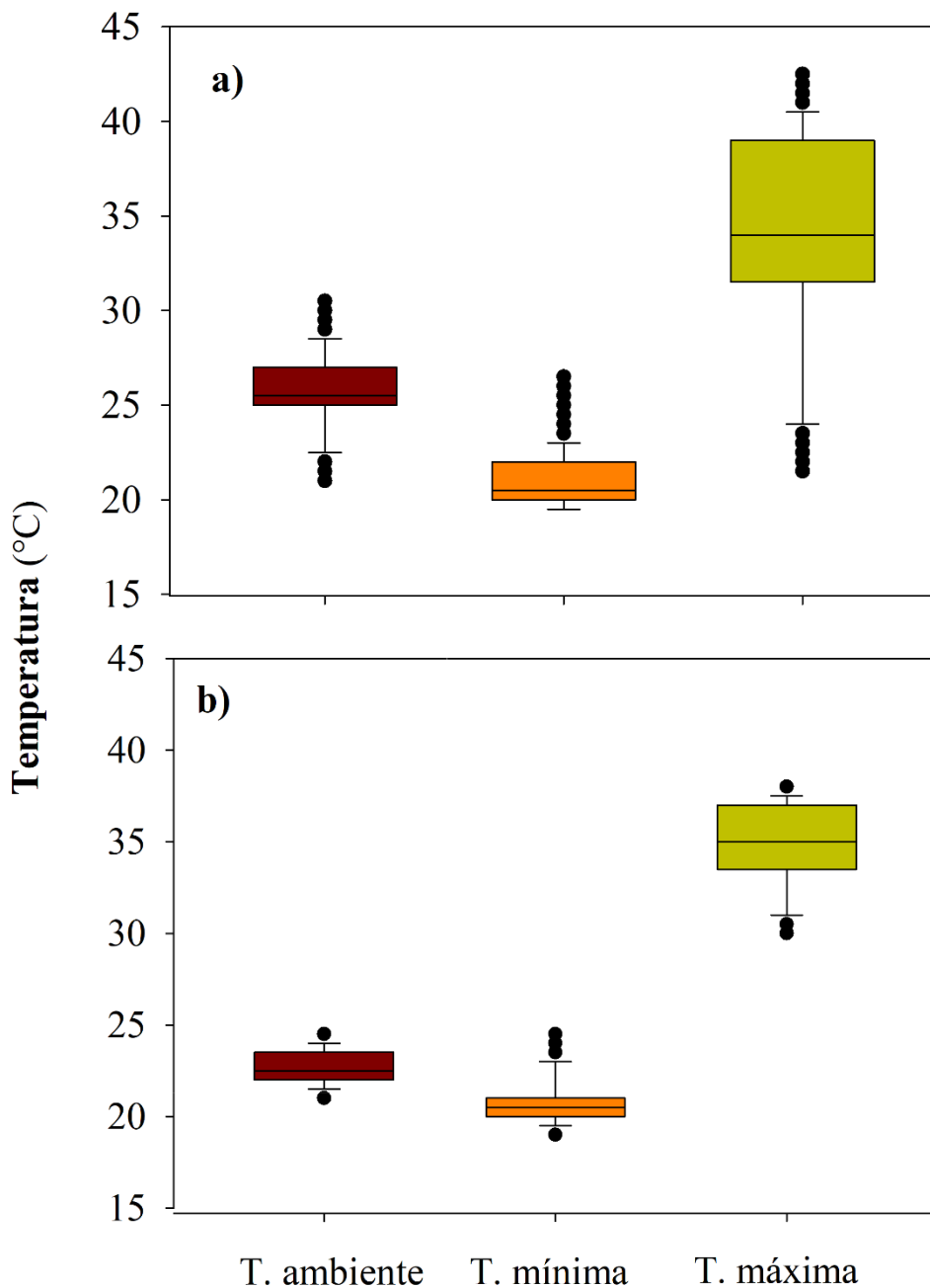


Figura 5.16. Rangos de temperaturas registrada durante los experimentos a) E1 PT-100L
b) E2 PT-100L

Los valores registrados en los sensores con los que se monitoreó la temperatura de los experimentos se presentan en la Figura 5.17. Las máximas temperaturas alcanzadas fueron registradas a las 96 h (E1 PT-100L: 42°C y E2 PT-100L: 38°C), el mismo tiempo en el que la levadura alcanzó su máximo crecimiento según las UFC. Sin embargo, esta elevada

temperatura, solamente se registró en 1 sensor mientras los demás se mantuvieron por debajo de esas temperaturas (E1 PT-100L: por debajo de los 38°C y en el E2 PT-100L: por debajo de los 34°C). En el E1 PT-100L se decidió realizar un mezclado en el reactor a las 121 h para homogenizar la mezcla y mejorar la distribución de la aireación en el sistema; sin embargo, notamos que la temperatura incrementó nuevamente hasta los 42°C (en el punto máximo). Jiménez-Peñalver *et al.* (2016) reportó que en una escala de 0.5 L a una temperatura controlada de 30°C en un baño termostático, al hacer un mezclado en el sistema la producción de SLs incrementa, sin embargo, en nuestro experimento a la escala de 100 L esta estrategia no fue factible. El incremento pudo haber sido a que la agitación provocara una compactación en el material y por consiguiente una ineficiencia de aire causando un aumento de la temperatura. Un efecto similar observó Jiménez-Peñalver (2017), en donde registró temperaturas de hasta 45°C, sin embargo, la levadura no fue capaz de producir SLs.

Las temperaturas del reactor del E1 PT-100L se mantuvieron en el rango de 18 y 33°C a excepción de 3 sensores en los que se registró entre los 35 y 42°C. Mientras que en el reactor del E2 PT-100L la temperatura se mantuvo más estable entre los 19 y 32°C, a excepción del sensor que presentó altas temperaturas (de 34 a 38°C); probablemente este fenómeno sucedió porque el punto en donde se encontraban los sensores sería un punto en el que se compactó el sólido o no le alcanzaba suficientemente la aireación como para mantener la misma temperatura que los demás puntos en los que se encontraban los sensores. En procesos de FES para la producción de otros compuestos de interés, como lo son las enzimas, han estudiado diferentes estrategias para evitar compactación e incremento de temperatura en el sólido. Por ejemplo, Pitol *et al.* (2016) para la producción de pectinasas a una capacidad de 200 L, lograron las máximas actividades enzimáticas del estudio implementando una estrategia para evitar la compactación del material (agregando otro sólido estructurante en 10%) y controlando la temperatura del aire de entrada del reactor mediante el suministro de aire más frío en el momento que la temperatura en el reactor supera los 35 °C. Biz *et al.* (2016) asegurando una buena estructura y porosidad de la mezcla sólida para evitar la formación de aglomerados y suplementando agua a una columna de humidificación lograron producir enzimas exitosamente. Otras estrategias como la agitación continua del reactor, el enfriamiento de la pared del reactor y el enfriamiento evaporativo (ajustando el caudal de aireación) han funcionado para el cultivo de *Aspergillus oryzae* (Nagel *et al.*, 2001).

En nuestro estudio se observó que la agitación de la mezcla sólida en el reactor no favoreció el proceso y que a pesar de las dinámicas de temperatura, la producción de SLs no se vio afectada, ya que la levadura fue capaz de producirlos a lo largo de las 164 h de fermentación, por lo que los ciclos de esterilización y el aumento de caudal de aire fueron las mejores estrategias para producir SLs a una escala mayor; sin embargo es necesario estudiar el proceso a una capacidad mayor.

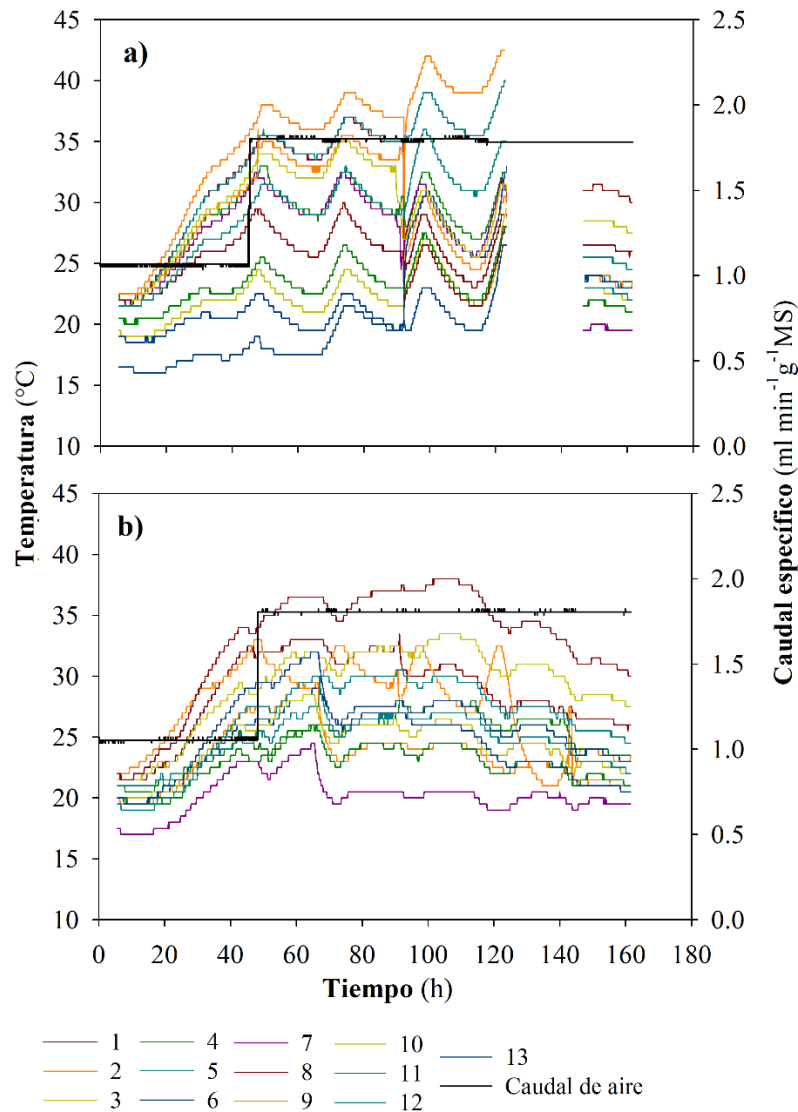


Figura 5.17. Perfiles de temperatura FES 100 L. a) E1 PT-100L b) E2 PT-100L. (Los números (1-13) representan los diferentes sensores de temperatura)

5.3.5 Producción de SLs mediante FES: 0.5 L – 22 L – 100 L.

Los experimentos para la producción de SLs mediante FES utilizando como sustrato MEL y WOC con paja de trigo como soporte realizados en el presente trabajo han demostrado tener resultados con gran potencial. La tabla 5.3 resume los rendimientos obtenidos a diferentes tiempos del proceso en las diferentes escalas evaluadas (0.5, 22 y 100 L) y representa la media de los datos experimentales en términos volumétricos, de sustrato y materia seca. Como se observa, los mayores rendimientos volumétricos y de sustratos fueron a las 168 h en el experimento de 22 L (17.6 ± 0.917 g SL L⁻¹ y 0.24 ± 0.013 g SL g⁻¹ sustrato), mientras que la escala de 0.5 no presentó diferencias significativas entre los rendimientos volumétricos a las 120, 144 y 168h (13.7 ± 0.145 , 14.6 ± 0 y 14.8 ± 0 g SL L⁻¹ respectivamente) en comparación con el reactor de 100 L a las 168 h (14.0 ± 0.382) y en términos de sustrato a las 120 h en la escala de 0.5 L (0.19 ± 0.009 g SL g⁻¹ sustrato) no presentó diferencias significativas con lo obtenido a las 144 y 168 h (0.17 ± 0.032 g SL g⁻¹ sustrato y 0.19 ± 0.007 g SL g⁻¹ sustrato) a escala de 100 L. La concentración de SLs por gramos de materia seca, como se mencionó en el capítulo 4 representa una gran importancia para el proceso posterior de la recuperación del producto. Al igual que en los rendimientos volumétricos y por sustrato, la mayor producción de SLs fue de 0.18 ± 0.008 g SL g⁻¹ MS en el reactor de 22 L a las 168 h, mientras que en el reactor de 0.5 L a las 120, 144 y 168 h (0.14, 0.15 y 0.16 g SL g⁻¹ MS) los valores fueron similares estadísticamente en comparación con lo obtenido a las 144 h y 168 h (0.12 y 0.14 g SL g⁻¹ MS) en el reactor de 100 L.

Los resultados anteriores se encuentran ligeramente por debajo con los obtenidos en los experimentos realizados por Jiménez-Peñalver (2017); en la escala de 0.5 L obtuvo 0.18 g SL g⁻¹ MS, en la escala de 40 L presentó rendimientos de 0.26 g SL g⁻¹ MS y en la escala de 100 L no tuvo producción de SLs. Probablemente los buenos resultados obtenidos por el autor a la escala de 40 L tienen relación a que la configuración del reactor evita la compactación del material (lecho empacado dividido en tres bandejas de 8 cm de altura cada una). Esto indica la necesidad de que los reactores presenten una configuración adecuada para evitar interferencias en el proceso de FES.

Tabla 5.3 Producción de SLs en FES a diferentes escalas 0.5, 22 y 100 L. Las letras iguales indican que los valores no presentan diferencias significativas a $p < 0.05$.

Tiempo (h)	g SL g ⁻¹ MS		g SL g ⁻¹ MS d ⁻¹		g SL L ⁻¹		g SL L ⁻¹ d ⁻¹		g SL g ⁻¹ sustrato		g SL g ⁻¹ sustrato d ⁻¹	
0.5 L												
24	0.01 ^e	± 0.003	0.010	0.9 ^j	± 0.242	0.914	0.01 ^o	± 0.003	0.013			
48	0.04 ^{de}	± 0.002	0.018	3.5 ^{ij}	± 0.000	1.727	0.05 ^{no}	± 0.002	0.024			
72	0.08 ^c	± 0.012	0.027	7.6 ^h	± 0.000	2.543	0.11 ^m	± 0.015	0.035			
120	0.14 ^{ab}	± 0.007	0.028	13.7 ^{fg}	± 0.145	2.747	0.19 ^l	± 0.009	0.038			
144	0.15 ^{ab}	± 0.001	0.026	14.6 ^{fg}	0.000	2.432	0.20 ^{kl}	± 0.001	0.034			
168	0.16 ^{ab}	± 0.002	0.022	14.8 ^{fg}	0.000	2.119	0.21 ^{kl}	± 0.002	0.029			
22 L												
72	0.06 ^{cd}	± 0.019	0.019	5.7 ^{hi}	± 1.863	1.887	0.08 ^{mn}	± 0.026	0.026			
120	0.13 ^b	± 0.006	0.026	12.7 ^g	± 0.640	2.534	0.17 ^l	± 0.009	0.035			
168	0.18 ^a	± 0.008	0.026	17.6 ^f	± 0.917	2.512	0.24 ^k	± 0.013	0.035			
100 L												
96	0.07 ^{cd}	± 0.001	0.018	6.9 ^{hi}	± 0.152	1.714	0.09 ^{mn}	± 0.002	0.024			
144	0.12 ^b	± 0.025	0.021	12.1 ^g	± 2.356	2.016	0.17 ^l	± 0.032	0.028			
168	0.14 ^b	± 0.005	0.020	14.0 ^{fg}	± 0.509	1.969	0.19 ^l	± 0.007	0.026			

Las máximas productividades obtenidas fueron en todos los casos a las 120 h del proceso tanto en términos de materia seca, volumétrico y por gramo de sustrato tanto para la escala 0.5 y 22 L las productividades resultaron ser similares; por ejemplo, 2.75 y 2.53 g SL L⁻¹ d⁻¹ y en la escala de 100 L 2.02 g SL L⁻¹ d⁻¹. Los resultados muestran valores prometedores para la producción de SLs en una escala mayor, sin embargo, es necesario estudiar a más a detalle la escala de 100 L para incrementar los rendimientos de producción.

5.3.6. Evaluación de estrategia de residuos cero

El proceso de FES para la producción de SLs finaliza después de la extracción de los compuestos con acetato de etilo del sólido fermentado, el cual es considerado como un residuo que puede impactar en el medio ambiente. Por tal motivo, es necesario buscar alternativas para darle un valor agregado y aprovecharlo para la obtención de productos que puedan ser utilizados en otras áreas. Una de ellas es la producción de metano mediante digestión anaerobia. Esta tecnología es una de las formas más sostenibles de aprovechar la energía presente en la biomasa y otros desechos, ya que cualquier tipo de biomasa que esté constituida principalmente por carbohidratos, proteínas, grasas, celulosa y hemicelulosa presentan potencial para la producción de biogás, el cual podría ser utilizado para producir energía para el propio proceso (Grando *et al.*, 2017). Por lo que se realizaron dos experimentos para determinar el potencial que tienen los sólidos fermentados finales o residuo sólido final (RSF) para producir metano.

El primer experimento se realizó con el RSF procedente de la fermentación con la CA en el reactor de 22 L, saturados con acetato de etilo tras la extracción de SLs. La caracterización del inóculo y del sustrato de CA (RSF) se presentan en la tabla 5.1. El tiempo del experimento fue de 45 días, en donde se produjeron un total de 107.6 L kg⁻¹ SV d⁻¹ de biogás. La Figura 5.18 muestra el rendimiento de metano producido por día y el acumulado durante todo el proceso; en donde se observa un periodo de latencia de 20 días, tiempo en el cual no hubo producción de metano, sino hasta el día 45 en donde se produjeron 22.2 L CH₄ kg⁻¹ SV. Cabe señalar que los RSF contenían aproximadamente 1.8 g de acetato de etilo residual procedente de la extracción de SLs, lo cual inhibió las bacterias del consorcio anaerobio encargado de degradar la materia orgánica a metano y dióxido de carbono. El acetato de etilo es

biodegradable en condiciones anaerobias (Schwartz, 1991; Henry *et al.* 1996), por lo que una alternativa sería implementar un digestor anaerobio con el material residual con aclimatación de biomasa previa. Sin embargo, sería necesario recuperar el acetato de etilo residual en el sólido evaporándolo para reducir costes, y de esta manera, nos permitirá determinar el potencial que presenta el sólido sin acetato de etilo, ya que se tiene como objetivo evaluar otros métodos para la recuperación de SLs que no utilicen solventes orgánicos para la extracción.

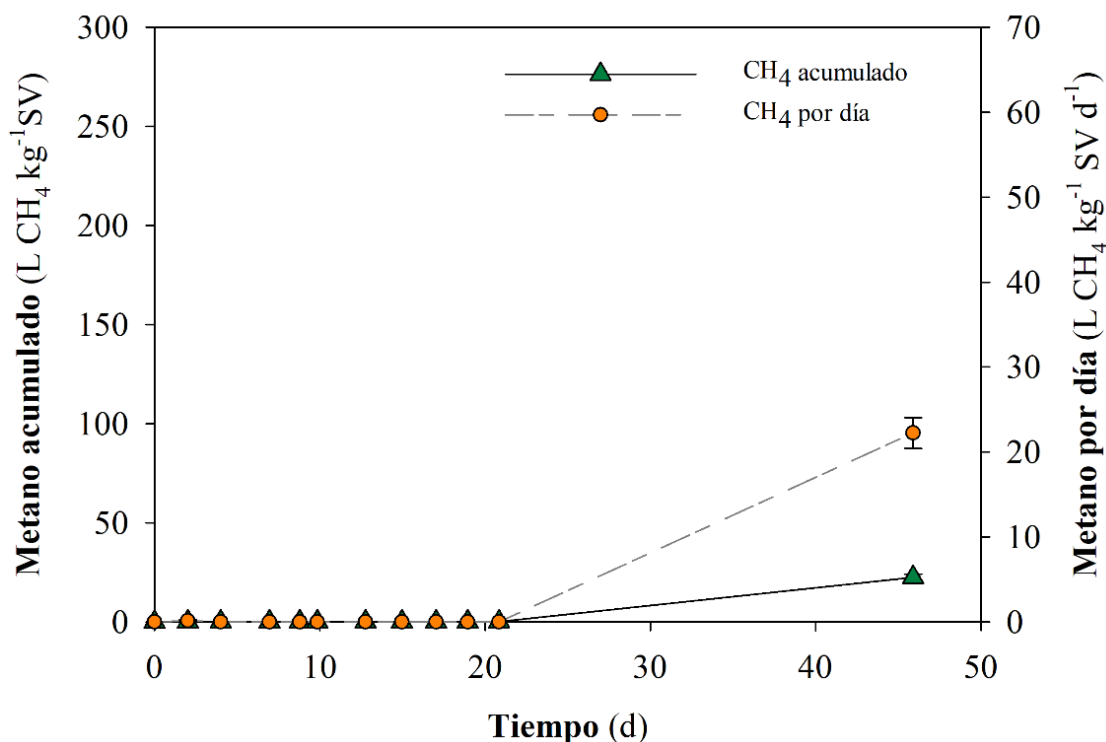


Figura 5.18. Producción de metano con el RSF del experimento de 22L con CA.

Los resultados que se obtuvieron en el experimento de digestión anaerobia anterior con CA nos llevaron a evaporar el acetato de etilo residual que se queda impregnado en el RSF ya que inhibe el crecimiento de los microorganismos del proceso de digestión anaerobia. Esta vez el experimento se realizó utilizando el RSF procedente del experimento de 22 L con la PT y tuvo una duración de 43 días evaluando constantemente el biogás producido.

La caracterización del RSF evaporado y el inóculo anaerobio se presentan en la tabla 5.1 (inóculo y sustrato PT) en donde el contenido de MO y MS de la paja fue del 96.1% y 77.3%

respectivamente, mientras que del inóculo 2.81% de MS y 65.45% de MO y un pH de 8.2. Los resultados de producción de metano se presentan la Figura 5.19 en donde se presentan los valores de metano producidos por día y el metano acumulado producido a lo largo del proceso. A diferencia del experimento anterior, se produjeron un total de $409.7 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$ de biogás. La producción de metano fue incrementando a partir del día 4 presentando la mayor producción de $62.8 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV d}^{-1}$ a los 15 días del experimento, a partir del día 17 fue disminuyendo hasta alcanzar un valor final de $9.2 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV d}^{-1}$.

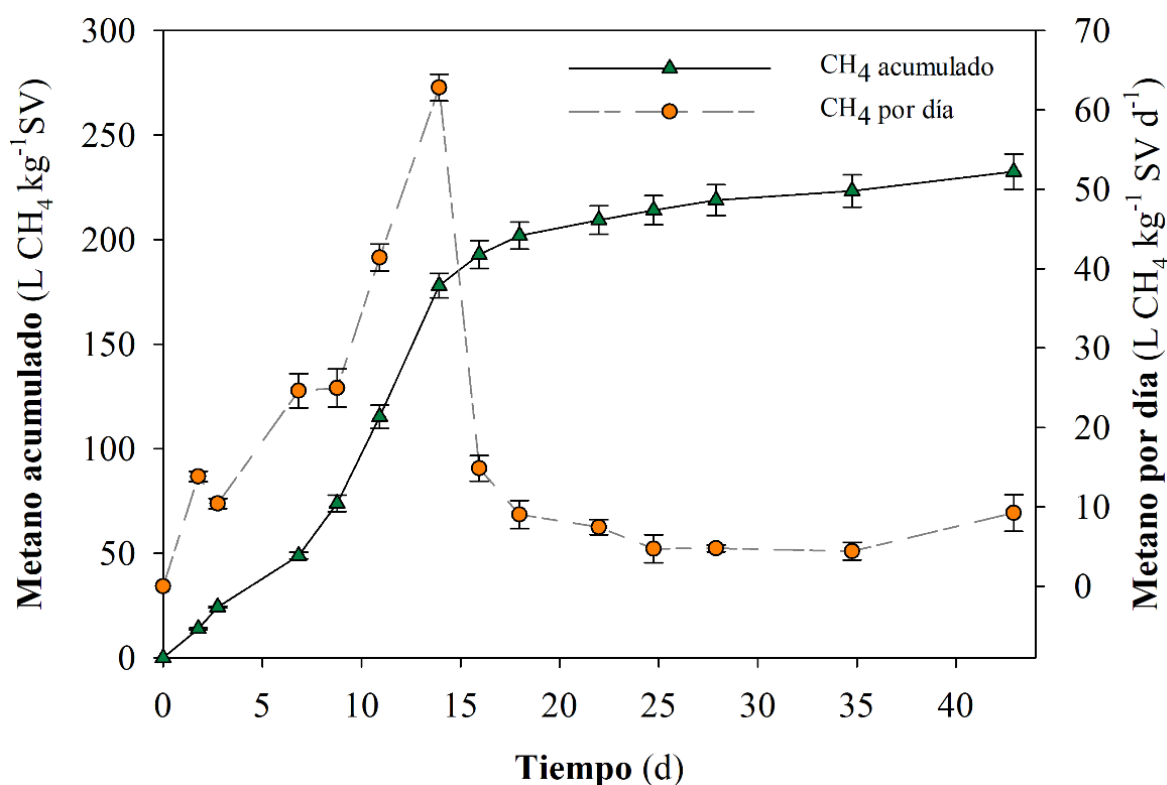


Figura 5.19. Producción de metano con el RSF del experimento de 22 L con PT.

El rendimiento de metano acumulado (Figura 5.19) del RSF fue de $232.5 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$ al día 43 de la DA. Los valores obtenidos son menores a los reportados por Tong *et al.*, (1990) de $332 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$ al utilizar la paja de trigo como sustrato, pero mayores a los presentados por diversos autores. Por ejemplo; Cui *et al.*, (2011) comparó la producción de metano en paja de trigo limpio y paja de trigo con residuos de estiércol de caballo obteniendo valores de 90 y $150 \text{ L CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$ respectivamente. Por otro lado, la producción de metano con

residuos alimenticios presentó valores de 579 L CH₄ kg⁻¹ SV y con residuos de jardín 160 L CH₄ kg⁻¹ SV (Fitamo *et al.*, 2016).

La producción de metano está relacionada con el tamaño de la partícula, el volumen de poro y la disponibilidad de superficie para reacciones enzimáticas, así como del contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y la biodegradabilidad de la celulosa, hemicelulosa y lignina en el proceso de DA (Liew *et al.*, 2015). Probablemente nuestros rendimientos son superiores a los anteriormente mencionados ya durante el proceso de FES para la producción de SLs la levadura consume aproximadamente un 60% de las grasas (Jiménez-Peñalver, 2017) y un 90% de los azúcares que se agregan, por lo que existe un contenido tanto de grasas como de azúcares en el SFR el cual favorece a la producción de metano.

Estos resultados nos muestran que el RSF presenta un potencial para la producción de biogás y metano interesante, pues ya nuestros resultados no se encuentran tan alejados de lo reportado en los estudios donde utilizan fracción orgánica municipal y aguas residuales, por ejemplo; Dasgupta y Chandel (2020) reportan una producción de biogás de 407.1 L kg⁻¹ SV con un 68.9% de metano a partir de fracción orgánica de residuos municipales (FORM), similar a nuestro resultado de 409.7 L kg⁻¹ SV con un 56.8% de metano (232.5 L CH₄ kg⁻¹ SV). En otros estudios reportaron valores de metano de 344, 220 y 402 NmL g⁻¹ SV (Zhang *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2018; De la Rubia *et al.* 2018) en experimentos de co-digestión de FORM con otros residuos. Estos resultados nos dan una alternativa para darle un valor agregado a los residuos provenientes de la FES para la producción de SLs y compensar los consumos energéticos o facilitar su gestión externa.

5.3.7. Evaluación de emisiones del proceso de FES para la producción de SLs

Las emisiones gaseosas juegan un rol muy importante sobre el impacto ambiental de los procesos. Los COVs (por lo general compuestos organosulfurados, compuestos nitrogenados, cetonas y terpenos), el NH₃, H₂S, N₂O y el CH₄ son de los principales gases emitidos durante los procesos de FES y son los responsables de producir contaminación atmosférica y malos olores (Maulini-Duran *et al.*, 2015). Todos estos compuestos gaseosos están relacionados con la descomposición biológica de materia orgánica, compuestos a base de nitrógeno y azufre (González *et al.*, 2019).

Se determinaron las emisiones gaseosas de los experimentos con PT en el reactor de 22 L (E1 PT-22L y E2 PT22L). Las emisiones totales que se detectaron en los experimentos se presentan en la Figura 5.20 en donde los COVs fueron los de mayor presencia con un valor de 473.5 y 202.40 mg de COVs $g^{-1}MS$ en el E2 PT-22L y en E1 PT-22L respectivamente; seguido por el NH_3 con 61.06 mg de $NH_3 g^{-1}MS$ (E1 PT-22L) y 53.0 mg de $NH_3 g^{-1}MS$ (E2 PT-22L) y en menor presencia el CH_4 con 29.39 y 18.87 mg de $CH_4 mg^{-1}MS$ en el E1 PT-22L y E2 PT-22L, respectivamente. Finalmente, solo se detectó la presencia de N_2O en el E1 PT-22L de 3.90 mg de $N_2O mg^{-1}MS$ y H_2S no se detectó en ninguno de los experimentos.

Las emisiones de metano están relacionadas con la presencia de zonas anaeróbicas ya sea debido a una humedad excesiva, una porosidad insuficiente o una aireación inapropiada (Puyuelo *et al.*, 2010). Así mismo, se ha reportado que las emisiones de NH_3 (Pagans *et al.*, 2006), COVs (Maulini-Duran *et al.*, 2014, 2013) y H_2S (Chen *et al.*, 2010) están relacionadas con la temperatura en el proceso; en nuestros experimentos se presentaron diferentes dinámicas de temperatura (Figura 5.9) lo que pudo haber propiciado las diferencias entre las emisiones de estos compuestos, mientras que no se detectó presencia de N_2O lo cual es de gran importancia ya que la contribución del N_2O al calentamiento global es significativamente mayor que el CO_2 o el CH_4 (Maulini *et al.*, 2015). Finalmente, las emisiones por gramo de soforolípido producido se presentan en la tabla 5.4 en donde se describe el inventario ambiental del proceso.

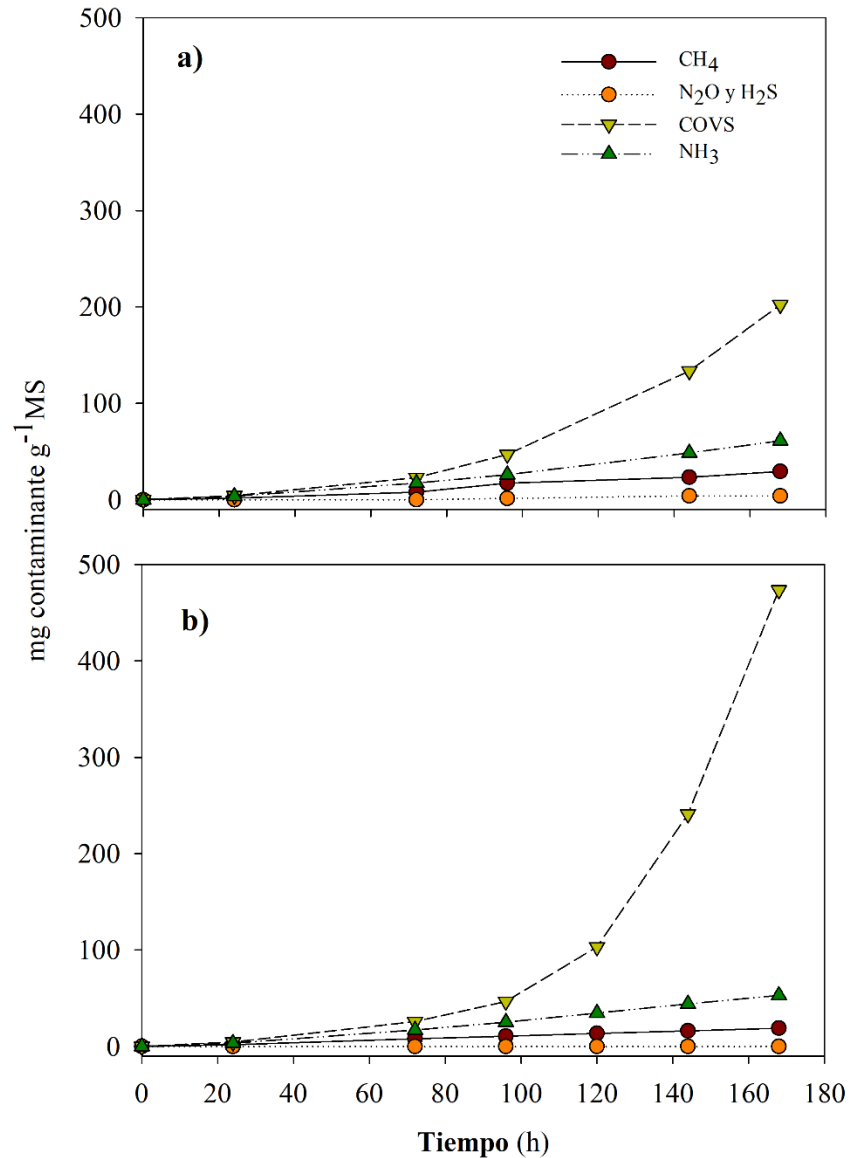


Figura 5.20. Emisiones gaseosas producidas en el proceso de FES para la producción de SLs. a) E1 PT -22L, b) E2 PT -22L. CH₄: metano, COVs compuestos orgánicos volátiles, NH₃: amoníaco y H₂S: ácido sulfhídrico.

5.3.8 Inventario de entradas y salidas del proceso

En todos los procesos es de suma importancia evaluar cual es el impacto tanto ambiental como económico para que pueda ser sostenible. La mayoría de los estudios reportan solamente los procesos y los resultados obtenidos en cuanto a la producción de SLs, omitiendo los impactos que presentan y el coste de producción. Son muy pocos los estudios

que reportan impactos ambientales (Baccile *et al.*, 2016 y Kopsahelis *et al.*, 2018), sin embargo, estos estudios están enfocados a la producción de SLs por Fms. Por tal motivo, en la tabla 5.4 se presenta el resumen de los datos de entrada y salida que implican en el proceso de la producción de SLs por FES. Estos datos servirán para realizar el estudio económico y el análisis de ciclo de vida del proceso, el cual se realiza en colaboración con la investigadora María Eugenia Martínez de la fundación Fraunhofer de Santiago de Chile. La tabla 5.4 nos muestra que el consumo tanto de acetato de etilo y hexanos son muy elevados, lo cual podría tener un impacto negativo tanto ambiental como en los costes del proceso, por lo que, como alternativa se analizaron otras tecnologías para la recuperación de SLs las cuales se presentan en el siguiente capítulo.

Tabla 5.4 Resumen de entradas y salidas del proceso de producción de SLs por FES utilizando paja como soporte a una escala de 22 L.

ENTRADAS	Valor	Unidad	Comentarios
Paja de trigo	0.578	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
WOC	0.957	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
Melaza	0.239	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
Agua	1.064	L	Para el 75% de la capacidad del reactor
Humedad WOC	9.08	%	
Humedad Melaza	25.07	%	
Humedad PT	5.6	%	
Humedad mezcla	46.15	%	
Agitación y tiempo inóculo	130 / 48	rpm/h	
Aire FES y duración	1237 / 72	ml/min/h	
	1650 / 96	ml/min/h	

Agua (inóculo)	0.264	L	Para el 75% de la capacidad del reactor
Glucosa (inóculo)	10	g L ⁻¹	
Peptona (inóculo)	5	g L ⁻¹	
Extracto de malta (inóculo)	3	g L ⁻¹	
Extracto de levadura (inóculo)	3	g L ⁻¹	
Agitación (FES)	Estático	rpm/t	
autoclave (T y t)	121/ 1	°C/h	3 ciclos de esterilización
Acetato de etilo recuperado	19	L/kg	
Hexano	4	L/kg	
Rotavapor (T y t)	40 / 20	°C / min	Por cada extracto de 200 ml a evaporar
Consumo de agua	1,333	L/h/kg	Evaporación de extractos
Consumo energético	57,410	W/h/kg	Evaporación de extractos
	7,680	W/h/kg	Producción de inóculo
SALIDAS	Valor	Unidad	Comentarios
Sólido fermentado	2.822	kg	
Humedad sólido fermentado	46.40	%	
Soforolípido	0.29	Kg	
Acetato de etilo residual	1	L/kg	
Hexano residual	4	L/kg	

Emisiones gaseosas:		
Metano	0.033-0.049	mg CH ₄ g SL
Óxido nitroso	0.007	mg N ₂ O g SL
COVs	0.365-0.775	mg COVs g SL
Amoniaco	0.091-0.112	mg NH ₃ g SL
Ácido sulfhídrico	ND	mg H ₂ S g SL
Potencial metanogénico		
Biogás	409.7	L kg ⁻¹ SV d ⁻¹
Metano	232.5	L CH ₄ kg ⁻¹ SV

ND: No detectable

5.4 Conclusiones

Los resultados del escalado del proceso de SLs por FES muestran que el proceso de producción de SLs se puede incrementar de escala laboratorio a escala piloto. El principal desafío del escalado de la producción de SLs es el incremento de la temperatura durante el proceso de fermentación; sin embargo, observamos que con una estrategia de aireación y una temperatura ambiente adecuada la temperatura puede ser controlada.

Uno de los problemas detectados inicialmente, la contaminación por otros microorganismos en los sistemas se logró reducir considerablemente después de realizar los ciclos de esterilización al soporte y a la mezcla sólida. Esto permitió disminuir el crecimiento de hongos y otros microorganismos que pudieran inhibir el crecimiento de la levadura sin importar la escala de producción.

Los rendimientos obtenidos en el proceso de fermentación por lote alimentado nos llevaron a descartar esta estrategia para el aumento de la producción de SLs, ya que la contaminación por otros microorganismos no permitió que la levadura incrementara los rendimientos respecto al proceso en discontinuo.

La levadura *S. bombicola* tiene la capacidad de producir SLs a pesar de que se alteren las condiciones óptimas para su crecimiento (temperatura de hasta 42°C). El escalado a 22 L mostró resultados con gran potencial ya que se logró incrementar de 0.16 g SL g⁻¹MS de la escala de 0.5 L a 0.18 g SL g⁻¹MS, los rendimientos a la escala de 100 L fueron menores en comparación a los obtenidos en el reactor de 22 L (0.14 g SL g⁻¹MS), sin embargo, se podría evaluar a una capacidad mayor del reactor y buscar otras estrategias para mejorar la producción. La mayor productividad se presentó a las 120 h del proceso en todas las escalas, lo cual, en términos de reducción de costes de producción podría ser favorable a nivel industrial.

La visión general del proceso nos lleva a determinar la capacidad del sólido fermentado residual para producir metano, lo cual podría compensar los consumos eléctricos o facilitar su gestión externa.

Finalmente, los resultados obtenidos han permitido iniciar con los estudios para el análisis del ciclo de vida y costes del proceso, en donde, resultados preliminares indican que el mayor impacto es el proceso para la extracción y recuperación de SLs al utilizar solventes orgánicos como lo es el acetato de etilo. Aquí es donde se detecta la importancia y necesidad de explorar y mejorar dicho proceso; para esto se llevó acabo un diseño de experimentos y se evaluaron tecnologías que presentan gran potencial para la recuperación de bioproductos y además son ambientalmente sostenibles, estos resultados se presentan en el siguiente capítulo (Capítulo 6).

Capítulo VI

EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y RECUPERACIÓN DE SOFOROLÍPIDOS

Este capítulo fue realizado como parte de la estancia de investigación en Centro de Biotecnología-FEMSA del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) en Monterrey, Nuevo León México. Noviembre 2019 – abril 2020.

Resumen

El presente capítulo está conformado por la evaluación de diferentes estrategias para la recuperación de soforolípidos después del proceso de fermentación de estado sólido. Se realizó un diseño de experimentos (DoE) para evaluar cuales son las mejores condiciones de extracción de SLs con acetato de etilo para determinar la posibilidad de mejorar o modificar el proceso. Las variables que se evaluaron fueron la proporción de sólido fermentado:solvente, el tiempo y el número de extracciones.

Posteriormente, se evaluaron diferentes estrategias de extracción de SLs con la finalidad de establecer procesos más eficientes y de bajo impacto ambiental. Estos estudios fueron realizados durante una estancia de investigación de cuatro meses en el Centro de Biotecnología-FEMSA del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) en Monterrey, Nuevo León México.

Se evaluaron diferentes solventes (agua y etanol) para la extracción de los compuestos de la matriz sólida fermentada. Los extractos de SLs crudos obtenidos fueron cuantificados y caracterizados mediante HPLC para comprobar la extracción de dichos compuestos.

Además, se evaluaron dos tecnologías alternativas para extraer SLs de la matriz sólida: Sistemas de dos fases acuosas (ATPS) alcohol-sal y extracción con fluidos super críticos (FSC).

En el presente estudio se demuestra que existe un gran potencial para la extracción y recuperación de SLs mediante tecnologías alternas a la extracción con solventes orgánicos. Los resultados con ATPS permiten la recuperación de SLs en cantidades mayores que con la extracción convencional y tanto con ATPS y FSC el tiempo de extracción se reduce considerablemente. Esto indica la necesidad de realizar más estudios para optimizar los procesos y conseguir mejores resultados.

6.1 Materiales

Los experimentos de extracción de SLs con diferentes solventes se hicieron utilizando el sólido fermentado (SF) resultante del experimento E3 PT-22L (Capítulo 5 sección 5.3.2) en dos diferentes tamaños de partícula como se observa en la Figura 6.1: SF de tamaño aproximadamente de 3 a 9 mm; y SF triturado (SFT) con tamaño resultante de la trituración con molino de café. Primero, las extracciones se realizaron usando como solventes acetato de etilo, etanol (96% grado analítico) y agua tipo I ultrapura Milli-Q. Las extracciones en Sistemas de Dos Fases Acuosa o ATPS, se hicieron con sulfato de amonio, el cual se preparó al 35% p/p (35 g de sulfato de amonio y 65 g de H₂O desionizada), etanol al 96% y agua tipo I ultrapura Mili-Q, los cuales fueron previamente filtrados utilizando membranas de celulosa de 0.22 μ m para eliminar impurezas. Finalmente, la extracción mediante CO₂ supercrítico de SLs se hizo a partir del SF, previamente liofilizado durante 24 h para eliminar la humedad (50 g de SF para cada experimento), usando etanol (96%) como cosolvente para la extracción.



Figura 6.1. Izquierda: sólido fermentado sin triturar. Derecha: sólido fermentado triturado.

6.2 Condiciones experimentales

El presente capítulo consiste en explorar y analizar tecnologías alternativas a los métodos convencionales usados para la extracción de SLs. Los experimentos para la extracción y recuperación de SLs se encuentran divididos en cuatro etapas, las cuales se resumen en la Figura 6.2.

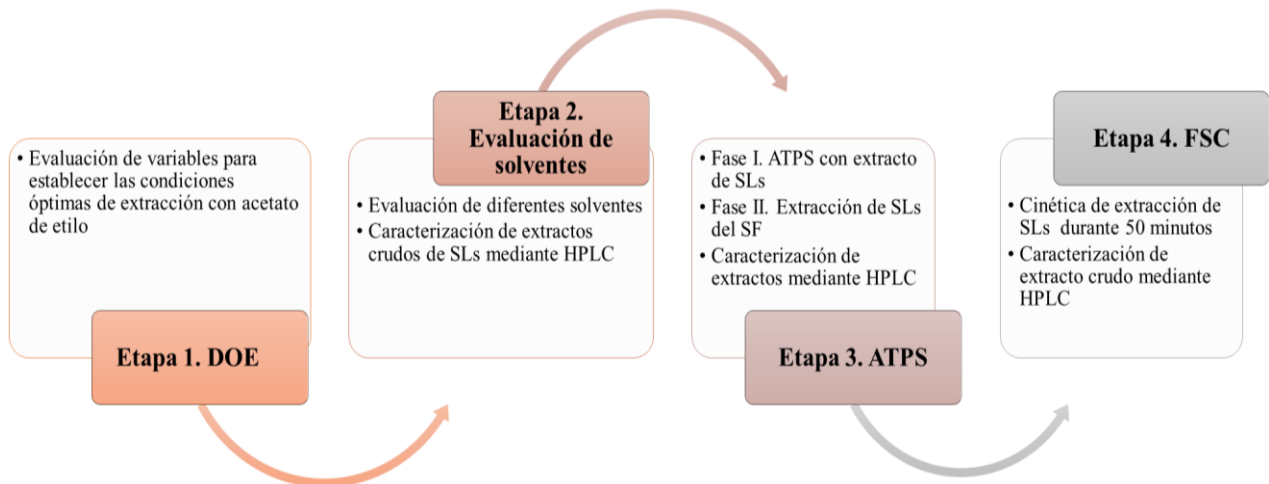


Figura 6.2. Diagrama de las diferentes etapas para la evaluación de diferentes alternativas para la extracción de soforolípidos (ATPS: Sistemas de dos fases acuosas; FSC: Fluidos supercríticos).

La primera etapa consistió en realizar un DoE factorial (tres factores y tres niveles cada uno) para evaluar las variables que afectan el proceso de extracción de SLs. El diseño consistió en 15 experimentos (12 experimentos más tres réplicas del punto central para la validación estadística) en donde se evaluó la proporción (p/v) de SF:acetato de etilo (1:4, 1:7 y 1:10), el tiempo de extracción (20, 40 y 60 min) y el número de extracciones (1, 2 y 3). Los resultados fueron analizados utilizando el software Design Expert 11.

La segunda etapa fue analizar alternativas de solventes para la extracción de SLs. Se evaluó la extracción a partir del SF y del SFT en donde se utilizaron como solventes etanol, agua tipo I ultrapura Mili-Q y acetato de etilo como control, realizando una sola extracción, según lo descrito en el capítulo 3, sección 3.8.1. Finalmente, las muestras fueron analizadas y caracterizadas mediante HPLC (Agilent 1100) siguiendo la metodología del capítulo 3, sección 3.7.4 para elucidar las moléculas y cuantificar la concentración de SLs.

La tercera etapa consistió en la extracción de SLs mediante sistemas de dos fases acuosas (ATPS) alcohol-sal de amonio. Esta misma etapa se desarrolló en 2 fases, las cuales se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3, sección 3.8.2. Primero se evaluó el comportamiento de partición de los SLs en los ATPS, es decir, mediante este experimento preliminar se determinó por cuál de las dos fases, fase superior (FS) conformada

por etanol o fase inferior (FI) conformada por agua y sal de amonio, tienen mayor afinidad estas moléculas. La composición de los sistemas se presenta en la tabla 6.1. Los diferentes sistemas de ATPS con extracto de SLs fueron renombrados, por ejemplo, S1 26:20-E significa Sistema 1, 26:20 representan la composición porcentual (p/p) del sistema (26% de etanol y 20% de sal de amonio) con extracto de SLs.

Una vez caracterizado el sistema, se procedió a realizar una extracción adicionando directamente los SFT dentro del sistema, sin la necesidad de extraer previamente los SLs (Tabla 6.1). Esto, tiene como ventaja la extracción de los SLs dentro del sistema y al mismo tiempo recuperarlos en una de las fases, integrando ambos procesos. Al igual que los sistemas con extractos, los de los SFT fueron renombrados, por ejemplo, S1 26:20-SFT (Sistema 1, 26% de etanol y 20% de sal de amonio).

Posteriormente, cada una de las fases de todos los sistemas evaluados previamente separadas, fue analizada mediante HPLC para determinar la concentración de SLs tal y como se describe en el capítulo 3 sección 3.7.4 con algunas modificaciones: las muestras S1 25:20-E y S2 25:22-E fueron preparadas según la metodología anteriormente mencionada, sin embargo la señal de los picos en los cromatogramas fueron casi imperceptibles, por lo que las muestras S3 22:24-E, S4 20:24-E, S5 18:26-E y las 5 de los SFT fueron diluidas en menor medida (solución de SLs: solución acetonitrilo-agua) para tener una señal más intensa: el factor de dilución fue considerado en todos los cálculos.

Tabla 6.1. Composición de los sistemas de dos fases acuosas (ATPS) usados en la extracción de soforolípidos (SLs).

Sistemas *	EtOH (%p/p)	(NH ₄) ₂ SO ₄ %p/p	Agua (g)	V _R SE	V _R SFT
Sistema 1 (S1)	26	20	1.800	0.98	0.82
S1 Blanco	16	20	1.800	1.10	1.10
Sistema 2 (S2)	25	22	1.214	0.86	0.67
S2 Blanco	15	22	1.214	0.80	0.80
Sistema 3 (S3)	22	24	0.943	0.60	0.51
S3 Blanco	12	24	0.943	0.64	1.13
Sistema 4 (S4)	20	24	1.143	0.47	0.46

S4 Blanco	10	24	1.143	0.43	0.80
Sistema 5 (S5)	18	26	0.771	0.36	0.36
S5 Blanco	8	26	0.771	0.48	1.10

* Estos sistemas fueron usados tanto para los experimentos con extracto de SLs como para los de SF. Se agregó 1 g para los sistemas con extracto (SE) y 0.5 g para los sistemas con el sólido fermentado triturado (SFT). Los sistemas fueron renombrados según su composición.

Finalmente, la cuarta etapa consistió en la extracción de SLs del SF mediante extracción con fluidos supercríticos (FSC) según la metodología descrita en el capítulo 3, sección 3.8.3. La Figura 6.3 muestra el diagrama del proceso para la extracción de SLs con FSC en donde 3 niveles de presión (100, 200 y 300 bares) a 40°C, un flujo de etanol de 10 g/min⁻¹. Se realizó una cinética de extracción con un tiempo total de 50 minutos. La recolección del extracto se realizó en 5 fracciones de 10 minutos cada una. Posteriormente, los extractos crudos obtenidos fueron liofilizados durante 24 h. El tipo y concentración de SLs fueron determinados mediante HPLC (sección 3.7.4 del capítulo de Materiales y Métodos).

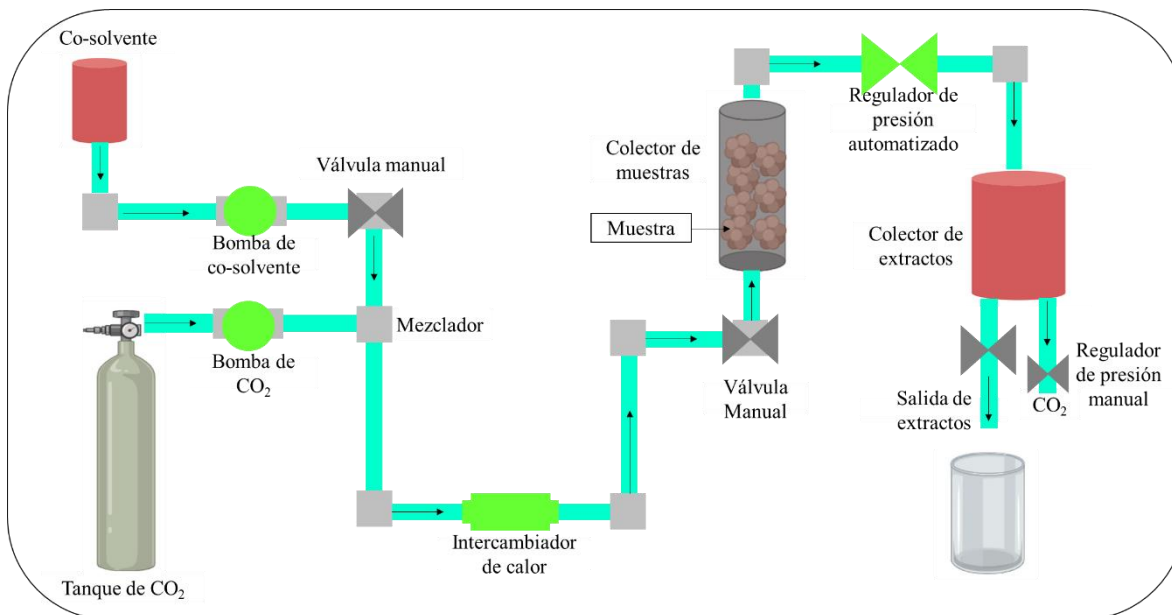


Figura 6.3. Diagrama de flujo del proceso de extracción de soforolípidos un equipo de extracción con fluidos supercríticos.

Los rendimientos de SLs a partir de la etapa 2 fueron calculados a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas que se presentan en cada uno de los experimentos.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Optimización de la extracción de soforolípidos con acetato de etilo

La extracción convencional de SLs a escala laboratorio se hace principalmente con acetato de etilo (Van Bogaert *et al.*, 2011). En los experimentos reportados en esta tesis hasta el capítulo 5, la cuantificación de SLs se ha realizado mediante dos extracciones consecutivas de 60 min con acetato de etilo en relación 1:10 (p/v). La tabla 6.2 resume los 15 experimentos del DoE tanto en materia seca inicial como del sólido fermentado final. La máxima extracción de SLs fue en el experimento 14 (0.22 g SL g⁻¹MS equivalente a 0.23 g SL g⁻¹ MS del SF) y la mínima fue en el experimento 11 (0.13 g SL g⁻¹MS equivalente a 0.14 g SL g⁻¹ MS del SF). El coeficiente de variación entre los puntos centrales fue menor al 3% lo que indica que el DoE presenta una buena reproducibilidad en los experimentos.

Tabla 6.2 Diseño de compuestos centrales para la extracción de SLs

Experimento	Relación sólido:acetato de etilo	Número de extracciones	Tiempo de extracción (min)	Respuesta	
				g SL g ⁻¹ MS inicial	g SL g ⁻¹ MS del SF
1	1:7	1	60	0.15	0.16
2	1:7	3	60	0.21	0.23
3	1:4	2	20	0.17	0.18
4	1:10	2	20	0.19	0.20
5	1:7	1	20	0.14	0.15
6	1:10	2	60	0.20	0.22
7	1:7	2	40	0.19	0.21
8	1:7	2	40	0.18	0.20
9	1:4	2	60	0.18	0.19
10	1:7	3	20	0.20	0.21
11	1:4	1	40	0.13	0.14
12	1:4	3	40	0.19	0.21
13	1:7	2	40	0.19	0.20
14	1:10	3	40	0.22	0.23

15	1:10	1	40	0.18	0.19
----	------	---	----	------	------

Los datos experimentales evaluados se representan en la siguiente ecuación polinomial (6.1), en la cual Y representa el rendimiento de SLs en g g^{-1} MS, A la relación SF:acetato de etilo, B el número de extracciones y C el tiempo de extracción:

$$Y = 0.077423 + 0.004983A + 0.028100B + 0.000350C \quad (\text{Ec. 6.1})$$

El modelo lineal presentó un valor de F de 34.79 ($p < 0.001$) por lo tanto implica que es un modelo significativo. El valor R^2 de 0.9047 sugiere una buena correlación entre los valores experimentales y los predichos, lo que indica que el 90.47% de la variabilidad total en el rendimiento de SLs podría representarse por el modelo propuesto.

El valor de R^2 predicho de 0.8155 está razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado de 0.8787 con una diferencia de menos de 0.2. La falta de ajuste no es significativa ($p = 0.2549$) que indica que la ecuación 6.1 es adecuada para predecir el rendimiento de extracción de SLs bajo cualquier conjunto de combinaciones de las variables estudiadas en el rango estudiado.

En el presente modelo las variables A y B son significativas en el modelo ya que se encuentran por debajo de un valor de p de 0.05, mientras que C (tiempo de extracción) no es significativo. La Figura 6.4 muestra los resultados de producción de SLs en donde los valores óptimos para el mayor rendimiento de extracción ($0.22 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$) son de 3 extracciones en una relación de SF:acetato de etilo 1:10 (p/v).

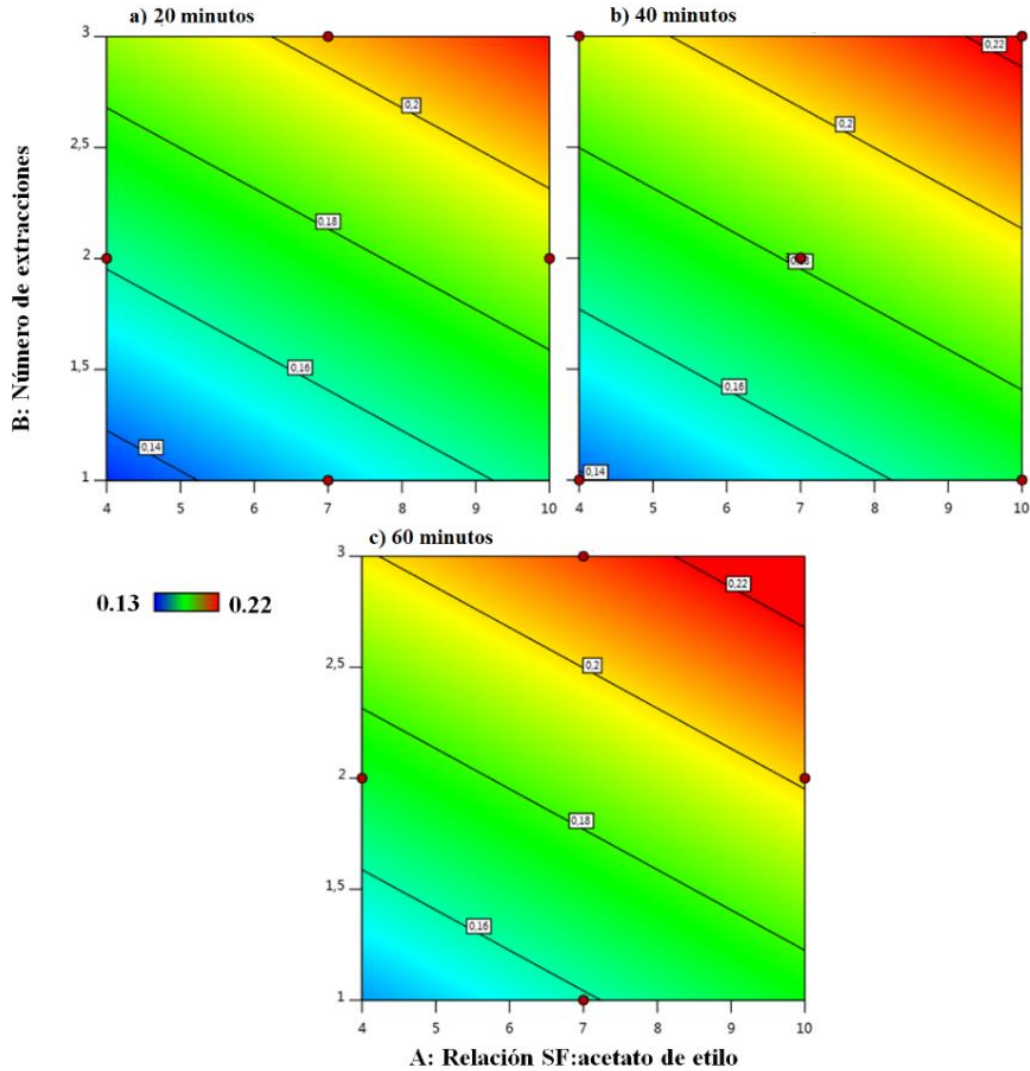


Figura 6.4 Gráficas de contorno del DoE de la extracción de SLs con acetato de etilo a diferentes tiempos de extracción.

Los resultados obtenidos de la optimización de las variables para obtener un mayor rendimiento de SLs indican una extracción adicional, lo que implica el empleo de una mayor cantidad de solventes, de insumos y un gasto energético adicional. Sin embargo, la producción máxima obtenida ($0.22 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$) no es un valor muy alejado a los rendimientos obtenidos en las diferentes escalas de producción de los capítulos anteriores ($0.5 \text{ L: } 0.20 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$ y $22 \text{ L: } 0.18 \text{ g SL g}^{-1}\text{MS}$). Asimismo, un estudio realizado anteriormente por Jiménez-Peñalver (2017) demuestra que en la tercera extracción se recupera solo el 5% del producto, por lo que sería necesario comprobar si agregar una

extracción adicional es conveniente y rentable ya que probablemente los costes e impactos del proceso se incrementaría considerablemente.

La recuperación de compuestos en la fermentación es una de las etapas más importantes del proceso ya que se busca que sea económico y de bajo o nulo impacto ambiental. Hoy en día, hasta nuestro conocimiento, no existen reportes publicados respecto al impacto que tiene el proceso de producción de SLs en FES. De acuerdo con Krieger *et al.* (2010) la recuperación de compuestos utilizando solventes orgánicos, probablemente tendrá una gran importancia tanto en costos, como un gran impacto en el medio ambiente. Un estudio económico preliminar realizado en colaboración con la fundación Fraunhofer Chile Research (todavía no publicado) demostró que el mayor contribuyente de los costes del proceso de producción de SLs es la etapa de extracción y recuperación con acetato de etilo, ya que representa un 73% de los gastos de capital y un 57% de los costos operativos, a pesar de que el solvente se recupera y puede ser reutilizado. Por tales motivos, es necesario buscar alternativas para la recuperación de SLs producidos mediante FES que sean rentables y ambientalmente sostenibles.

6.3.2 Evaluación de diferentes solventes para la extracción de soforolípidos

Con el objetivo de sustituir el acetato de etilo se realizó la evaluación de diferentes solventes para la extracción de SLs. Concretamente se evaluaron: acetato de etilo (como referencia), etanol el cual, es más barato que el acetato de etilo y agua, cada uno de ellos a tres temperaturas diferentes (25, 35 y 45°C) y utilizando SF y SFT. La apariencia de los extractos crudos resultantes de la extracción y evaporación del extracto de SLs se presentan en la Figura 6.5. Se puede observar que la apariencia de los SLs extraídos con etanol es similar a aquella de los SLs extraídos con acetato de etilo, ambos con un aspecto y consistencia similar a una miel de color ámbar, la cual ha sido reportada anteriormente (Parek y Pandit *et al.*, 2012; Jiménez- Peñalver *et al* 2016). En cambio, el aspecto y color de los extractos en los que se utilizó agua presentan un aspecto y consistencia similar a la melaza (MEL) utilizada como sustrato hidrofílico (Figura 3.2a Sección 3 Materiales y métodos) pudiendo ser la melaza residual del sólido fermentado.

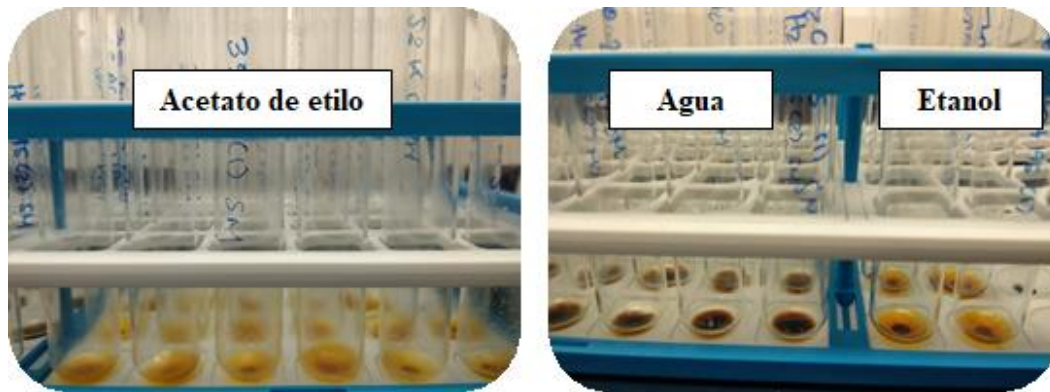


Figura 6.5 Apariencia de los extractos crudos obtenidos de la extracción con acetato de etilo, agua y etanol.

Los extractos crudos obtenidos de cada una de las extracciones con los diferentes solventes y temperaturas fueron analizados mediante HPLC-ELS-DAD para comprobar la extracción de SLs. Los cromatogramas obtenidos con el acetato de etilo, etanol y agua a cada una de las temperaturas se presentan en las Figuras 6.6, 6.7 y 6.8, respectivamente.

Los cromatogramas demuestran la presencia de una mezcla de SLs tanto ácidos (A) como lactónicos (L) en los extractos crudos obtenidos con acetato de etilo y etanol, pero no así en las extracciones con agua. Estos resultados indican que utilizar agua como solvente no es una opción viable para la recuperación de SLs ya que es un solvente polar. Aún y cuando los SLs tienen grupos funcionales polares, su solubilidad en agua es muy baja debido a que tienen grandes regiones hidrofóbicas en su estructura química. La Figura 6.8 corresponde a la MEL residual presente en el SF, la cual, es totalmente soluble en agua; esto podría estar relacionado con lo reportado por Ashby *et al.*, 2013, en donde menciona que es necesario remover el agua residual en el proceso de extracción de SLs ya que esta podría tener un efecto en el producto y en su cristalización; asimismo, estos resultados demuestran que no es posible extraer SLs con agua ya que el único pico que se presenta en el cromatograma corresponde a las impurezas extraídas.

Los compuestos fueron identificados conforme a los resultados obtenidos por Peñalver-Jiménez (2017) en donde presenta el cromatograma con los picos correspondientes de los SLs producidos por FES utilizando como soporte paja de trigo y como sustratos WOC y MEL.

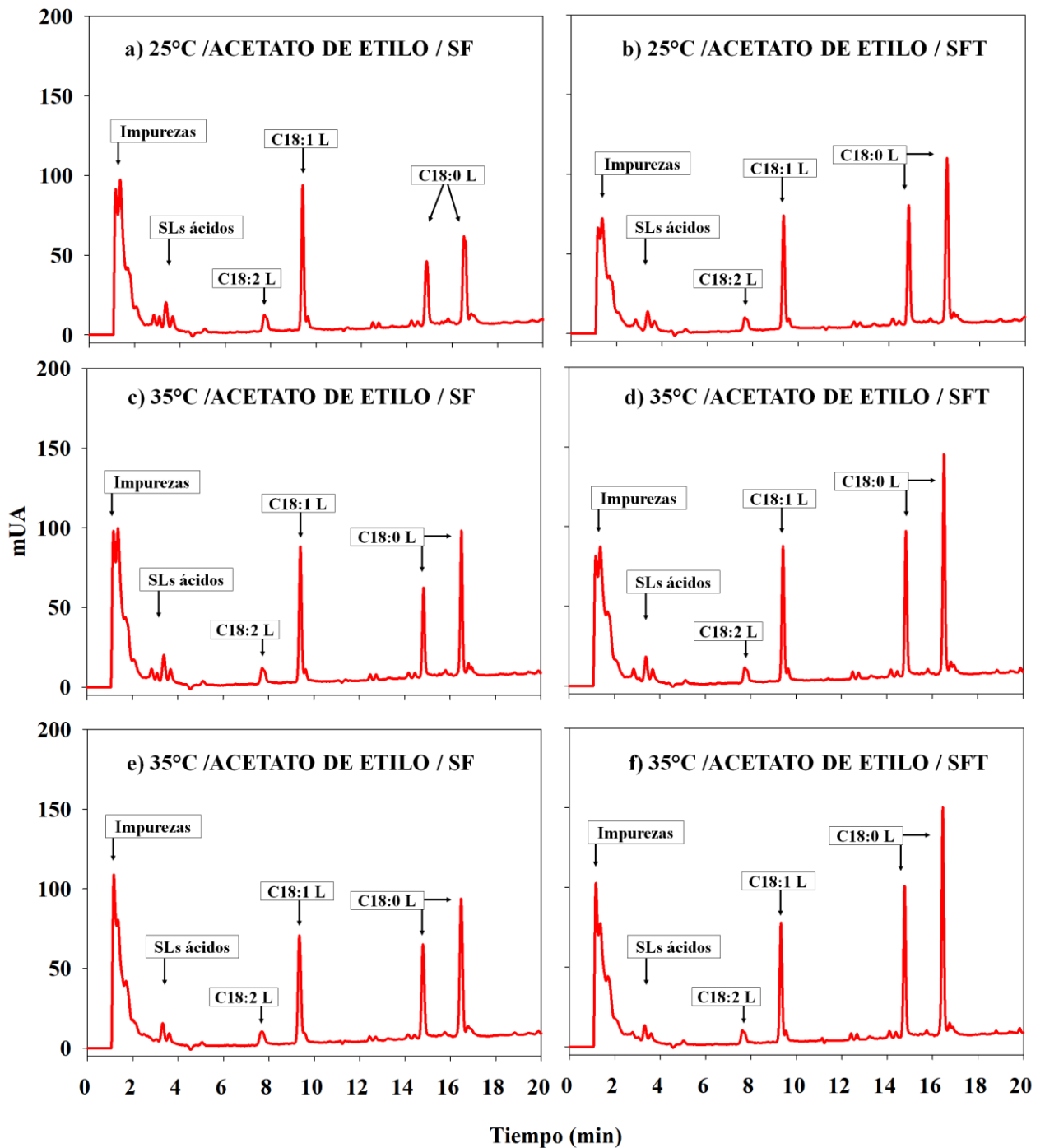


Figura 6.6. Cromatogramas del perfil de SLs en extractos de acetato de etilo a 25, 35 y 45°C con el sólido fermentado sin triturar (SF) y el sólido fermentado triturado (SFT).

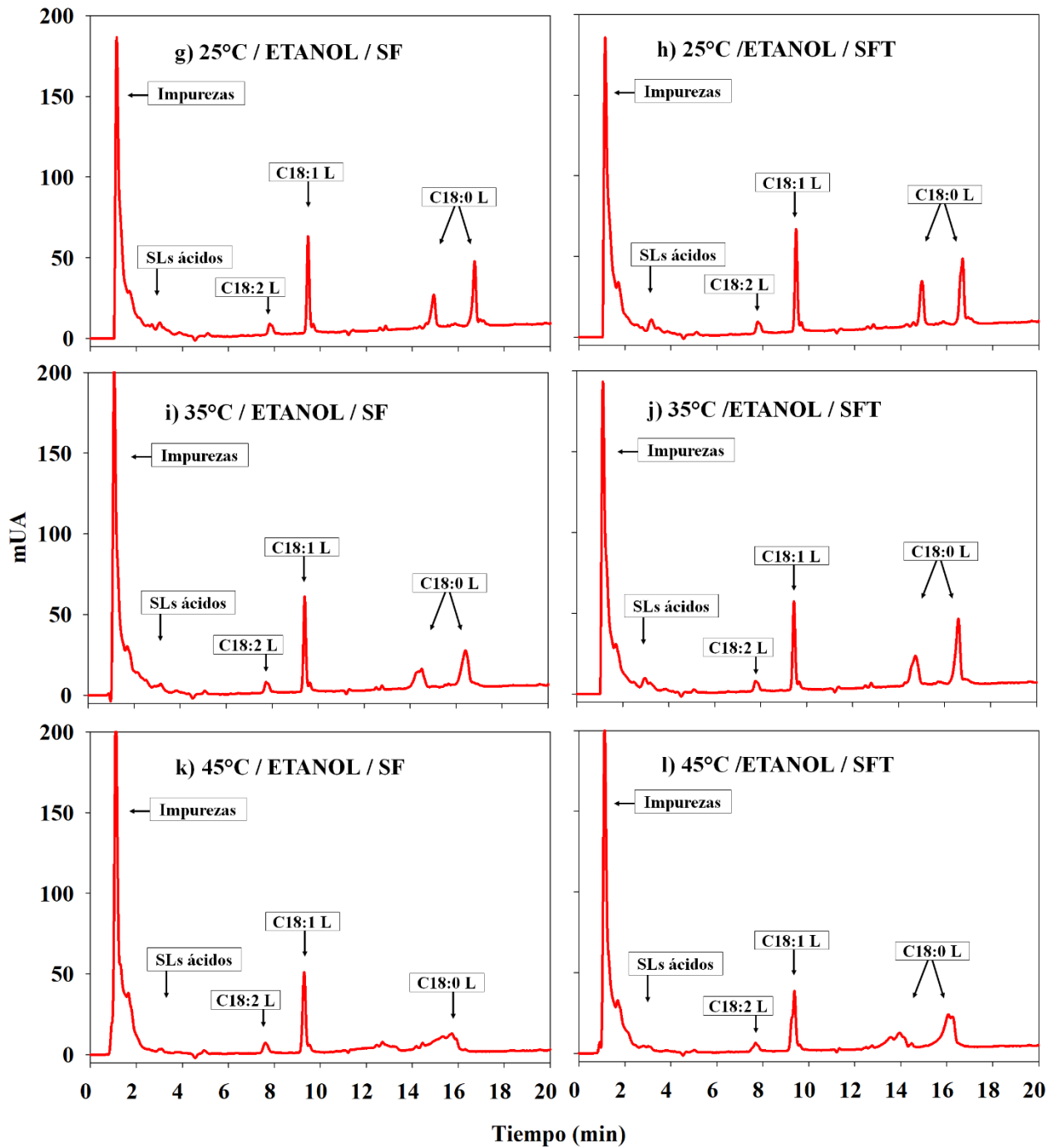


Figura 6.7. Cromatogramas de extracción de SLs con etanol a 25, 35 y 45°C con el sólido fermentado sin triturar (SF) y el sólido fermentado triturado (SFT).

Nota: Las mUA de los cromatogramas i, k, l presentan valores 300 unidades, sin embargo, por efecto de escala se representaron hasta las 200 unidades.

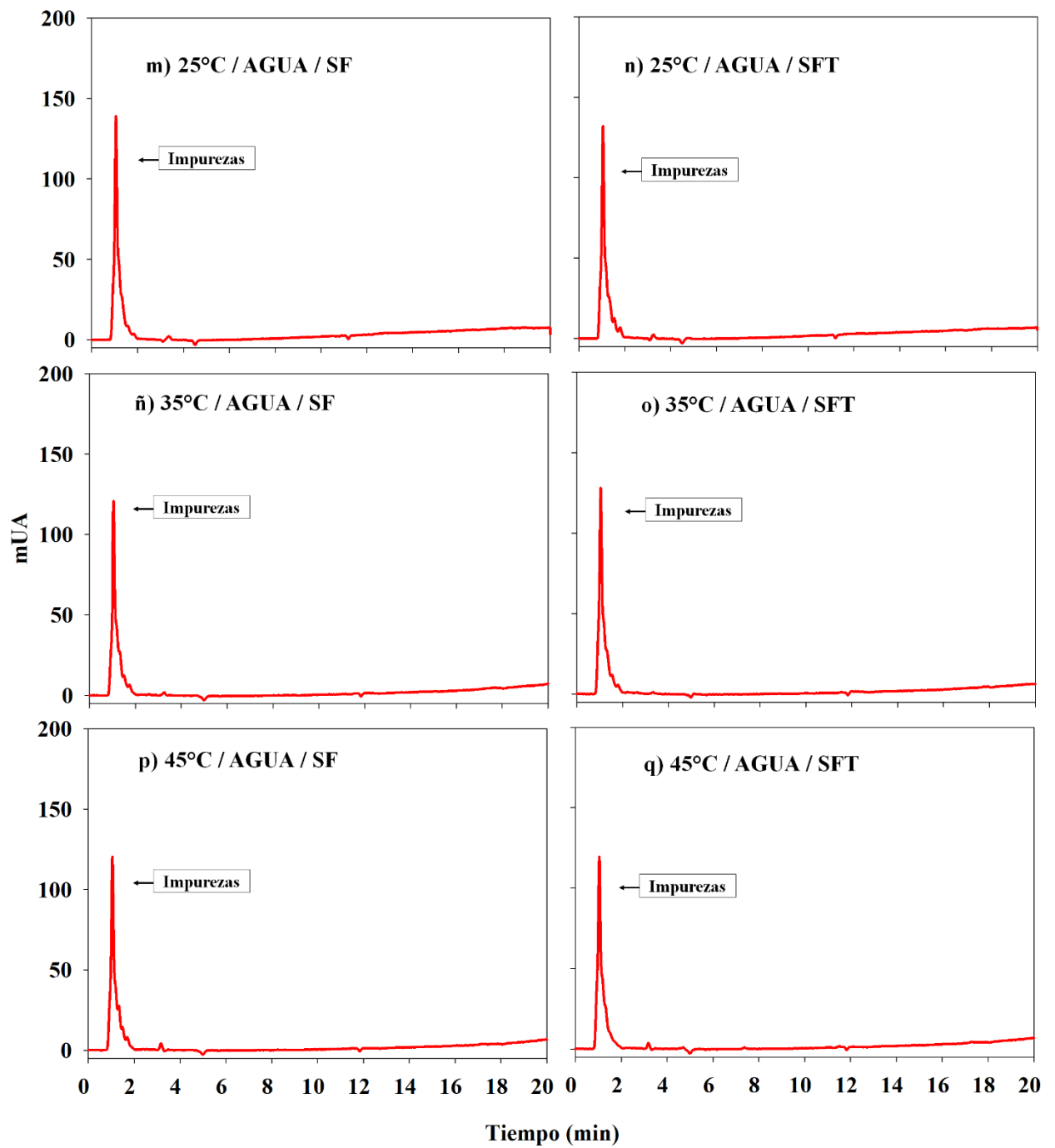


Figura 6.8. Cromatogramas extracción de SLs con agua a 25, 35 y 45°C con el sólido fermentado sin triturar (SF) y el sólido fermentado triturado (SFT)

Los cromatogramas muestran que el SL abundante es el C18:1 L, esto se debe a que el sustrato que se utilizó en la FES (WOC) se encuentra compuesto en su mayoría por ácido oleico (81%) y en menor proporción de ácido linoleico (C18:2; 8%) y ácido esteárico (C18:2, (3%). Esto a su vez explica la presencia de cada uno de los compuestos formados (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2017). En la extracción con acetato de etilo, la intensidad de los picos del SL C18:1 L se encuentran entre las 80 y 100 mUA, mientras que en las extracciones con etanol entre 55 y 67 mUA lo cual podría ser un indicador de la concentración de los compuestos.

Los picos correspondientes a impurezas son más intensos en los extractos obtenidos con el etanol que con el acetato de etilo. Esto podría ser debido a que las impurezas tengan mayor afinidad por el etanol que por el acetato. El mismo comportamiento fue observado en los extractos de acetato de etilo, donde los SLs C18:0 se encontraron en mayor cantidad de acuerdo con la alta intensidad de las señales. Los SLs en forma ácida se encontraron en baja proporción (acetato de etilo) o incluso apenas se lograron observar los picos (etanol). Esto podría deberse a que la solubilidad de estos compuestos en etanol es más baja que la de los compuestos lactónicos (Hu y Ju, 2001). Es importante mencionar que los extractos obtenidos a partir de muestras con menor tamaño de partícula exhibieron señales más altas indicando una mayor concentración de los compuestos. Esto es debido a que un tamaño pequeño de partícula tendrá una mayor superficie de contacto logrando que el solvente esté en mayor contacto con el material, resultando en una mejor extracción.

Los diferentes tipos de SLs, como se mencionó anteriormente se identificaron de acuerdo con los resultados obtenidos por Jiménez-Peñalver *et al.*, con los tiempos de retención que se muestran en la Tabla 6.3 (SLs ácidos y SLs lactónicos: C18:2 L, C18:1 L y C18:0 L). Como se mencionó anteriormente los SLs se elucidan según su hidrofobicidad durante el proceso de separación en el HPLC; los compuestos ácidos al igual que las impurezas elucidan en los primeros 5 minutos y después de ese tiempo los compuestos lactónicos (Hu y Ju., 2001; Jiménez Peñalver *et al.*, 2019).

Tabla 6.3. Tipos y tiempos de retención de los tipos de SLs identificados mediante HPLC en las extracciones con acetato de etilo y etanol.

Tiempo de retención (min)	Tipo de SLs	Peso molecular (g mol ⁻¹)
1.1 - 5	Impurezas y formas ácidas no definidas	-
6.8	C18:2 L	662
9.7	C18:1 L	688
16 - 18	C18:0 L	690

La fermentación para producir el SF para los experimentos de la estancia tuvo un rendimiento de 0.196 g SL g⁻¹MS inicial, determinado con la metodología utilizada a lo largo de toda la tesis basada en 2 extracciones con acetato y limpieza con hexano. Este rendimiento equivale a un contenido de 0.200 g SL g⁻¹MS del sólido fermentado que se puede extrapolar a un contenido total de 0.211 g SL g⁻¹MS si asumimos que en una tercera extracción con acetato se puede extraer un 5% más de SLs, de acuerdo a Jiménez-Peñalver (2017). En este capítulo, se reportarán los contenidos de SL como g SL g⁻¹MS de sólido fermentado y no inicial. Los rendimientos que se obtuvieron después del proceso de extracción con cada solvente a diferentes temperaturas se presentan en la Figura 6.9. Se puede observar que la extracción con acetato de etilo durante 1 h con el SF sin triturar presentó los rendimientos más bajos (25 °C: 0.12 g SL g⁻¹MS y a 35°C: 0.15 g SL g⁻¹MS), mientras que valores más altos, los cuales no presentan diferencias significativas, se obtuvieron con el SF triturado a 25, 35 y 45 °C (0.18, 0.21 y 0.20 g SL g⁻¹MS respectivamente). Esto coincide con los resultados del DoE anteriormente descrito, en donde al hacer una sola extracción con acetato de etilo y el SF con un tamaño más grande (sin triturar) los rendimientos son más bajos que al hacer dos o tres extracciones. En este sentido, el tamaño de partícula tiene un papel relevante en el rendimiento de extracción ya que, de acuerdo con los resultados obtenidos, tamaños menores y homogéneos acortan notablemente el tiempo de extracción y logran un mayor rendimiento (Qu *et al.*, 2010) o en nuestro caso permite obtener un rendimiento muy similar que cuando se realizan 2 o 3 extracciones.

Los mejores rendimientos para la extracción con etanol resultaron tanto con los sólidos fermentados triturados y sin triturar (SFT y el SF) a 25°C y el SF a 45°C (0.18, 0.16 y 0.17 g SL g⁻¹MS respectivamente). Estos resultados no presentaron diferencias significativas, mientras que a 35 °C los rendimientos fueron menores tanto con el SF (0.14 g SL g⁻¹MS) como con el SFT (0.15 g SL g⁻¹MS). A diferencia de la extracción con acetato de etilo, el tamaño de partícula no tiene un efecto negativo cuando la extracción se realiza con etanol, esto podría deberse a la alta solubilidad de los SLs en dicho solvente (Hu y Ju 2001; Van Bogaert *et al.*, 2011). Las extracciones realizadas con agua ultrapura Milli-Q permitieron comprobar que utilizando este solvente no se extraen SLs si no la MEL residual presente en el SF, ya que los SLs presentan una baja solubilidad en agua. Además, los SLs son más pesados que el agua, lo que afecta su extracción de la matriz sólida con este solvente (Van Bogaert *et al.*, 2011).

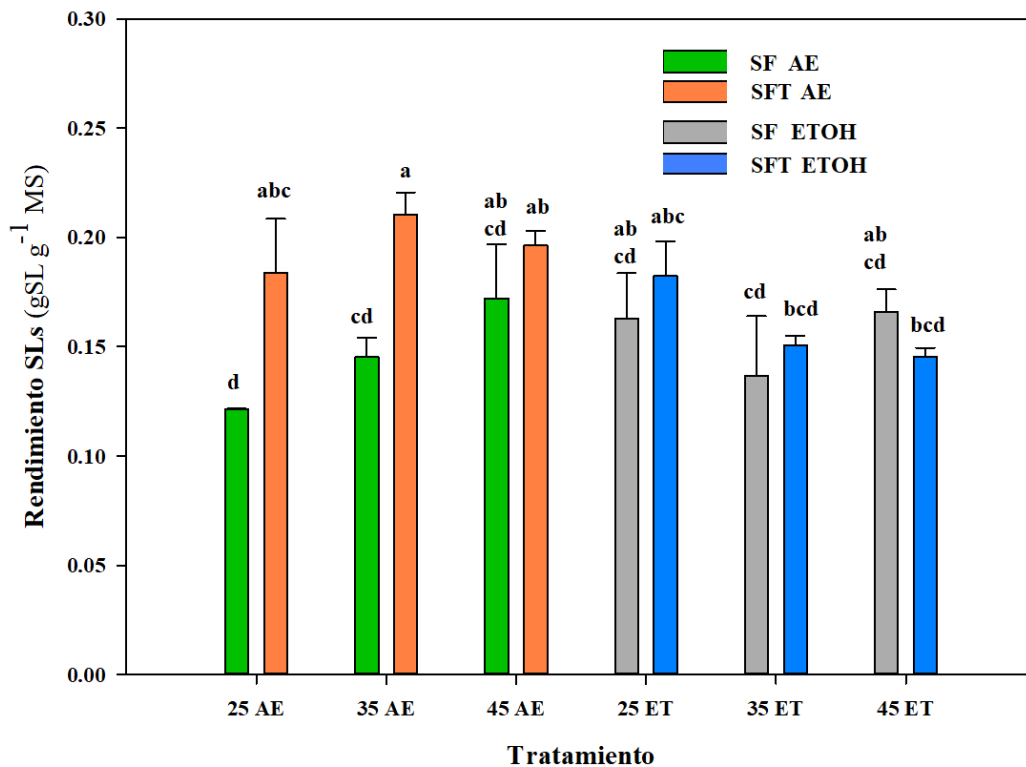


Figura 6.9 Rendimiento de SLs con diferentes solventes (AE: acetato de etilo, ETOH: etanol) a diferentes temperaturas (25°C, 35°C y 45°C). Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas a un valor de $p < 0.05$.

Estos resultados indican que el etanol representa una alternativa al acetato de etilo para la recuperación de SLs, ya que se obtiene un rendimiento similar al obtenido con dos extracciones de 1 h cada una (proceso convencional utilizado en los capítulos anteriores). Además de los buenos rendimientos, el uso de etanol como agente de extracción de SLs representa una gran ventaja, pues ya que aparte de ser más económico resulta ser más amigable con el medio ambiente que el acetato de etilo.

6.3.3 Extracción de soforolípidos con sistemas de dos fases acuosas (ATPS)

Los resultados obtenidos a partir de la extracción con etanol ayudaron a definir la composición de los sistemas ATPS etanol:sal. La primera etapa de estos experimentos fue la caracterización de los sistemas, utilizando el extracto de SLs obtenido por extracción del SFT con acetato de etilo. Ésta se realizó con el objetivo de determinar la cantidad de extracto que se recuperaría al hacer la separación de las fases y además de establecer en cuál de las dos fases que se forman migran los SLs, es decir, su partición hacia una u otra fase debido a la afinidad química.

Los resultados de los sistemas ATPS etanol:sulfato de amonio usados para la extracción y recuperación de SLs se presentan en la Figura 6.10 donde se pueden observar las dos fases formadas en cada uno de los sistemas. Se observa que la fase superior presenta un color amarillo pálido, el cual, es un color menos intenso que el característico del solvente cuando se extraen los SLs (Figura 3.10 capítulo 3, sección 3.7.1). Sin embargo, esto podría ser un indicador (visual) para deducir que los SLs migraron hacia la fase superior. De manera contraria, no se observó ninguna coloración en la fase inferior, lo que podría indicar la ausencia de SLs en esta fase.

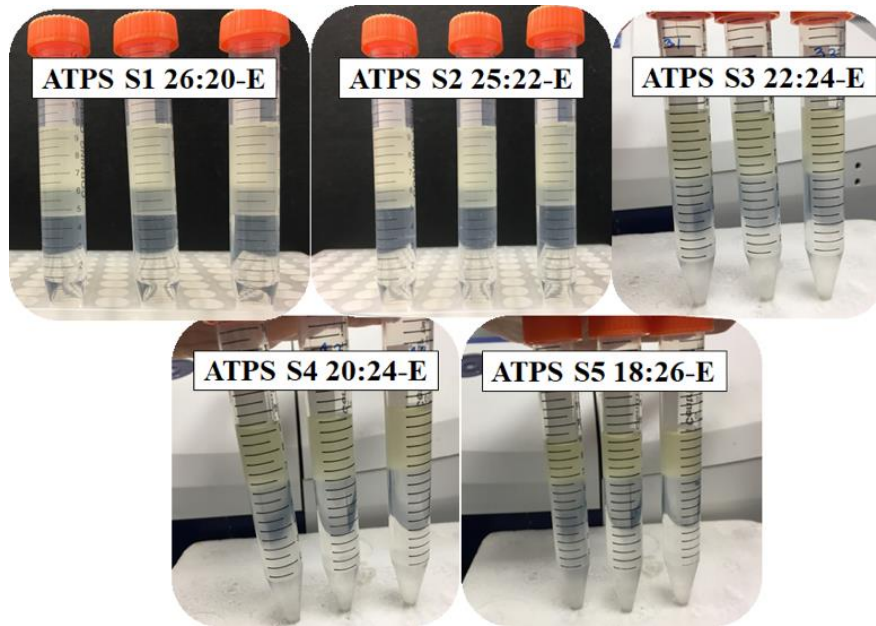


Figura 6.10. Sistemas de dos fases acuosas etanol:sulfato de amonio de 10 g después de la adición del extracto de SLs y de la separación de las fases.

Seguido a la separación de fases, éstas fueron analizadas por HPLC. En la Figura 6.11 (izquierda) se pueden observar los picos correspondientes a los SLs después de 25 min de elución, lo que confirma la preferencia de dichos compuesta en la fase superior, la cual está formada por etanol. De igual manera que en los experimentos de las extracciones con diferentes solventes (acetato de etilo y etanol), se puede observar en los primeros 5 min de los cromatogramas de todos los sistemas una mezcla de impurezas y SLs ácidos. Mientras que a los minutos 6.8, y 9.3 se observan dos picos correspondientes a los soforolípidos C18:2 L y C18:1 L, respectivamente. Cabe mencionar que en las extracciones con ATPS, los picos correspondientes a los SLs C18:0 L no se aprecian, pero sí se observan en las Figuras 6.6 y 6.7 correspondientes a las extracciones con acetato de etilo y etanol; lo cual podría deberse a que el ácido esteárico (C18:0) es un ácido graso con una región altamente hidrofóbica cuya solubilidad se ve favorecida en solvente como acetato de etilo y etanol. Es posible que aún y cuando los ATPS contengan etanol, la parte acuosa del sistema no permita que este ácido se solubilice en la fase etanólica.

Los resultados de la fase inferior conformada por sales de sulfato de amonio se presentan en los cromatogramas del lado derecho de la Figura 6.11 en donde se observa solamente la

presencia de impurezas. La hidrofobicidad o polaridad y el peso molecular de los compuestos tienen una gran influencia sobre la partición o separación de las moléculas hacia una u otra fase (Mejía-Manzano *et al.*, 2019). Los sistemas de etanol-sal son los más utilizados y con mejores resultados para recuperar compuestos de bajo peso molecular y normalmente son recuperados en la fase superior (Sánchez-Rangel *et al.* 2017), por ejemplo, lipopéptidos, otra clase de biosurfactante (Yuan *et al.*, 2011). En este caso, los SLs, moléculas de bajo peso molecular (662 a 706 g mol⁻¹) presentan regiones polares tales como -OH y COOH que pueden formar puentes de hidrógeno o interacciones ion-dipolo, cuando están en forma ionizada, con el etanol permitiéndole solubilidad en este solvente (Hu y Ju, 2001; Sharma y Oberoi, 2017; Jiménez-Peñalver *et al.*, 2019) lo que es favorable para su recuperación en los sistemas de ATPS usados para la extracción.

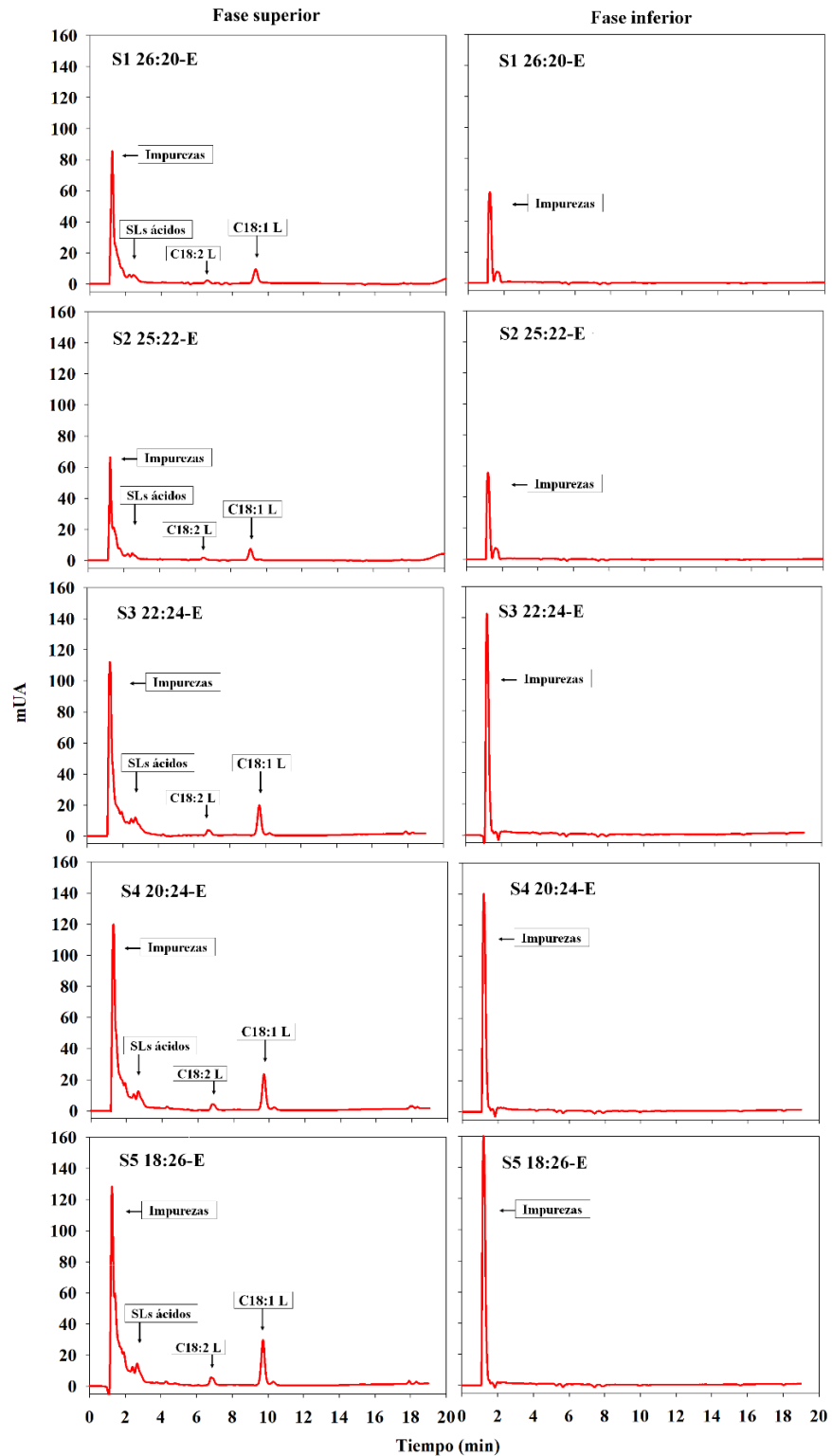


Figura 6.11. Cromatogramas de los ATPS etanol-sal con extracto de SLs. Las muestras S1 y S2 presentan una mayor dilución (20x) que las muestras S3, S4 y S5 (10x).

Es importante mencionar que el extracto que se utilizó tenía un rendimiento de 0.18 g SL g⁻¹MS con acetato de etilo. A cada uno de los cinco sistemas se le agregó 1 g de extracto de SLs (10% de masa total del sistema). La Figura 6.12 muestra el porcentaje de recuperación alcanzado con los diferentes sistemas cuando se usó el extracto de SLs. Se lograron obtener porcentajes de recuperación entre 73 y 95% de los SLs adicionados a cada sistema, en donde los sistemas S4 20:24-E y S5 18:26-E fueron los que presentaron una mayor recuperación sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos; mientras que en los sistemas 1, 2 y 3, el porcentaje de recuperación (73, 81 y 80%) fue menor en comparación con aquel de los sistemas 4 y 5. Los resultados indican que la extracción de SLs fue favorecida a la fase rica en etanol.

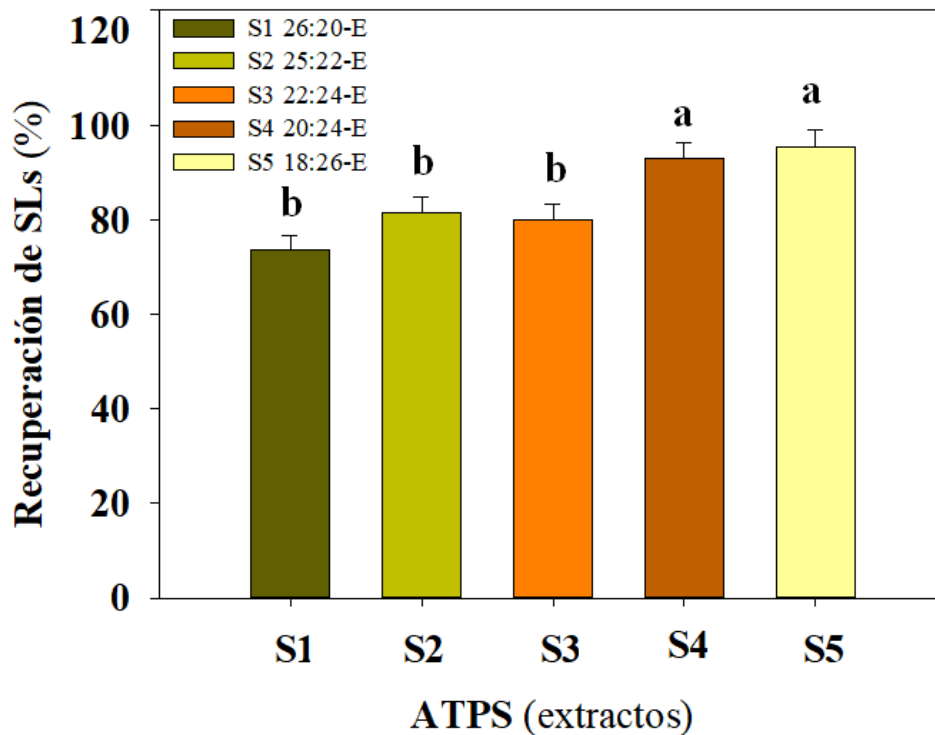


Figura 6.12. Porcentaje de recuperación de SLs a partir de un extracto de etanol en los diferentes sistemas de ATPS evaluados. Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas a un valor de $p < 0.05$.

Estos resultados son similares a los reportados en la literatura sobre la recuperación y purificación parcial de otros compuestos con diferentes pesos moleculares utilizando este tipo de sistemas. A pesar de que la naturaleza de los compuestos es diferente, los rendimientos de recuperación son altos. Por ejemplo, para compuestos fenólicos tales como el resveratrol ($232.26 \text{ g mol}^{-1}$), piceid ($390.38 \text{ g mol}^{-1}$) y emodina ($270.23 \text{ g mol}^{-1}$) se reportan rendimientos de recuperación del 82, 84 y el 53%, respectivamente (Wang *et al.*, 2008). Este tipo de sistemas etanol-sal también han permitido recuperar compuestos orgánicos tales como el 2,3-butanodiol ($90.121 \text{ g mol}^{-1}$) con un 98.1% de recuperación (Jiang *et al.*, 2009) y el ácido salvianólico B ($718.61 \text{ g mol}^{-1}$) con una recuperación del 95% (Zhi and Deng, 2006). Es importante mencionar que todos estos compuestos fueron recuperados en la fase superior de los ATPS, la compuesta por etanol. A pesar de su eficiencia, la desventaja de este sistema es que algunas moléculas se pueden desnaturalizar en presencia del alcohol, sin embargo, la mayoría de las moléculas de bajo peso molecular son estables en esas condiciones (Benavides *et al.* 2011; Sánchez-Rangel *et al.*, 2017).

Una vez que se caracterizaron los sistemas y se comprobó que los SLs se pueden recuperar en la fase superior de los sistemas con altos rendimientos se procedió a la segunda fase de los experimentos, la cual consistió en la extracción *in situ* de SLs a partir del SF. En otras palabras, se agregaron los SFT a los sistemas ATPS. Este procedimiento involucra la extracción y recuperación de SLs al mismo tiempo con la finalidad de aumentar el rendimiento logrando la integración de procesos. La Figura 6.13 muestra los sistemas de extracción después de agregar los SFT directamente a cada uno de los sistemas, mezclar por 60 minutos y centrifugar para separar las fases. Se puede visualizar la fase superior (etanol) de un color ámbar, la interfase conformada por el SFT y la fase inferior (sal) de un color más claro a la fase superior.

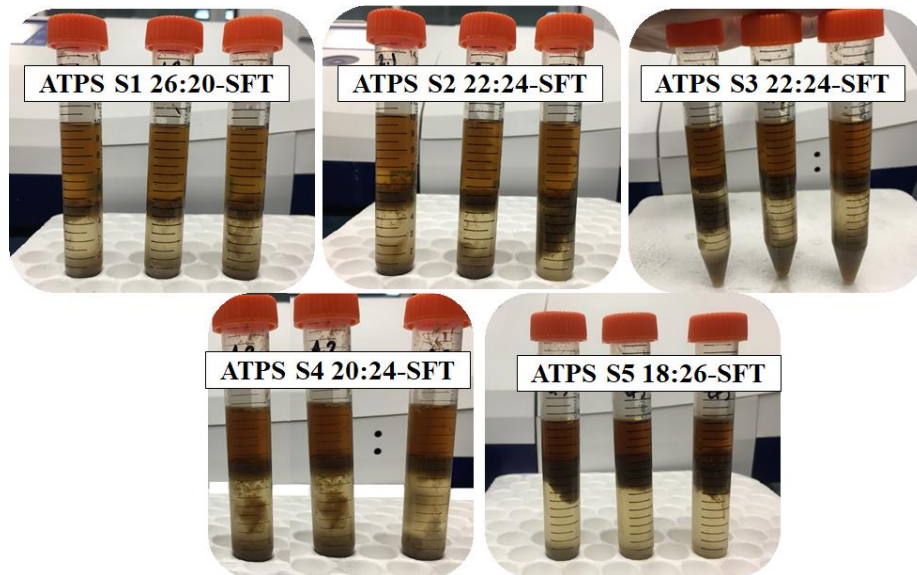


Figura 6.13. Extracción de *in situ* de SLs a partir de SFs con sistemas de dos fases acuosas etanol:sal.

La Figura 6.14 muestra los cromatogramas obtenidos del análisis HPLC tanto de la fase superior como de la fase inferior de los ATPS con SFT. Al igual que en los experimentos de la Fase 1 de ATPS, se identificaron una mezcla de impurezas y SLs ácidos durante los primeros 5 minutos del cromatograma en la fase superior (Figura 6.14). De igual modo, los soforolípidos C18:2 L y C18:1 L, fueron observados a los minutos 6.8 y 9.7 respectivamente. De manera opuesta a la de los experimentos de la recuperación de SLs a partir del extracto de etanol, el análisis de HPLC de la fase superior de los sistemas usados en la extracción directa de SLs a partir de SFT no mostró la presencia de los picos correspondientes al soforolípidos C18:0 L. Los resultados muestran que los sistemas ATPS S4 20:24-SFT (20% etanol: 24% sales) y S5 18:26-SFT (18% etanol: 26% sales) son los que presentan una mayor señal tanto para los picos de SLs como impurezas, indicando una mayor recuperación en estos sistemas. Del mismo modo que en los experimentos anteriores con el extracto de etanol y SLs, en la fase inferior solo se identificaron los picos de impurezas, lo cual podría deberse a la polaridad de estas moléculas que las hace tener afinidad hacia la parte inferior e interaccionar con las moléculas de agua y los iones sulfato y amonio de las sales de amonio, mientras que los compuestos más hidrofóbicos permanecerán en la fase superior (Gómez-

Loredo, 2014). En los S4 20:24-SFT y S5 18:26-SFT el pico de impurezas presentó menor intensidad que en el S1 26:20-SFT, S2 25:22-SFT y S3 22:24-SFT.

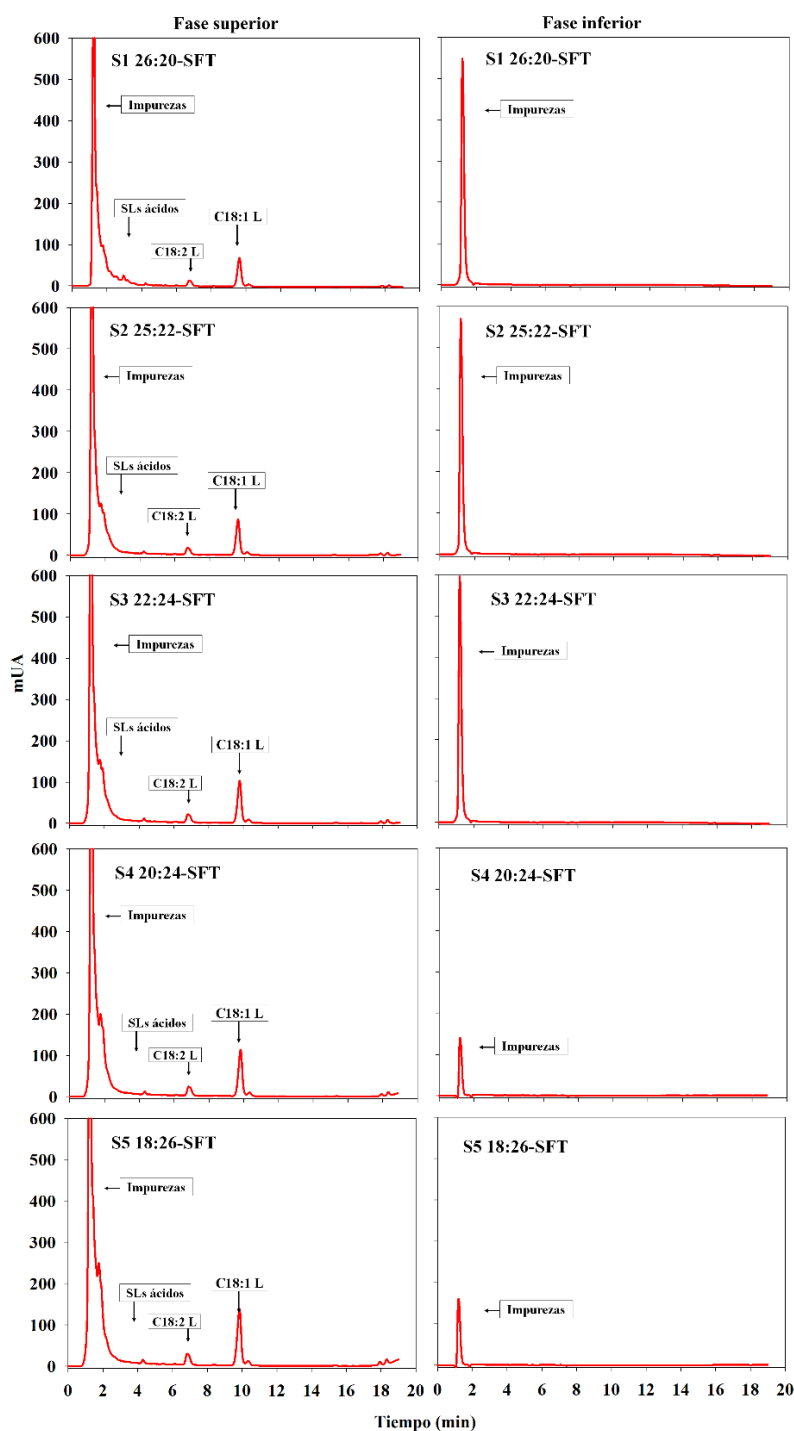


Figura 6.14. Cromatogramas de los ATPS etanol-sal de la extracción directa de SLs a partir de SFT.

El rendimiento de extracción en cada uno de los sistemas analizados se muestra en la Figura 6.15. Los mayores rendimientos se obtuvieron con los sistemas S3 22:24-SFT y S5 18:26-SFT (0.34 y 0.35 g SL g⁻¹MS, respectivamente), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos, seguido por los ATPS S1 26:20-SFT y S2 25:22-SFT (0.31 g SL g⁻¹MS respectivamente), y finalmente el rendimiento más bajo fue con el S4 20:24 SFT con 0.29 g SL g⁻¹MS respectivamente. Es importante remarcar que estos rendimientos son mayores en comparación con los obtenidos con las extracciones convencionales en los experimentos anteriores (0.20 g SL g⁻¹MS con acetato de etilo y 0.18 g SL g⁻¹MS con etanol). Estos resultados prueban que los sistemas de dos fases acuosas pueden ser utilizados como alternativa para extraer SLs, ya que con esta tecnología se logró aumentar el rendimiento hasta 1.7 veces.

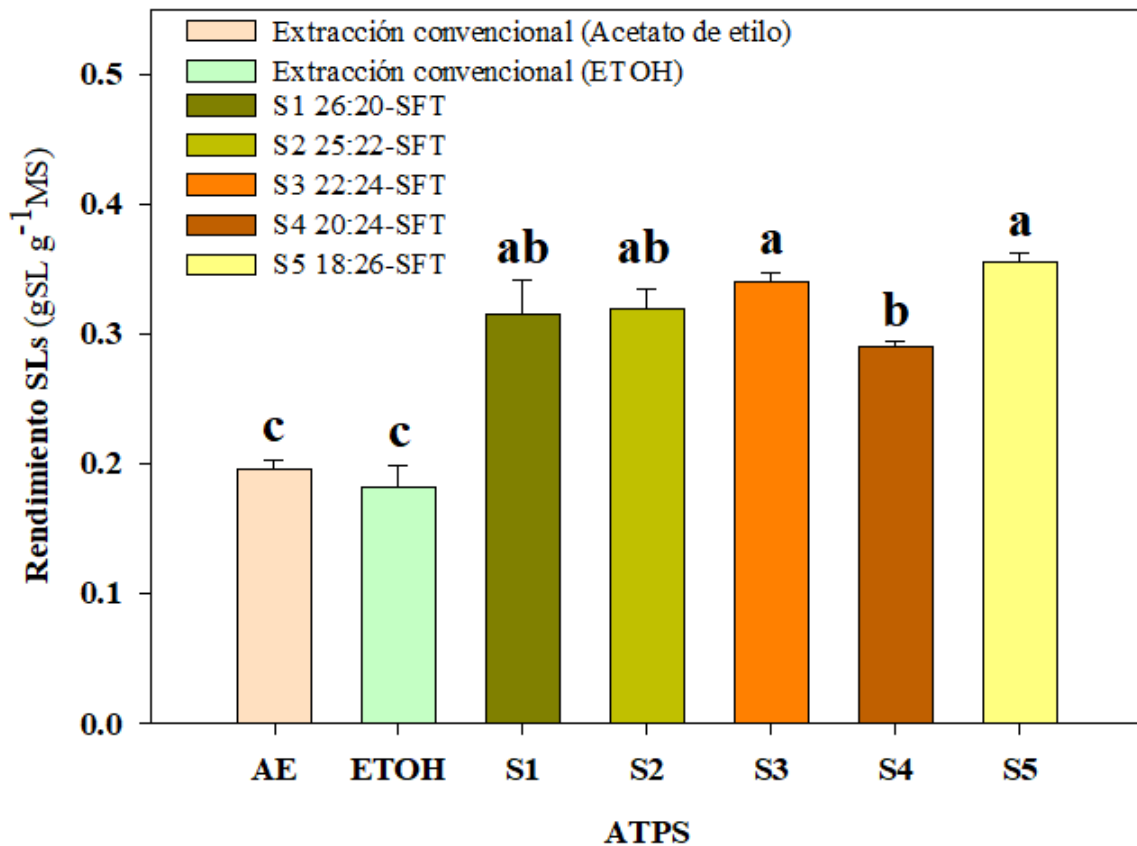


Figura 6.15. Rendimiento de SLs extraídos con ATPS etanol-sales. Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas a un valor de $p < 0.05$.

Hasta el día de hoy para el caso de SLs no existen estudios en los que hayan evaluado el uso de sistemas de dos fases acuosas como método para su extracción y recuperación. Yuan *et al.* (2011) evaluaron sistemas ATPS de etanol-sulfato de amonio para la extracción de iturina A, un lipopéptido producido por una especie de *Bacillus*. En la investigación evaluaron diferentes parámetros para determinar la eficiencia de la extracción (temperatura, tiempo de centrifugación y pH) y comprobaron que con este método se favorece la extracción y cuantificación rápida del biosurfactante, extrayendo el compuesto en la fase rica en etanol. En nuestros resultados, los SLs también fueron identificados en la fase superior de los sistemas (etanol). El etanol presenta una región polar (-OH) y una región no polar (cadena de dos carbonos). Por su parte, los SLs, presentan tanto grupos hidroxilos en la soforosa como grupos carboxilos en la cadena terminal (SLs forma ácida) que pueden ionizarse formando puentes de hidrógeno con el etanol. Las regiones polares del etanol pueden formar interacciones dipolo-dipolo con los grupos carboxilos (COOH) de los SLs, mientras que las regiones hidrofóbicas del etanol interaccionan a través de fuerzas de van der Waals con las regiones hidrofóbicas de los SLs. Así mismo, los SLs presenta grupos lactónicos (SLs forma lactónica) los cuales no son ionizables, pero pueden formar interacciones dipolo-dipolo, puesto que el oxígeno es electronegativo, lo cual permite la solubilización en el etanol.

Estos resultados presentan una gran ventaja en comparación con las extracciones convencionales en las que se utilizan solventes ya que el proceso de ATPS puede ampliarse a nivel industrial sin la necesidad de utilizar equipos costosos o sofisticados (Sánchez-Rangel *et al.* 2017). Así mismo, para la extracción de SLs el utilizar etanol implicará una reducción en costes e impacto ambiental en comparación con el acetato de etilo ya que el coste del acetato de etilo es de \$US 800/ton (The TNN Development Limited, 2020) en comparación con el del etanol de \$US 265/ton (Irwin, 2019). Además de que presenta altos rendimientos de extracción, de purificación, y existe una amplia gama de sistemas que pueden ser explorados para recuperar compuestos de bajo peso molecular (Sánchez-Rangel *et al.*, 2017). Así mismo, en comparación con los métodos tradicionales, la extracción con ATPS en un solo paso es más simple, rápida y con mayor eficiencia. Es importante señalar que es la primera aproximación relacionada al estudio de la extracción de SLs mediante sistemas de dos fases acuosas, por lo que es necesario realizar más estudios y manipular diferentes

variables (polímeros, sales, temperatura, proporciones, volúmenes, pH, entre otros) para aumentar y optimizar rendimientos de extracción de SLs.

6.3.4 Extracción de soforolípidos con fluidos supercríticos

En el proceso de extracción de soforolípidos mediante el uso de fluidos supercríticos (FSC), se evaluó el efecto de la presión (100, 200 y 300 bar) a diferentes tiempos (10, 20, 30, 40 y 50 min) en el rendimiento total utilizando CO₂ como fluido extractante. La apariencia de los extractos resultantes (líquido y crudo) en todos los experimentos se muestra en la figura 6.16. Los extractos líquidos resultantes presentaron un color amarillo similar al obtenido en las extracciones convencionales con acetato de etilo (Figura 3.10). Por su parte, el extracto crudo presentó una apariencia similar a la miel color ámbar en concordancia con estudios previos (Jiménez-Peñalver *et al.*, 2017); dicho extracto estaba compuesto por una mezcla de grasas y SLs. Esta apariencia ámbar se debe principalmente a que la extracción con FSC tiene la capacidad de extraer compuestos no polares presentes en la matriz (Lang *et al.*, 2001). Es interesante mencionar que durante los primeros 10 min de las extracciones a 100 bar no se obtuvo extracto, mientras que a 200 y 300 bar se obtuvieron solamente 2 ml de extracto

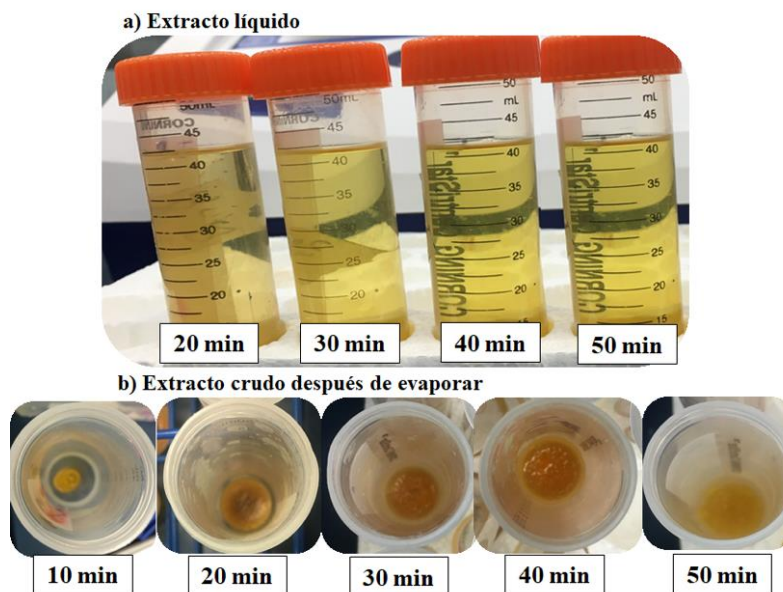


Figura 6.16. Extractos acuosos y crudos obtenidos a 200 bar. a) Extractos resultantes tras 50 minutos de extracción por FSC. Cada tubo representa 10 minutos de extracción.

b) Extractos crudo obtenido después de evaporar el extracto líquido.

Los rendimientos obtenidos de la extracción de SLs en los experimentos a diferentes presiones se presenta en la tabla 6.4. Los rendimientos totales obtenidos tras los 50 min de proceso son de 0.12 ± 0.008 , 0.13 ± 0.022 y 0.10 ± 0.009 g SL g⁻¹MS con 100, 200 y 300 bar, respectivamente. Los valores no representaron diferencias significativas por lo que la presión no afecta al rendimiento global. Además, estos resultados representan hasta un 65% y 72% de los rendimientos obtenidos en las extracciones con acetato de etilo (0.20 g SL g⁻¹MS y etanol (0.18 g SL g⁻¹MS) (sección 6.2.2).

Tabla 6.4. Rendimiento de SLs obtenido de la extracción con FSC. Las letras iguales indican que los valores no presentan diferencias significativas a un $p < 0.05$.

Presión (bares)	Tiempo (min)	g SL g ⁻¹ MS	
100	50	0.12 a	± 0.008
200	50	0.13 a	± 0.022
300	50	0.10 a	± 0.009

Por su parte, el efecto del tiempo de extracción sobre el rendimiento y el porcentaje de extracción se muestran en la figura 6.17. Los resultados muestran que con las presiones a 100 y 200 bar se libera mejor el compuesto (0.12 y 0.13 g SL g⁻¹MS). El 65% de los SLs extraídos a 100 bar se extraen a los 30 y 40 min del proceso (0.046 ± 0.004 y 0.035 ± 0.010 g SL g⁻¹MS respectivamente) y el 66% de los SLs a 200 bar (0.043 ± 0.003 y 0.044 ± 0.007 g SL g⁻¹MS) a los mismos tiempos. Por su parte, los tratamientos a 300 bar en los 30 y 40 min de extracción extraen el 58% de los compuestos (0.027 ± 0.002 y 0.035 ± 0.001 g SL g⁻¹MS, respectivamente). Estos resultados indican que una menor presión facilita la extracción del compuesto en un menor tiempo. Esto puede deberse a que mayores presiones se modifica las propiedades de solubilidad y poder de solvatación del fluido en condiciones supercríticas. Por otro lado, en las 3 presiones evaluadas se observa que en los primeros 20 min de extracción se recupera entre el 15 y el 20 % de los compuestos (Figura 6.17b). Además, mayor tiempo de extracción incrementa el rendimiento hasta un máximo a los 40 min, en donde se extraen la mayoría de los SLs (80%).

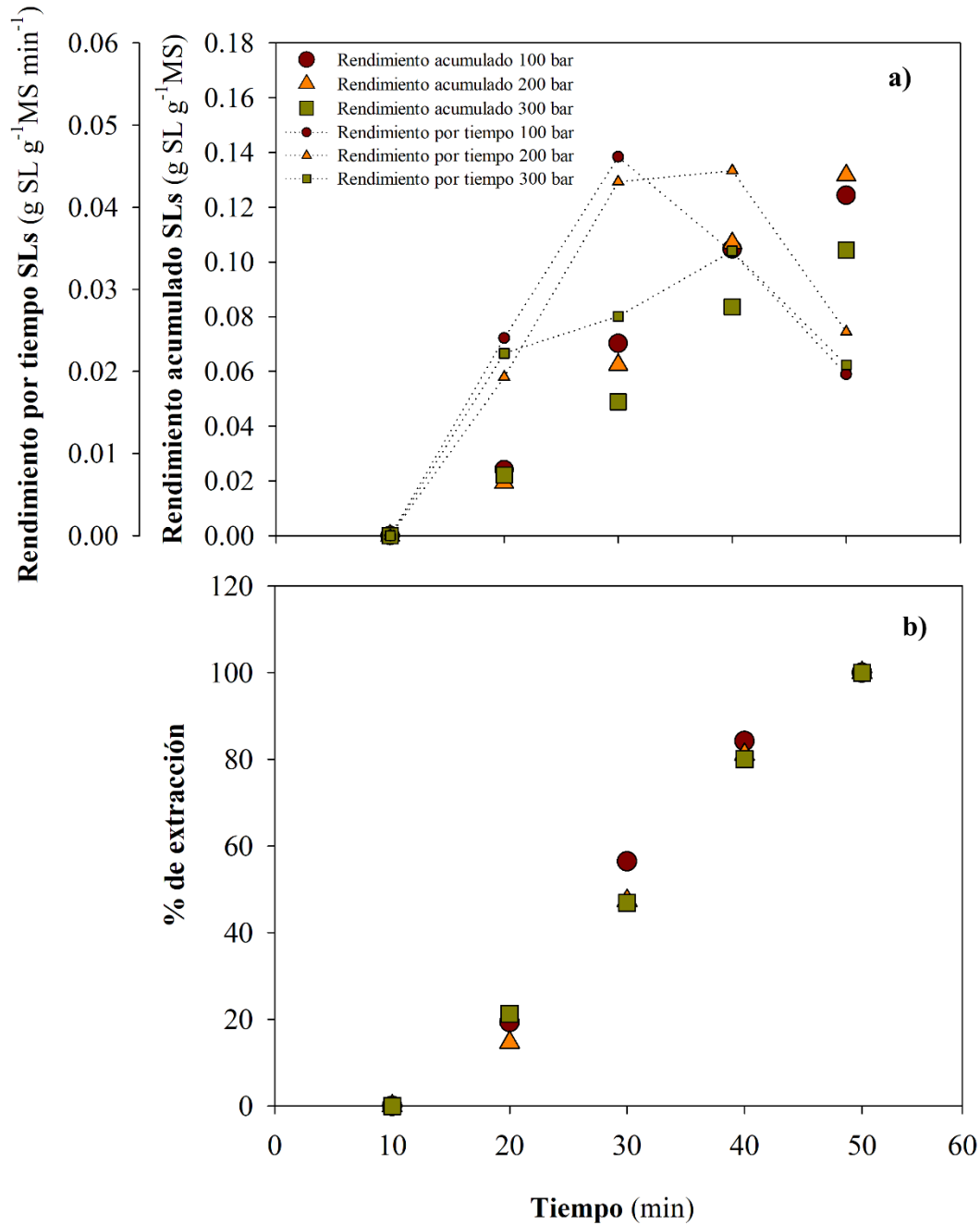


Figura 6.17. a) Cinética de extracción de SLs durante 50 minutos con FSC. b) Porcentajes de extracción de SLs.

Los extractos crudos de SLs resultantes del proceso de extracción fueron analizados por HPLC para la identificación de los compuestos extraídos. La figura 6.18 presenta las 3 presiones (100, 200 y 300 bar) en tiempos donde se obtuvo la máxima extracción de SLs (30

y 40 min, respectivamente) extraídos con FSC. Los compuestos identificados coinciden a los correspondientes extraídos tanto con la manera convencional como con ATPS anteriormente presentados, en donde los primeros 5 minutos se elucida una mezcla de impurezas y compuestos ácidos, seguido de las formas lactónicas C18:2 L y C18:1 L, siendo el C18:1 L el tipo de SL más abundante. Conforme a lo mencionado anteriormente, se debe a que el sustrato hidrofóbico (WOC) utilizado en la FES para producir SLs se encuentra conformado mayormente por ácido oleico (C18:1). Al igual que con las extracciones con ATPS no se alcanzan a apreciar los picos correspondientes a los SLs C18:0 L. Por lo que, al extraer estos compuestos con FSC, podrían pasar por desapercibidos; sin embargo, esto sería necesario confirmar mediante el análisis HPLC-MS para comprobar si los FSC extraen todos los compuestos o es selectivo con los SLs identificados.

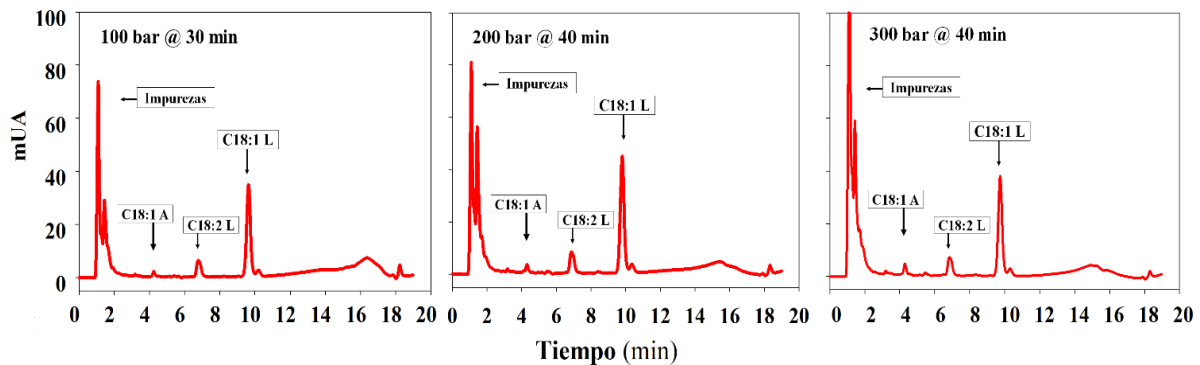


Figura 6.18. Cromatogramas de los tiempos de extracción máxima de SLs con FSC a 100, 200 y 300 bar.

Finalmente, en la figura 6.19 se presentan los perfiles seleccionados de las cinéticas de extracción de los compuestos desde los 10 hasta los 50 minutos del proceso a 200 bar. Debido a que los perfiles a 100 y 300 bar de presión muy similares a los 200 bar, se consideró hacer el análisis sólo sobre 200 bar. Se puede observar que, conforme transcurre el tiempo de extracción, el perfil de SLs se observa más estable y en mayor concentración. Esto debido a que los picos de los SLs a los 30 y 40 minutos se encuentran más definidos y en mayor intensidad en comparación con los 10 y 20 min; mientras que, a los 50 min la intensidad de los picos disminuye. Estos resultados se correlacionan con los rendimientos obtenidos con FSC; en donde, para los 30 y 40 minutos de extracción se logra extraer la mayor cantidad de

SLs. Esta relación de rendimiento en función al tiempo es un punto favorable; ya que, a pesar de que el rendimiento es menor en comparación con la extracción con acetato de etilo y ATPS, con FSC los tiempos de extracción y las operaciones unitarias se reducen por lo cual, podría haber una disminución en los costos de operación.

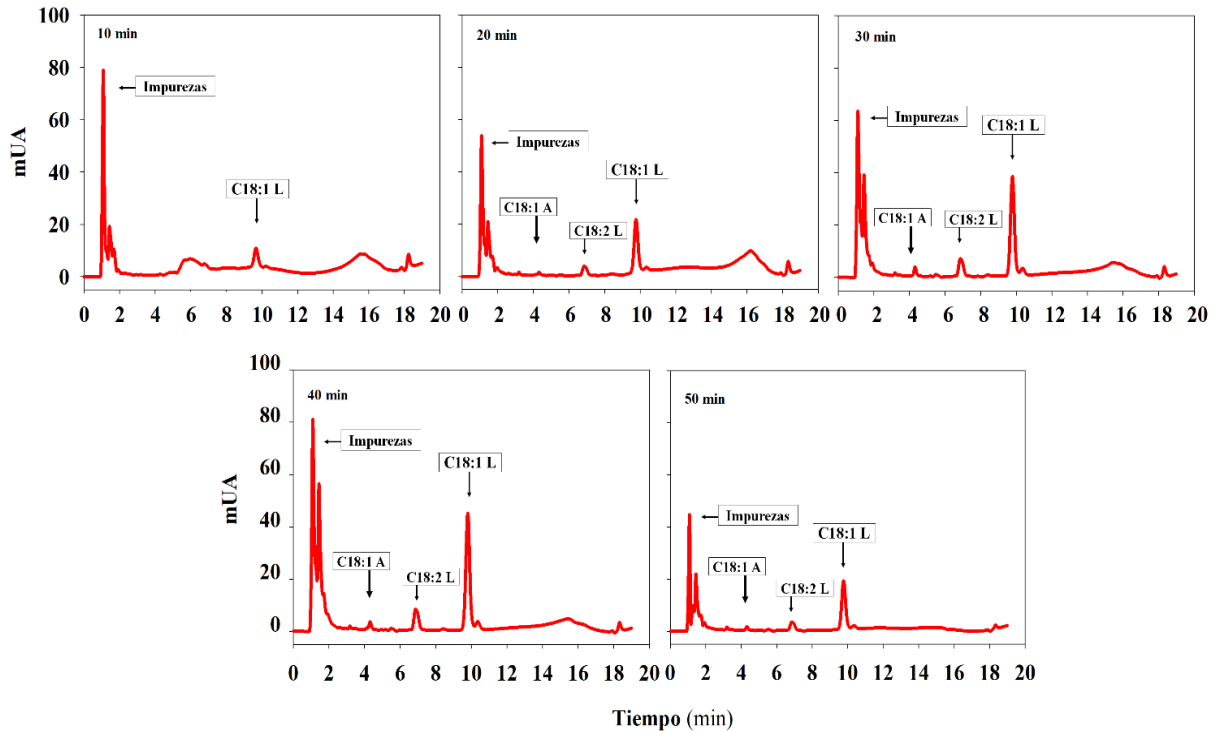


Figura 6.19. Perfil de cromatogramas a 200 bar.

Este es el primer estudio relacionado a la extracción de SLs mediante la tecnología de fluidos supercríticos. Con base a los resultados obtenidos, se demuestran que con los FSC es posible extraer SLs como una manera alterna a la extracción convencional con solventes orgánicos (acetato de etilo). La extracción con FSC resulta ser una técnica rápida, sencilla, amigable con el ambiente, selectiva y con resultados prometedores. Por lo que, es necesario un estudio a mayor profundidad para optimizar el proceso y estudiar las variables que podrían incrementar o igualar la recuperación.

6.3.5 Inventario de entradas y salidas del proceso

Los mejores resultados para la extracción de SLs se obtuvo fue con la tecnología de ATPS con el sistema S5 18:26-SFT, a continuación de presenta el inventario de entradas y salidas del presente proceso:

ENTRADAS	Valor	Unidad	Comentarios
PAJA	0.578	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
WOC	0.957	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
Melaza	0.239	kg	Para el 75% de la capacidad del reactor
Agua	1.064	L	Para el 75% de la capacidad del reactor
Humedad WOC	9.5	%	
Humedad Melaza	24.3	%	
Humedad PT	7.6	%	
Humedad mezcla	50.43	%	
Agitación y tiempo inóculo	130 / 48	rpm/h	
Aire FES y duración	1237 / 72	ml/min/h	
	1650 / 96	ml/min/h	
Agua (inóculo)	0.264	L	Para el 75% de la capacidad del reactor
Glucosa (inóculo)	10	g L ⁻¹	
Peptona (inóculo)	5	g L ⁻¹	
Extracto de malta (inóculo)	3	g L ⁻¹	
Extracto de levadura (inóculo)	3	g L ⁻¹	

Agitación (FES)	Estático	rpm/t	
autoclave (T y t)	121/ 1	°C/h	3 ciclos de esterilización
Agua en ATPS	208	mL	
Solución sal de amonio	2007.3	mL	702.5 g sal de amonio y 2007.3 ml de agua
Etanol	486.36	L	Por cada sistema de 10 g se agrega 1,8 mL de etanol
Agitación y tiempo (ATPS)	1250/_1	rpm/h	
Consumo energético	135	W/h/kg	Agitación ATPS
	7,680	W/h/kg	Producción de inóculo
SALIDAS	Valor	Unidad	Comentarios
Sólido fermentado	2.702	kg	
Humedad sólido fermentado	46.0	%	
Soforolípido	38.4	g L ⁻¹	

Las emisiones gaseosas directas son las mismas que las reportadas en el proceso anterior (Tabla 5.4). Estos resultados presentan mejores valores en comparación con los presentados en la tabla 5.4 del inventario de entradas y salidas a escala de 22 L con la extracción convencional con acetato de etilo, ya que, además de eliminar el acetato de etilo existe una reducción considerable en el solvente (etanol), así como en el consumo tanto de agua como energético obteniendo una buena concentración de SLs. Así mismo, sería necesario analizar estrategias para la recuperación del SL crudo ya que lo que se obtiene es una solución acuosa de 38.4 g SL L⁻¹. Existen métodos en los que acoplan sistemas de recuperación *in situ* a los

fermentadores para searar por gravedad los SLs crudos (Wang *et al.*, 2019), esto podría ser una alternativa que pudiera evaluarse para recuperar los SLs crudos nuestro extracto de estanol.

6.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos para la extracción y recuperación de soforolípidos utilizando tecnologías diferentes a las que son utilizadas convencionalmente demuestran que es posible extraer los compuestos de manera alterna al uso de solventes orgánicos. Los rendimientos obtenidos con las tecnologías probadas (ATPS y FSC) presentaron resultados prometedores, para el caso de los ATPS el rendimiento de SLs se incrementó hasta 1.7 veces (de 0.20 a 0.35 g SL g⁻¹MS) mientras que con FSC el rendimiento fue menor (0.13 g SL g⁻¹MS). Con ambas tecnologías el tiempo de extracción se reduce considerablemente pues ya que los métodos convencionales para extraer SLs con acetato de etilo pueden llevar hasta 3 h con consecutivas extracciones, para el caso de los ATPS se hace 1 sola extracción de 1 h y con FSC una sola extracción de 50 min, lo cual resulta benéfico pues ya que al disminuir los tiempos podría implicar una reducción en tanto en costes y como energéticos.

Estos estudios representan una primera aproximación para la recuperación de SLs por lo que abre el camino para continuar evaluando y manipulando diferentes variables que permitan definir el mejor método para extraer los compuestos del proceso final de FES e incluso lograr purificarlos. Ambos procesos presentan un gran potencial y ventaja sobre la extracción con solventes orgánicos, sin embargo, los rendimientos más altos obtenidos mediante ATPS muestran que es posible incrementar el rendimiento sin la necesidad de utilizar acetato de etilo y en un menor tiempo al usual. En un estudio más profundo ayudará a definir mejor el proceso.

Capítulo VII

CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO FUTURO

Las conclusiones generales que se obtuvieron de la presente investigación se mencionan a continuación:

- La producción de soforolípidos por FES con *Starmerella bombicola* utilizando melaza de remolacha azucarera y el residuo de winterización del aceite de girasol se ve favorecida cuando se emplean como soportes materiales biológicos (lignocelulósicos) como lo son la paja de trigo y la cáscara de arroz en comparación con materiales inertes como espumas de poliuretano y perlita.
- Los biomateriales presentan una estructura y rugosidad que favorece la fijación del microorganismo lo que le permite desempeñar mejor la producción de SLs cuando se le proporcionan los sustratos adecuados. La paja de trigo fue el soporte que presentó los mejores resultados para la producción de SLs. Los rendimientos obtenidos fueron de 0.20 g SL g⁻¹MS. Con una productividad de 2.9 g SL L⁻¹ d⁻¹.
- Se estableció una metodología HPLC-MS para caracterizar los SLs producidos por FES, en donde se observó que el tipo de SL abundante es el C18:1 en forma lactónica, lo cual tiene relación a que el tipo de ácido graso mayoritario en el residuo de winterización es el ácido oleico (C18:1).
- La reducción del contenido de grasas del 73 al 44% del sustrato hidrofóbico utilizado (residuo de winterización del aceite de girasol) no tuvo efecto negativo en la producción de soforolípidos. Gracias a que las grasas no son consumidas en su totalidad durante todo el proceso, la reducción no afectará al rendimiento, lo cual indica que se puede llegar a obtener buenos rendimientos utilizando cantidades más bajas del sustrato y que el proceso es robusto y puede asumir modificaciones en el proceso productivo de origen del residuo.
- Se comprobó que existe una correlación entre la producción de SLs y el consumo de oxígeno acumulado que depende del material soporte utilizado, lo cual indica que este parámetro puede ser utilizado para monitorear la producción de SLs.

- Es posible la producción de SLs a partir de residuos análogos al WOC, sin embargo, es necesario considerar residuos que no presenten impurezas que puedan interferir en la calidad del producto.
- Se estableció una estrategia de ciclos de esterilización al soporte y a la mezcla sólida lo cual, permitió reducir considerablemente la contaminación con otros microorganismos en los sistemas de fermentación.
- El escalado del proceso se llevó exitosamente a 22 y 100 L con una productividad de 2.5 g SL L⁻¹ d⁻¹ a las 120 h y 2.4 g SL L⁻¹ d⁻¹ a las 144 h respectivamente, en donde se observó que, con una temperatura ambiente controlada e implementando una estrategia de aireación, la temperatura dentro del reactor puede ser controlada. En nuestros sistemas de FES se observaron perfiles dinámicos de temperatura lo cual, al haber gradientes dentro del reactor le permitió a la levadura adaptarse y producir SLs a pesar de que se registraron temperaturas de hasta 42°C.
- Se probó la estrategia de FES por lote alimentado (con glucosa) para la producción de SLs, sin embargo, los rendimientos que se presentaron fueron de 0.11 g SL g⁻¹MS a las 120 h y no se observó incremento después de ese tiempo, se observó una gran contaminación de diferentes microorganismos, los cuales, al tener una fuente de carbono fácilmente asimilable presentaron una ventaja competitiva con la levadura.
- Se realizó un inventario ambiental del proceso de producción de SLs, el cual permitirá realizar un estudio económico y de análisis de ciclo de vida. Así mismo, se determinó que el sólido residual fermentado presenta un potencial de producción de metano del orden de 232.5 L CH₄ kg⁻¹ SV, lo cual, resulta benéfico para la implementación de una estrategia cero residuos.
- Se analizaron otras tecnologías para la extracción y recuperación de SLs (sistemas de dos fases acuosas y fluidos supercríticos), en donde se encontró que es posible extraer los compuestos mediante tecnologías alternas a la extracción con solventes orgánicos. El rendimiento de SLs con los sistemas de dos fases acuosas se logró incrementar hasta 1.7 veces respecto a la extracción con acetato de etilo, mientras que con fluidos

super-críticos a pesar de que el rendimiento fue menor, los tiempos de extracción y el número de operaciones unitarias en comparación con los del método convencional se reducen considerablemente.

La presente tesis da continuación para ampliar los estudios de la línea de investigación sobre la producción de SLs mediante FES, como trabajo futuro considera:

1. Evaluar otros residuos ricos en grasas como sustratos hidrofóbicos y establecer estrategias para evitar que las impurezas contenidas tengan interferencia en la calidad de los surfactantes.
2. Explorar la producción de SLs a escala de 100 L a una capacidad del reactor mayor a la evaluada en la presente tesis (60%) implementando las estrategias de esterilización, de aireación y controlando la temperatura ambiente.
3. Concluir con el estudio económico y de análisis de ciclo de vida del proceso de la producción de SLs por FES que se está llevando a cabo por la investigadora María Eugenia Martínez de la fundación Fraunhofer de Santiago de Chile y detectar posibles puntos de mejora.
4. Los resultados de la recuperación de SLs mediante otras tecnologías son la primera aproximación para valorar alternativas para la sustitución de los métodos convencionales que presentan un impacto tanto económico como ambiental. La evaluación de tecnologías como ATPS y FSC son el primer estudio relacionado con la recuperación de SLs. Por lo tanto, existen diferentes variables que se pueden manipular y estudiar para establecer la mejor tecnología para implementar en el proceso. Para el caso de ATPS, la evaluación de polímeros, sales o líquidos iónicos, tamaño de partícula, entre otros. Para el caso de FSC explorar diferentes presiones, temperaturas, y tiempos de extracción.
5. Explorar las aplicaciones ambientales y biomédicas de los SLs obtenidos en el presente trabajo. Se ha demostrado que los SLs presentan propiedades anticancerígenas, por lo que sería interesante evaluar la actividad anticancerígena en diferentes líneas celulares.

REFERENCIAS

Referencias

- Accorsini, F. R., Rossini Mutton, M. J., Macedo Lemos, E. G., Benincasa, M. 2012. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Braz J Microbiol.* 43, 116-125.
- Adani, F., Ubbiali, C., Generini, P. 2006. The determination of biological stability of composts using the Dynamic Respiration Index: The results of experience after two years. *Waste Manage.* 26, 41-48.
- Andrade Silva, N. R., Luna, M. A., Santiago, A. L., Franco, L. O., Silva, G. K., De Souza, P. M., Okada, K., Albuquerque, C. D., Da Silva, C. A., Campos-Takaki, G. M. 2014. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil. *Int J Mol Sci* 15:15377-95.
- Andrade, K. S., Goncalvez, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M., Martínez, J., Ferreira, S. R. 2012. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, 88, 544-552.
- Antunes-Ricardo, M., García-Cayuela, T., Ibáñez, E., Gutiérrez-Urbe, J. A., Cano, M. P., Guajardo-Flores, D. 2019. Enzyme-assisted in situ supercritical fluid extraction of isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.
- Antunes-Ricardo, M., Mendiola, J. A., García-Cayuela, T., Ibañez, E., Gutiérrez-Urbe, J. A., Cano, M. P., Guajardo-Flores, D. 2020. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of antioxidant isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *The Journal of Supercritical Fluids*, 158, 104713.
- Ashby, R. D., McAloon, A. J., Solaiman, D. K. Y., Yee, W. C., Reed, M. 2013. A process model for approximating the production costs of the fermentative synthesis of sophorolipids. *J Surfact Deterg.* 16:683–691.
- Ashby, R. D., Nuñez, A., Solaiman, D. K. Y., Foglia, T. A., 2005. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *J Am Oil Chem Soc* 82:625–630.

Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., 2010. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. *Biotechnol Lett* 32:1429-1437.

Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., Foglia, T. A. 2006. The use of fatty acid esters to enhance free acid sophorolipid synthesis. *Biotechnol Lett* 28:253-260.

Ashby, R.D., Solaiman, D. K. Y., Foglia, T. A. 2008. Property control of sophorolipids: Influence of fatty acid substrate and blending. *Biotechnol Lett* 30:1093–1100.

Astolfi, V., Joris, J., Verlindo, R., Oliveira, J. V., Maugeri, F., Mazutti, M. A., Treichel, H. 2011. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. *Biochemical engineering journal*, 58, 39-49.

Baccile, N., Babonneau, F., Banat, I., Ciesielska, K., Cuvier, A. S, Devreese, B., Everaert, B., Lydon, H., Marchant, R., Mitchell, C. A., Roelants, S., Six, L., Theeuwes, E., Tsatsos, G., Tsotsou, G. E., Vanlerberghe, B., Van Bogaert, I. N. A., Soetaert, W. 2016. Development of a cradle-to-grave approach for acetylated acidic sophorolipid biosurfactants. *ACS Sustain Chem Eng*. 5:1186–1198.

Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, A., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties *J. Environ. Manage.* 169, 126-131.

Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.

Barrios-González, J., 2012. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem.* 47(2), 175–185.

Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. A. 2011. Aqueous two-phase systems.

Biz, A., Finkler, A. T. J., Pitol, L. O., Medina, B. S., Krieger, N., Mitchell, D. A. 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 111, 54-62.

Brumano, L. P., Soler, M. F., Da Silva, S. S. 2016. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. *Industrial Biotechnology*, 12(1), 31-39.

Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De la Cruz, R., Prado-Barragán, A., Aguilar-González, M. A., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., 2013. Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food Bioprod. Process.* 92, 376–382.

Castiglioni, G. L., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V. Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quim Nova* 2009;32(2):292–295. 50. Bhardwaj

Cerda Llanos, A. P., Mejías, L., Rodríguez Serrano, P., Rodríguez Gutiérrez, A., Artola Casacuberta, A., Font i Segura, X., Sánchez Ferrer, A. 2018. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: a first approach. *Bioresource technology*.

Cerda, A., Artola, A., Font, X., Barrena, R., Gea, T., Sánchez, A., 2018. Composting of food wastes: Status and challenges. *Bioresour. Technol.*, 248, 57-67.

Cerda, A., El-Bakry, M., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces* sp. in a sequential batch operation. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 2394-2401.

Chen, H. Z., Xu, J. 2004. Principle and application of modern solid-state fermentation.

Chen, H., 2013. Modern solid state fermentation. Springer, The Netherlands.

Chen, Y., Lin, Y., Tian, X., Li, Q., Chu, J. 2019. Real-time dynamic analysis with low-field nuclear magnetic resonance of residual oil and sophorolipids concentrations in the fermentation process of *Starmerella bombicola*. *J Microbiol Methods* 157, 9–15.

Colin, V. L., Castro, M. F., Amoroso, M. J., Villegas, L. B. 2013. Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in

remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium. *J Hazard Mater* 2013;261:577–583.

Composting Council, U.S. 2001. *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*. Edaphos International, Houston, U.S.A.

Costa, J. A., Treichel, H., Santos, L. O., Martins, V. G. 2018. Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 357-372). Elsevier.

Cruz, J. M., Hughes, C., Quilty, B., Montagnolli, R. N., Bidoia, E. D. 2018. Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. *Waste Biomass Valor.* 9, 613–618.

Cserhádi, T., Forgács, E., Oros, G. 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment international*, 28(5), 337-348.

Cuellar, M. C., Straathof, A. J. 2020. Downstream of the bioreactor: advancements in recovering fuels and commodity chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 189-195.

Cui, Z., Shi, J., Li, Y., 2011. Solid-state anaerobic digestion of spent wheat straw from horse stall. *Bioresource technology*, 102(20), 9432-9437.

Daniel, H., Reuss, M., Syldatk, C. 1998. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two-stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnol Lett* 20:1153–1156.

Dasgupta, A., y Chandel, M. K. 2020. Enhancement of biogas production from organic fraction of municipal solid waste using alkali pretreatment. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 1-11.

Daverey, A., Pakshirajan, K. 2009. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Res Int* 42:499–504.

Daverey, A., Pakshirajan, K. 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79:246–253.

Daverey, A., Pakshirajan, K. 2011. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. *Clean Technol Envir* 13:481-488.

Daverey, A., Pakshirajan, K. 2015. Treatment of dairy wastewater containing high amount of fats and oils using a yeast-bioreactor system under batch, fed-batch and continuous operation. *Desal Water Treat* 57:1-7.

Davila, A. M., Marchal, R., Vandecasteele, J. P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition – sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;38:6–11.

De la Cruz, R., Ascacio, J. A., Buenrostro, J., Sepúlveda, L., Rodríguez, R., Prado-Barragán, A., Aguilar, C. N. 2015. Optimization of ellagitannase production by *Aspergillus niger* GH1 by solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(7), 617-631.

De la Rubia, M. A., Villamil, J. A., Rodriguez, J. J., Borja, R., Mohedano, A. F. 2018. Mesophilic anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with the liquid fraction from hydrothermal carbonization of sewage sludge. *Waste Management*, 76, 315-322.

Delbeke, E. I., Roelants, S. L., Matthijs, N., Everaert, B., Soetaert, W., Coenye, T., Stevens, C. V. 2016. Sophorolipid amine oxide production by a combination of fermentation scale-up and chemical modification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(27), 7273-7281.

Deshpande, M., Daniels, L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour Technol* 54:143–150.

Dolman, B. M., Kaisermann, C., Martin, P. J., Winterburn, J.B. 2017. Integrated sophorolipid production and gravity separation. *Process Biochem* 54:162–171.

- Dorado, A.D., Lafuente, F.J., Gabriel, D., Gamisans, X., 2010. A comparative study based on physical characteristics of suitable packing materials in biofiltration. *Environ. Technol.* 31, 193–204
- Drouin, C. M., Cooper, D. G. 1992. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 40(1), 86-90.
- Edser, C. 2018. Sizing up surfactants market. *Focus on Surfactants*. 2018(1), 1-2.
- El-Bakry, M., Abraham, J., Cerda, A., Barrena, R., Ponsá, S., Gea, T., Sanchez, A., 2015. From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1999–2042.
- Elegbede, J., Lateef, A., 2017. Valorization of Corn-Cob by Fungal Isolates for Production of Xylanase in Submerged and Solid State Fermentation Media and Potential Biotechnological Applications. *Waste Biomass Valor.* 9, 1273-1287.
- Elshikh, M., Moya-Ramírez, I., Moens, H., Roelants, S., Soetaert, W., Marchant, R., Banat, I. M., 2017. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1111–1123.
- Felse, P. A., Shah, V., Chan, J., Rao, K. J., Gross, R. 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme Microb Technol* 40:316–323.
- Ferrer, I., Ponsá, S., Vázquez, F., Font, X. 2008. Increasing biogas production by thermal (70 C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 186-192.
- Fitamo, T., Boldrin, A., Boe, K., Angelidaki, I., Scheutz, C., 2016. Co-digestion of food and garden waste with mixed sludge from wastewater treatment in continuously stirred tank reactors. *Bioresource technology*, 206, 245-254.
- Fleurackers, S. J. J. 2006. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 108:5–12.
- G, Cameotra, S.S., Chopra, H. K. 2013. Biosurfactants from fungi: A review. *J Pet Environ Biotechnol.* 04(06):1–6

- Gabriel, D., Deshusses, M.A. 2003. Retrofitting existing chemical scrubbers to biotrickling filters for H₂S emission control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 6308-6312.
- Gaur, V. K., Regar, R. K., Dhiman, N., Gautam, K., Srivastava, J. K., Patnaik, S., Manickam, N., 2019. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresour. Technol.* 285, 121314.
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology research international*, 2011.
- Gómez-Loredo, A., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2014. Partition behavior of fucoxanthin in ethanol-potassium phosphate two-phase systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(11), 1637-1645.
- Gong, Z., He, Q., Che, C. Liu, J., Yang, G., 2020. Optimization and scale-up of the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state fermentation using high-density polyurethane foam as an inert support. *Bioprocess Biosyst Eng* 43, 385–392.
- González, D., Guerra, N., Colón, J., Gabriel, D., Ponsá, S., Sánchez, A. (2019). Filling in sewage sludge biodrying gaps: Greenhouse gases, volatile organic compounds and odour emissions. *Bioresource technology*, 291, 121857.
- González-Valdez, J., Benavides, J., Rito-Palomares, M. 2017. Characterization of aqueous two-phase systems and their potential new applications. In *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products* (pp. 19-33). Springer, Cham.
- Gupta, R., Bradoo, S., Saxena, R. K. 1999. Aqueous two-phase systems: An attractive technology for downstream processing of biomolecules. *Curr. Sci.*
- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S., Favela-Torres, E., 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.* 17, 219–224.

- Hazra, C., Kundu, D., Ghosh, P., Joshi, S., Dandi, N., Chaudhari, A. 2011. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(2), 185-198.
- Henry, M. P., Donlon, B. A., Lens, P. N., Colleran, E. M., 1996. Use of anaerobic hybrid reactors for treatment of synthetic pharmaceutical wastewaters containing organic solvents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 66(3), 251-264.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography a*, 1217(16), 2495-2511.
- Hirata, Y., Ryu, M., Oda, Y., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., Sugiura, M. 2009. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 142-146.
- Hu, Y., Ju, L. K. 2001. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(10), 593-601.
- Ibarruri, J., Cebrián, M., Hernández, I., 2019. Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus* sp. to Enhance Nutritional Value. *Waste Biomass Valor* 10, 3687–3700.
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Hussain, H. I. 2016. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological procedures online*, 18(1), 18.
- Irwin, S. "Why are Ethanol Prices So Low?." *farmdoc daily* (9):23, Department of Agricultural and Consumer Economics, University of Illinois at Urbana-Champaign, February 8, 2019.
- Isoda, H., Nakahara, T. 1997. Mannosylerythritol lipid induces granulocytic differentiation and inhibits the tyrosine phosphorylation of human myelogenous leukemia cell line K562. *Cytotechnology*, 25(1-3), 191-195.

- Jadhav, J. V., Pratap, A. P., Kale, S. B. 2019. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. *Process biochemistry*, 78, 15-24.
- Jiang B, Li Z-G, Dai J-Y, Zhang D-J, Xiu Z-L., 2009. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. *Process Biochem.* 44:112–7.
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z., McCabe, M., Cormican, P., Gardiner, G. E. 2018. Inhibition of volatile fatty acids on methane production kinetics during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Waste management*, 79, 302-311.
- Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X., Gea, T., 2018. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *J. Clean. Prod.* 172, 2735–2747.
- Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., Font, X., 2016. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem. Eng. J.* 115, 93–100.
- Jiménez-Peñalver, P., Koh, A., Gross, R., Gea, T., Font, X., 2019b. Biosurfactants from Waste: Structures and Interfacial Properties of Sophorolipids Produced from a Residual Oil Cake. *J. Surfact. Deterg.*
- Jiménez-Peñalver, P., Rodríguez, A., Daverey, A., Font, X., Gea, T., 2019a. Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: State of the art and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Bio.* 18, 413-435.
- Jiménez-Peñalver. 2017. Sophorolipids production by solid-state fermentation: from lab-scale to pilot plant. PhD thesis.
- Joshi-Navare, K., Khanvilkar, P., Prabhune, A. 2013. Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. *Biochem. Res. Int.* 3:133–143.
- Kaur, G., Wang, H., To, M. H., Roelants, S. L. K. W., Soetaert, W., Lin, C. S. L. 2019. Efficient sophorolipids production using food waste. *J Clean Prod* 232:1-11.

- Kilonzo, P., Margaritis, A., Bergougnou, M., 2011. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. *Bioresour. Technol.* 102, 3662–3672.
- Kim, P., Kim, J. H. 2005. Characterization of a novel lipopolysaccharide biosurfactant from *Klebsiella oxitoca*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(6), 494.
- Kopsahelis, A., Kourmentza, C., Zafiric, C., Kornaros, M. 2018. Gate-to-gate life cycle assessment of biosurfactants and bioplasticizers production via biotechnological exploitation of fats and waste oils. *J Chem Technol Biotechnol.* 93:2833–2841
- Krieger, N., Neto, D.C., Mitchell, D.A., 2010. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 203-210
- Kulakovskaya, E., Kulakovskaya, T. 2013. Extracellular glycolipids of yeasts: biodiversity, biochemistry, and prospects. Academic Press.
- Lang, Q., Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
- Liew, L. N., Shi, J., Li, Y. 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and bioenergy*, 46, 125-132.
- Liu, X., Ma, X., He, H., Yao, R. 2017. Advances in sophorolipids production with low-cost substrates. *Chinese J Bioprocess Eng* 15(03):59-68.
- Liu, Z., Tian, X., Chen, Y., Lin, Y., Mohsin, A., Chu, J. 2019. Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*. *Process Biochem* 81: 1-10.
- Liwerska-Bizukojc, E., Miksch, K., Malachowska-Jutysz, A., Kalka, J., 2005. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere* 58, 1249–1253.
- Long, X., Zhang, G., Shen, C., Sun, G., Wang, R., Yin, L., Meng, Q. 2013. Application of rhamnolipid as a novel biodemulsifier for destabilizing waste crude oil. *Bioresource technology*, 131, 1-5.

- López-Pérez, M., Viniegra-González, G. 2016. Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: Present status and perspectives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 1224–1231.
- Ma, X. J., Li, H., Shao, L. J., Shen, J., Song, X. 2011. Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1623-1632.
- Maddikeri, G. L., Gogate, P. R., Pandit, A.B. 2015. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. *Chem Eng J* 263:479–487.
- Maeng, Y., Kim, K. T., Zhou, X., Jin, L., Kim, K. S., Kim, Y. H., Park, J. H., Chen, X., Kong, M., Cai, L., Li, X. 2018. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. *Microb Biotechnol* 11(5):917-929.
- Maier, R. M., Soberon-Chavez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(5), 625-633.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U. C. 2005. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Mal. J. Microbiol.* 2, 1-9.
- Martin del Campo, M., Camacho, R.M., Mateos-Díaz, J.C., Müller-Santos, M., Córdova, J., Rodríguez, J.A., 2015. Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles* 19, 1121–1132.
- Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R. 2018. Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: operational strategies and scaling-up of the process. *Bioresource technology*, 263, 136-144.

Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2017. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *J. Clean. Prod.* 158, 8–17.

Martínez-Avila, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R. 2019. Fed-batch and sequential-batch approaches to enhance the bioproduction of 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate in solid-state fermentation residue-based systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(12), 3389-3399.

Mata-Gómez, M., Mussatto, S. I., Rodríguez, R., Teixeira, J. A., Martinez, J. L., Hernandez, A., Aguilar, C. N. 2015. Gallic acid production with mouldy polyurethane particles obtained from solid state culture of *Aspergillus niger* GH1. *Appl Biochem Biotechnol* 176:1131–1140.

Maulini-Duran, C., Abraham, J., Rodríguez-Pérez, S., Cerda, A., Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A. 2015. Gaseous emissions during the solid state fermentation of different wastes for enzyme production at pilot scale. *Bioresource technology*, 179, 211-218.

Maulini-Duran, C., Artola, A., Font, X., Sánchez, A., 2014. Gaseous emissions in municipal wastes composting: effect of the bulking agent. *Bioresource technology*, 172, 260-268.

Maulini-Duran, C., Puyuelo, B., Artola, A., Font, X., Sánchez, A., & Gea, T. 2014. VOC emissions from the composting of the organic fraction of municipal solid waste using standard and advanced aeration strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(4), 579-586.

Mejía-Manzano, L. A., Barba-Dávila, B. A., Vázquez-Villegas, P., Serna-Saldívar, S. O., González-Valdez, J. 2019. Improved extraction of the natural anticancerigen pristimerin from *Mortonia greggii* root bark using green solvents and aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 211, 667-672.

Minucelli, T., Ribeiro-Viana, R.M., Borsato, D., Andrade, G., Cely, M.V.T., De Oliveira, M. R., Baldo, C., Celligoi, M. A. P. C., 2017. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. *Waste Biomass Valor.* 8, 743-753.

- Mishra, M., Muthuprasanna, P., Prabha, K. S., Rani, P. S., Satish, I. A., Ch, I. S., Shalini, S. 2009. Basics and potential applications of surfactants-a review.
- Mitchell, D. A., Krieger, N., Stuart, D. M., Pandey, A. 2000. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35(10), 1211-1225.
- Morya, V. K., Park, J. H., Kim, T. J., Jeon, S., Kim, E. K., 2013. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresour. Technol.* 143, 282-288.
- Nagel, F. J. J., Tramper, J., Bakker, M. S., Rinzema, A. 2001. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(2), 219-230.
- Nooman, M. U., Mahmoud, M. H., Al-kashef, A. S., Rashad, M. M., 2017. Hypocholesterolemic impact of newly isolated sophorolipids produced by microbial conversion of safflower oil cake in rats fed high-fat and cholesterol diet. *Grasas y Aceites* 68, 212.
- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. As Solid-State Fermentation Production Systems 18, 356–360.
- Otzen, D. E., 2017. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1859, 639–649.
- Pagans, E., Font, X., Sánchez, A., 2006. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of hazardous materials*, 131(1-3), 179-186.
- Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D., Lang, S. 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 663-673.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.

- Parekh, V. J., Pandit, A. B. 2012. Solid state fermentation (SSF) for the production of sophorolipids from *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 using glucose, wheat bran and oleic acid. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 6, 418–424.
- Parekh, V.J, Patravale, V. B., Pandit A. B. 2012. Mango kernel fat: a novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using *Starmerella bombicola* NRRL -Y 17069, *Ann. Biol. Res.* 3, 1798–1803.
- Patel, S., Homaei, A., Patil, S., Daverey, A. 2019. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 27–37.
- Pekin, G., Vardar-Sukan, F., Kosaric, N. 2005. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. *Eng Life Sci* 5:357-361.
- Peñamaría, G. M., Morell-Nápoles, G., Cujilema-Quitio, M., Leon, G., Fickers, P., Ramos-Sánchez, L. B. 2017. Screening of Microorganisms and Raw Materials for Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 13, 293-300.
- Pitol, L. O., Biz, A., Mallmann, E., Krieger, N., Mitchell, D. A. 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 283, 1009-1018.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A. 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *Journal of environmental quality*, 39(2), 706-712.
- Poomtien, J., Thaniyavarn, J., Pinphanichakarn, P., Jindamorakot, S., Morikawa, M. 2013. Production and Characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52T. *Biosci Biotech Bioch* 77:2362–2370
- Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A. 2010. A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chemical Engineering Journal*, 165(1), 161-169.
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H., 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of food engineering*, 99(1), 16-23.

- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., Srinivas, N. D., Barhate, R. S. 2003. Aqueous two-phase extraction—an environmentally benign technique. *Clean technologies and environmental policy*, 5(2), 136-141.
- Rahardjo, Y. S. P., Jolink, F., Haemers, S., Tramper, J., Rinzema, A. 2005. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. *Biomol. Eng.* 22, 133–139.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., Ramesh, V. 2011. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Sci Technol*, 1(1), 7-16.
- Rashad, M. M., Nooman, M. U., Ali, M. M., Al-Kashef, A. S., Mahmoud, A. E. 2014. Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids by means of solid state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. *Grasas Aceites* 65, 2.
- Renge, V. C., Khedkar, S. V., Nandurkar, N. R. 2012. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. *Sci Rev Chem Comm*, 2(4), 585e90.
- Reverchon, E. 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 10(1), 1-37.
- Ribeiro, I. A., Bronze, M. R., Castro, M. F., Ribeiro, M. H. L. 2012. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC – MS / MS methods for identification and characterization of sophorolipids. *J. Chromatogr. B.* 899, 72–80.
- Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A., Artola, A. 2019. Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. *Waste Management*, 93, 63-71.
- Rosa, C. A., Lachance, M. A. 1998. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *Int J Syst Evol Microbiol*, 48, 1413-1417.

- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Bäcker, W., Aires-Barros, M. R. 2012. Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column. *Journal of Chromatography B*, 880, 148-156.
- Roslan, M., Ikubar, M., Abdul, M., Madihah, M., Adibah, S. 2018. Solid-state fermentation of oil palm frond petiole for lignin peroxidase and xylanase-rich cocktail production. *3 Biotech* 8, 1–11
- Rufino, R. D., Luna, J. M., Campos-Takaki, G. M., Ferreira, S. R., Sarubbo, L. A. 2012. Application of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals. *Chem. Eng*, 27, 61-66.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: a review and a correlation analysis. *Bioresour. Technol.* 100, 2655-2666.
- Samad, A., Zhang, J., Chen, D., Liang, Y. 2014. Sophorolipid Production from Biomass Hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 2246–2257.
- Sánchez-Rangel, J. C., Jacobo-Velázquez, D. A., Benavides, J. 2017. Aqueous Two-Phase System Strategies for the Recovery and Partial Purification of Bioactive Low Molecular Weight Compounds. In *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*. 79-96
- Santos, S. A., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., Silvestre, A. J. 2012. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, 71, 71-79.
- Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni, J., Palaniswamy, M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnol Bioproc E.* 14(6), 788–794
- Schwartz, L.J. 1991. Toxic effects of selected industrial solvents in batch and continuous anaerobic reactors. *Applied biochemistry and biotechnology*, 28(1), 297-305.

- Scott, T. A., Melvin, E. H. 1953. The determination of hexoses with anthrone. *Anal. Biochem.* 25, 1656-1658.
- Sella, S. R. B. R., Guizelini, B. P., Vandenberghe, L. P. de S., Medeiros, A. B. P., Soccol, C. R. 2009. Lab-scale production of *Bacillus atrophaeus* spores by solid state fermentation in different types of bioreactors. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 52, 159–170.
- Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Azim, A., Gross, R. 2005. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4093–4100.
- Shah, V., Jurjevic, M., Badia, D. 2007. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. *Biotechnol Prog* 23:512–515.
- Sharma, R., Oberoi, H. S. 2017. Biosurfactant-aided bioprocessing: Industrial applications and environmental impact. In *Recent advances in applied microbiology* (pp. 55-88). Springer, Singapore.
- Silva, V. L., Lovaglio, R. B., Von Zuben, C. J., Contiero, J. Rhamnolipids: Solution against *Aedes aegypti*? *Front Microbiol* 2015;6:2–6.
- Simental-Martínez, J., Rito-Palomares, M., Benavides, J. 2014. Potential application of aqueous two-phase systems and three-phase partitioning for the recovery of superoxide dismutase from a clarified homogenate of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*, 30(6), 1326-1334.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44(1), 13–18
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A., Foglia, T. A. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* 29:1341–1347.
- Spencer, J. F. T., Gorin, P. A. J., Tulloch, A. P. 1970. *Torulopsis bombicola* sp. n. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 36(1), 129-133.

Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation 81, 146–161.

Tong, X., Smith, L. H., McCarty, P. L. 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, 21(4), 239-255.

The TNN Development Limited. Precio Alibaba. 2020. <https://spanish.alibaba.com/product-detail/99-9-min-ethyl-acetate-1850008375.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.5da92607IyJUV1>.

U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Method 9071B. Available from: <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/9071b.pdf>.

Van Bogaert, I. N. A., Zhang, J., Soetaert, W. 2011. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem.* 46, 821–833.

Velasco, R. J., Villada, H. S., Carrera, J. E. 2007. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.

Veloso, A. V., Silva, B. C., Bomfim, S. A., De Souza, R. L., Soares, C. M. F., Lima, Á. S. 2020. Selective and continuous recovery of ascorbic acid and vanillin from commercial diet pudding waste using an aqueous two-phase system. *Food and Bioproducts Processing*, 119, 268-276.

Wadekar, S. D., Kale, S. B., Arvind, L., Diptinarayan, B., Pratap, A. P. 2012. Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from Virgin and Waste Frying Oils, and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. *J Am Oil Chem Soc* 89:1029-1039.

Wadekar, S. D., Kale, S. B., Lali, A. M., Bhowmick, D. N., Pratap, A. P. 2012b. Jatropha oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 114:823-832.

Wang, H., Kaur, G., To, M. H., Roelants, S. L., Patria, R. D., Soetaert, W., Lin, C. S. K., 2019. Efficient in-situ separation design for long-term sophorolipids fermentation with high productivity. *Journal of Cleaner Production*, 246, 118995.

- Wang, H., Roelants, L.K.W., T, M.H., Patria, R.D., Kaur, G., Lau, N.S., Lau, C.Y., Bogaert, N.A. Van, Soetaert, W., Sk, C., 2018. *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream. J Chem Technol Biotechnol. 94, 999-1007.
- Wang, H., Tsang, C. W., To, M. H., Kaur, G., Roelants, S. L., Stevens, C. V., Lin, C. S. K. 2020. Techno-economic evaluation of a biorefinery applying food waste for sophorolipid production—a case study for Hong Kong. Bioresource Technology, 303, 122852.
- Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., Cheng, S. S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of hazardous materials, 151(1), 155-163.
- Yuan, J., Raza, W., Huang, Q., Shen, Q. 2011. Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction. Journal of Chromatography B, 879(26), 2746-2750.
- Zhang X, Zhang F, Luo G, Yang S, Wang D. 2006. Extraction and separation of phycocyanin from *Spirulina* using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. J Food Nutr Res. 2015;3:15–9
- Zhang, C., Xiao, G., Peng, L., Su, H., Tan, T. 2013. The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. Bioresource technology, 129, 170-176.
- Zhang, L., Somasundaran, P., Singh, S. K., Felse, A. P., Gross, R. 2004. Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 240:75–82.
- Zhang, Y., Jia, D., Sun, W., Yang, X., Zhang, C., Zhao, F., Lu, W. 2018. Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. Microb biotechnol 11(3):455-464.

