

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

Estudio comparativo de la producción de soforolípidos en cultivo en medio líquido y sólido por *Starmerella bombicola*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.Q. RICARDO MARÍN SÁNCHEZ

DIRECTOR Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana

ASESORES Dr. José de Jesús Cázares Marinero
Polioles S.A. de C.V.
Mtra. Lorena Pedraza Segura
Universidad Iberoamericana

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONACYT con la referencia 001465. RMS agradece el apoyo para la obtención del grado de Maestro en Biotecnología a CONACyT, por la beca recibida, (CVU 928786) así como a la Universidad Autónoma Metropolitana.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00293

Matricula: 2183801678

Estudio comparativo de la producción de soforolípidos en cultivo en medio líquido y sólido por *Starmarella bombicola*



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 4 del mes de noviembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ
DR. JOSE DE JESUS CAZARES MARINERO
MTRA. LORENA LETICIA PEDRAZA SEGURA
DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: RICARDO MARIN SANCHEZ

RICARDO MARIN SANCHEZ
ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ

VOCAL

DR. JOSE DE JESUS CAZARES MARINERO

VOCAL

MTRA. LORENA LETICIA PEDRAZA SEGURA

SECRETARIO

DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

A mis padres, Diana y Ricardo.

Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Saucedo por su apoyo y guía. Agradezco la gran oportunidad de integrarme en su grupo, también sus consejos y enseñanzas tan importantes durante el desarrollo del proyecto, así como la confianza que depositó en mí.

Al Dr. José Cázares por todo el apoyo recibido, por los consejos, retos y comentarios de los que aprendí y sigo aprendiendo muchísimo. También por la amistad y confianza que me ha brindado.

A la Mtra. Lorena Pedraza por sus importantes comentarios y asesoría.

A la Dra. Gloria Soberón y al Dr. José Antonio Martínez por sus valiosas observaciones en el documento y su participación en el jurado.

A los investigadores y compañeros de la Planta Piloto 4 por todo lo que aprendí de ellos y los momentos gratos que pasé en esta etapa. Particularmente agradezco al Dr. Ernesto Favela por la asesoría y apertura a compartir su gran experiencia y conocimientos, a la M. en C. Alejandra Pichardo por su apoyo al inicio del proyecto y al Dr. Fernando Méndez por compartirme su conocimiento en cultivo en medio sólido y sus valiosos comentarios.

A mis compañeros de Polioles por el apoyo en los análisis y sus observaciones tan enriquecedoras. Ha sido un gusto colaborar con ustedes. Sin duda mi estancia en la empresa ha sido de las etapas más importantes de mi vida profesional y personal.

Agradezco al Mtro. Atilano Gutiérrez y a la Biol. Mónica Rincón por los espectros de RMN y masas.

A Gloria Domínguez por sus consejos, su apoyo, los ánimos y por la experiencia de aprender juntos tantas cosas. Conocerle ha sido el regalo más bello que me dio la UAM.

A mis padres, que siempre han estado a mi lado. No me alcanzan las palabras para expresar todo lo que les agradezco. Gracias a su apoyo he podido alcanzar esta nueva meta, y este logro también es de ustedes. Siempre los tengo presentes en cada paso.

Resumen

Los soforolípidos son moléculas tensoactivas producidas por *Starmerella bombicola* y otros microorganismos emparentados. La notable actividad surfactante de estas sustancias naturales es de gran interés debido a su uso potencial en diversas aplicaciones de la vida diaria en donde actualmente los surfactantes sintéticos y semisintéticos son los protagonistas, ofreciendo una alternativa más amigable con el ambiente, además de provenir de fuentes renovables.

En este trabajo se explora la producción de soforolípidos en cultivo en medio sólido (CMS); un proceso diferente al habitual cultivo en medio líquido (CML), ampliamente extendido en la industria y en la academia. Ambos difieren en la cantidad de agua presente en el sistema, lo cual tiene notables repercusiones en el proceso y posiblemente en el microorganismo, ya que las condiciones del CMS se asemejan más a las que éste enfrenta en su hábitat natural.

En la primera etapa de este trabajo se estudió la producción de los soforolípidos por *Starmerella bombicola* en CMS utilizando columnas de vidrio como biorreactores. El soporte elegido para este fin fue el aserrín de madera de pino, un residuo de la industria maderera de bajo costo, gran retención de humedad y resistencia mecánica. En esta misma etapa, se obtuvieron los datos necesarios para caracterizar la cinética de producción del biosurfactante, así como el consumo de los sustratos. La producción de soforolípidos promedio fue de 0.198 g gms^{-1} , con un rendimiento respecto a las fuentes de carbono de $0.465 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$. El crecimiento microbiano se siguió mediante el monitoreo de la producción de CO_2 con un metabolímetro acoplado al sistema y los datos fueron ajustados a un modelo de crecimiento logístico. Con fines de comparación en términos cinéticos, de rendimiento, productividad y composición del producto, se llevaron a cabo experimentos de CML en matraces Erlenmeyer, obteniéndose un rendimiento de $0.239 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$. De igual manera se realizaron los ajustes con el mismo modelo matemático.

En una segunda etapa se caracterizaron los productos de ambas fermentaciones, midiendo su efecto en la reducción de la tensión superficial del agua con ayuda de un tensiómetro con el método del anillo de Du Noüy. También se compararon mediante cromatografía líquida en fase reversa RP-HPLC, observándose ligeras diferencias en cuanto a su composición, pero con al menos un producto mayoritario en común. Mediante cromatografía preparativa en columna fue posible purificar esta sustancia, la cual fue caracterizada mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR/ATR), espectrometría de masas (ESI-ToF) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), de esta forma fue posible elucidar su estructura molecular y determinar que se trata de un sofrolípido lactónico diacetilado.

Abstract

Sophorolipids are tensoactive molecules produced by *Starmerella bombicola* and other related microorganisms. The remarkable surface activity shown by those natural substances has great interest due their potential use on a wide variety of daily life applications where currently the synthetic and semi synthetic surfactants are protagonists, offering an ecofriendly alternative that comes from renewable sources.

In this work the sophorolipids production through Solid State Fermentation (SSF) is explored, as an alternative to conventional Submerged Fermentation (SF) widely used in industry and academy. Both differ in the water content of the system, which has important repercussions in the process and possibly on the microorganism because conditions of SSF mimics its natural environment.

The first part of this work was focused on production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* in glass columns as bioreactors. Pine sawdust was used as support for the culture. This by-product of the wood industry is a low cost option that has good water retention and mechanical resistance. In this stage of the study the required data for kinetic characterization for biosurfactant production and substrate

consumption was obtained. The average sophorolipids production was 0.198 g gms^{-1} , with a yield of $0.465 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$ considering the carbon sources. The microbial growth was followed by CO_2 production and this data was used to fit a mathematical model. Furthermore, submerged fermentation experiments were made using Erlenmeyer flasks as bioreactors. Data from those systems (kinetics, product yield and composition) were used for a comparison with SSF. For submerged fermentation the yield, considering only carbon sources, was $0.239 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$.

The second part of this work was focused on chemical and physicochemical characterization of products from both fermentation systems. The surface tension of aqueous solutions of crude sophorolipids was measured by Du Noüy ring method. Also, chromatographic analysis was made by RP-HPLC/ELSD/PDA noticing differences between SSF and SF product composition. Preparative chromatography was used for purifying the main substance present in crude sophorolipids. This substance was analyzed by infrared spectroscopy (FTIR), mass spectrometry (ESI-ToF) and nuclear magnetic resonance (NMR - ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC-). Using this information the substance was identified as a lactonic diacetylated sophorolipid and its structure was elucidated.

Contenido

Resumen	vi
Abstract.....	vii
Índice de tablas	xi
Índice de figuras	xii
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	1
2.1. Los surfactantes: características y clasificación	1
2.1.1. Actividad superficial	2
2.1.2. Concentración micelar crítica	3
2.1.3. Clasificación de los surfactantes	3
2.1.4. Impacto ambiental de los surfactantes	4
2.2. Los biosurfactantes: características y clasificación	5
2.2.1. Clasificación de los biosurfactantes	6
2.2.2. Glicolípidos	7
2.2.3. Lipopéptidos	8
2.2.4. Bioemulsificantes	9
2.3. Soforolípidos	9
2.3.1. Biosíntesis de soforolípidos en <i>Starmerella bombicola</i>	12
2.3.2. Aplicaciones de los soforolípidos.....	15
2.4. Producción de soforolípidos con <i>Starmerella bombicola</i> en cultivo en medio sólido y medio líquido	18
3. Justificación	23
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. Materiales y métodos.....	27
6.1. Microorganismo	27
6.2. Conservación de la cepa	27
6.2.1. A corto plazo.....	27
6.2.2. A mediano plazo.....	27
6.3. Medios de cultivo	27

6.3.1.	Medio para la producción de inóculo	27
6.3.2.	Medio para cultivo sólido	28
6.3.3.	Medio para cultivo líquido.....	28
6.4.	Producción de soforolípidos en CMS	29
6.5.	Producción de soforolípidos en CML	30
6.6.	Recuperación de los soforolípidos a nivel laboratorio	30
6.7.	Cuantificación de biomasa.....	31
6.8.	Purificación de los soforolípidos.....	32
6.9.	Métodos analíticos	33
6.9.1.	Cuantificación de soforolípidos y lípidos residuales	33
6.9.2.	Cuantificación de glucosa	33
6.9.3.	Medición de pH en los cultivos	34
6.9.4.	Monitoreo de la producción de CO ₂ y consumo de O ₂	34
6.9.5.	Resonancia magnética nuclear	34
6.9.6.	Espectrometría de masas	35
6.9.7.	Análisis infrarrojo FTIR.....	35
6.9.8.	Humedad	35
6.9.9.	HPLC	36
6.9.10.	Cromatografía en capa fina	36
6.9.11.	Tensión superficial.....	36
6.9.12.	Análisis termogravimétrico.....	37
6.10.	Análisis estadístico.....	37
6.10.1.	Ajuste de modelos matemáticos a las cinéticas de crecimiento, producción y consumo	37
7.	Resultados.....	38
7.1.	Estudio del cultivo de <i>Starmerella bombicola</i> para la producción de inóculo	38
7.2.	Cultivo en medio sólido (CMS)	39
7.3.	Cultivo en medio líquido (CML)	50
7.4.	Purificación a partir de la mezcla cruda obtenida del CMS.....	60
7.5.	Caracterización del soforolípidos purificado	63
7.5.1.	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	63
7.5.2.	Espectrometría de masas	65
7.5.3.	Resonancia magnética nuclear	66

7.5.4.	Análisis termogravimétrico.....	78
8.	Conclusiones	79
9.	Perspectivas	80
10.	Referencias.....	83
11.	Anexo	92
11.1.	Curva de calibración de glucosa, 505 nm, método enzimático GOD-POD	92

Índice de tablas

<i>Tabla 2.1 Algunas aplicaciones de los soforolípidos</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 2.2 Resumen de estudios de producción de soforolípidos con <i>Starmerella bombicola</i> en medio líquido y sólido.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 8.1 Rendimiento en el CMS utilizando aserrín y agrolita.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 8.2 Factor de retención (R_f) para cada especie en la mezcla cruda, correspondiente a la primera línea de la figura 8-15.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 8.3 Factor de retención (R_f) para cada especie de las fracciones obtenidas con cromatografía preparativa.</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 8.4 Asignaciones del espectro de FTIR (ATR).</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 8.5 Señales del espectro 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3 + D_2O$, ppm).....</i>	<i>67</i>

Índice de figuras

Figura 2-1 Estructura del dodecil sulfato de sodio (parte hidrofóbica en amarillo e hidrofílica en azul), b) Representación de la estructura de una micela.	2
Figura 2-2 Tensión superficial en función de la concentración de surfactante. Tomado de Gecol (2006), p. 30.	3
Figura 2-3 Clasificación de los surfactantes según su grupo polar y ejemplos representativos.	4
Figura 2-4 Clasificación de los biosurfactantes de acuerdo con su peso molecular (Banat et al. 2010).	7
Figura 2-5 Ejemplos de glicolípidos. Derecha: α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil-3-hidrosidecanoil-3-hidrosidecanoato, ramnolípido característico de <i>P. aeruginosa</i> . Izquierda: Lípido de manosil eritritol típico de <i>Pseudozyma</i> sp. (n = 6, 8, 10 o 12). Tomado de Hausmann y Sylatk (2015), p.6 y 7	8
Figura 2-6 Representación de la Surfactina, biosurfactante producido por <i>Bacillus subtilis</i> . Tomado de Hausmann y Sildatk (2015).	8
Figura 2-7 RAG-1 emulsan de <i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 31012. Tomado de Hausmann y Sildatk (2015), p. 12	9
Figura 2-8 Número de publicaciones referentes a soforolípidos en los últimos 20 años.	10
Figura 2-9 Soforolípidos en forma lactónica a) y acídica b)	11
Figura 2-10 Cluster biosintético de los soforolípidos en <i>Starmerella bombicola</i> . Adaptado de Van Bogaert et al. (2013).	12
Figura 2-11 Biosíntesis de soforolípidos en <i>Starmerella bombicola</i> . Elaboración propia, basado en Van Bogaert et al. (2013)	14
Figura 2-12 Proceso de producción de soforolípidos. Elaboración propia.	19
Figura 6-1 Sistemas utilizados para el CMS.	29
Figura 7-1 Cinética de crecimiento de <i>S. bombicola</i> en medio YPD. (○) log (UFC/ml), (●) Peso seco g/l, (x) Densidad óptica a 600 nm.	39
Figura 7-2 Espectros de FTIR de los productos de fermentación del CMS de <i>S. bombicola</i> en aserrín (rojo) y agrolita (azul)	41
Figura 7-3 Resina recuperada (%) en cada extracción con acetato de etilo.	41
Figura 7-4 Espectro del extracto recuperado del aserrín, utilizando acetato de etilo como disolvente.	42
Figura 7-5 Molécula y espectro de FTIR/KBr (absorbancia) del ácido abiético. Obtenido de https://spectrabase.com/spectrum/U8oQ6NXqt . John Wiley & Sons.	43
Figura 7-6 Tasa de producción de CO ₂ del CMS de <i>S. bombicola</i> en aserrín con resina (negro) y sin resina (rojo).	44
Figura 7-7 Producción acumulada de CO ₂ del CMS de <i>S. bombicola</i> en aserrín con resina (negro) y sin resina (rojo).	44
Figura 7-8 Columnas de vidrio de 17 x 5 cm (333.8 mL) utilizadas como biorreactores en CMS	45
Figura 7-9 Cinéticas del CMS de <i>S. bombicola</i> . Se muestran las curvas de la producción de soforolípidos (●), el consumo de aceite (○), el consumo de glucosa (Δ) y la producción acumulada de CO ₂	46
Figura 7-10 Fracción de soforolípidos recuperados en seis muestras a diferentes tiempos, cada una de las tres extracciones aplicadas al material. Primera extracción (negro), segunda (gris) y tercera (blanco). Adaptado de Jiménez-Peñalver (2017).	48
Figura 7-11 Evolución del pH en el CMS de <i>S. bombicola</i>	49
Figura 7-12 Cinética del CML de <i>S. bombicola</i> . Se muestra: el crecimiento microbiano (x), producción de soforolípidos (●), consumo de aceite (▲) y consumo de glucosa (Δ)	50
Figura 7-13 Comparación de las cinéticas de producción de soforolípidos ajustadas con el modelo de Soto-Cruz et al. (2002) para CML (rojo) y CMS (azul). La línea sólida representa producción de soforolípidos y la punteada biomasa en CML y producción de CO ₂ en CMS.	53

Figura 7-14 Comparativo de rendimiento de cultivos en medio sólido (rojo) y medio líquido (azul) de la literatura y este trabajo. Los asteriscos indican la duración del proceso de cultivo: *240, **192, ***150 h, ****312 h.....	55
Figura 7-15 Comparación cromatográfica de los productos del CMS (rojo) [muestra]: 5 mg/mL, CML (negro) [muestra]: 5 mg/mL y el Soforolípido purificado y caracterizado en este trabajo (azul) [muestra]: 1.5 mg/mL. HPLC fase reversa, detector ELSD (30°C, ganancia: 6). Se indica como punto de referencia el soforolípido lactónico C18:1 diacetilado que se caracterizó en este trabajo.	56
Figura 7-16 Comparación cromatográfica de los productos del CMS (rojo) [muestra]: 5 mg/mL, CML (negro) [muestra]: 5 mg/mL y el Soforolípido purificado y caracterizado en este trabajo (azul) [muestra]: 1.5 mg/mL. HPLC fase reversa, detector PDA (210 nm). Se indica como punto de referencia el soforolípido lactónico diacetilado que se caracterizó en este trabajo.	57
Figura 7-17 Efecto del producto del CMS (rojo) y CML (negro), así como del soforolípido lactónico purificado (azul) en la tensión superficial del agua a 20°C mediante el método del anillo de Du Noüy. Se observa que el comportamiento es similar en los productos de CMS y CML. La TS con SL purificado únicamente se midió hasta las 100 ppm que estaba cerca del límite de solubilidad de este compuesto en agua.	59
Figura 7-18 Fracciones provenientes de la cromatografía preparativa analizadas con cromatografía en capa fina. En rojo se indica la especie a la que corresponde el spot, L indica lactónico y A ácido.	60
Figura 7-19 Comparación de la mezcla cruda (izquierda) con los soforolípidos semipurificados usando cromatografía preparativa (centro) y recristalizados (derecha)	62
Figura 7-20 Espectro de FTIR (ATR) del soforolípido purificado.....	64
Figura 7-21 Espectro de masas (ESI ToF) de la fracción purificada de soforolípido.....	66
Figura 7-22 Espectro de ¹ H del soforolípido purificado.....	69
Figura 7-23 Espectro de ¹³ C del soforolípido purificado.....	71
Figura 7-24 Espectro COSY. Muestra el acoplamiento de hidrógenos vecinos	73
Figura 7-25 Espectro HSQC. Muestra enlaces carbono-hidrógeno, distinguiendo entre -CH, -CH ₃ (amarillo) y -CH ₂ (azul).	75
Figura 7-26 Espectro HMBC. Muestra interacciones a dos y tres enlaces.....	77
Figura 7-27 Análisis termogravimétrico del soforolípido lactónico diacetilado C18:1	78
Figura 9-1 Extracción sólido-líquido (lixiviación) a contracorriente. Las letras A,B y C indican etapas sucesivas de extracción. Los números indican los procesos de extracción que se llevan a cabo en paralelo. S: solvente fresco.	81
Figura 11-1 Curva de calibración de glucosa, 505 nm, método enzimático GOD-POD	92

Abreviaciones

ATR: Attenuated Total Reflection

COSY: Correlated Spectroscopy

CMC: Concentración micelar crítica

CML: Cultivo en medio líquido

CMS: Cultivo en medio sólido

FTIR: Fourier Transform Infrared

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

PM: Peso molecular

RMN: Resonancia magnética nuclear

TGA: Thermogravimetric Analysis

TLC: Thin-Layer Chromatography

UFC: Unidades formadoras de colonias

$g_p g_s^{-1}$: gramo de producto por gramo de sustrato (rendimiento)

$mgCO_2 gms^{-1}$: miligramo de dióxido de carbono por gramo de materia seca

1. Introducción

Los surfactantes son compuestos químicos ampliamente utilizados en la vida diaria, su demanda está en constante crecimiento y las aplicaciones en donde hallan lugar van desde la higiene personal, el cuidado del hogar hasta la industria alimentaria y farmacéutica, por lo que su presencia en el medio ambiente y el contacto con el ser humano son hechos inevitables. Sin embargo, muchas de estas sustancias, en su mayoría derivadas del petróleo, no son fácilmente biodegradables y pueden ser tóxicas para los organismos en agua y suelos. Esto conlleva un fuerte impacto ambiental (Lechuga *et al.* 2016). Este efecto nocivo derivado del uso de ciertos surfactantes químicos urge a enfocarse en alternativas más respetuosas con el ambiente tal como los biosurfactantes.

Los biosurfactantes son sustancias que por su origen y composición representan una alternativa ambientalmente más amigable, ya que su biodegradabilidad y menor impacto a la flora y fauna han sido estudiados y confirmados (Freitas *et al.* 2016; Singh *et al.* 2018; Vieira-Santos *et al.* 2019). Al provenir de fuentes renovables los biosurfactantes son una opción sustentable a los productos derivados del petróleo. Su diversidad estructural aumenta sus posibles aplicaciones: se ha implementado o propuesto su uso en biorremediación, industria alimentaria, cosmética, de limpieza e incluso farmacéutica. Otro punto para tomar en cuenta es que permiten la valorización de subproductos agroindustriales que pueden usarse como materia prima para su producción (Das y Kumar 2018; Jadhav *et al.* 2019; Maass *et al.* 2015).

Los soforolípidos son biosurfactantes comúnmente producidos por la levadura *Starmerella bombicola*. No hay evidencia que indique que esta levadura pudiera ser patógena para el ser humano y al ofrecer la posibilidad de alcanzar altas productividades y rendimientos posiciona a los soforolípidos como uno de los biosurfactantes más prometedores a nivel comercial (Wang *et al.* 2019; Jiménez-Peñalver 2017).

El cultivo en medio sólido (CMS) y el cultivo en medio líquido (CML) son dos sistemas que permiten el crecimiento de *S. bombicola* y la producción de soforolípidos, siendo el CML el más estudiado. Aunque ambas técnicas de cultivo utilicen el mismo microorganismo y los mismos sustratos, los resultados pueden ser significativamente distintos debido a las importantes diferencias inherentes a cada una (Banat *et al.* 2021).

El contenido de este trabajo incluye, en el capítulo 2, una revisión bibliográfica que comienza tocando de manera general los conceptos principales relativos a los surfactantes, lo cual es de utilidad para ahondar más adelante en tema de los biosurfactantes y finalmente abordar a los soforolípidos, desde su origen hasta sus aplicaciones. Los capítulos 3, 4 y 5 pertenecen a la justificación, hipótesis y objetivos, respectivamente, mientras que en el capítulo 6 se describe a detalle la metodología empleada en el desarrollo del trabajo experimental. Los resultados se encuentran en el capítulo 7 y pueden ser divididos en dos etapas principales: en la primera (secciones 7.1 a 7.3) se expone y analiza la producción de soforolípidos por *Starmerella bombicola* ATCC 22214 de la *American Type Culture Collection* en CMS utilizando aserrín como soporte. También incluye un experimento de producción de soforolípidos en CML para poder comparar con el CMS a partir de las cinéticas, los rendimientos y la caracterización de los productos obtenidos, analizando su composición por medio de espectroscopía de infrarrojo (FTIR/ATR), HPLC-PDA/ELSD y el efecto en la tensión superficial del agua. Las cinéticas de producción y consumo, en ambos casos, fueron ajustadas al modelo logístico, para usarse como herramienta en la comparación. En la segunda etapa (secciones 7.4 y 7.5) se llevó a cabo la purificación de uno de los soforolípidos provenientes del CMS y se elucidó la estructura de dicho compuesto con ayuda de técnicas espectroscópicas, principalmente resonancia magnética nuclear. Finalmente, en los capítulos 8 y 9 se presentan las conclusiones generales y las perspectivas.

2. Revisión bibliográfica

En este capítulo se presenta una revisión bibliográfica que trata de forma sucinta los temas esenciales que respectan a los surfactantes, tal como sus propiedades fisicoquímicas y su clasificación por origen. Posteriormente, se hace énfasis en los biosurfactantes y se ofrecen detalles importantes, como su clasificación por estructura molecular y el origen microbiano. Finalmente se trata a fondo el tema de los soforolípidos, desde su biosíntesis en *Starmerella bombicola* hasta sus aplicaciones actuales y potenciales.

2.1. Los surfactantes: características y clasificación

Un surfactante es un compuesto químico cuya estructura molecular consta de una parte polar y una no polar. La parte polar, también llamada hidrofílica, muestra una fuerte afinidad a sustancias polares como el agua, mientras que su parte no polar, también llamada hidrofóbica, muestra afinidad a medios no polares tales como las grasas y aceites (Karsa 2006; Cullum 1994).

En una solución las moléculas del surfactante se alinean en las superficies e interfaces, es decir, en los límites gas-líquido, líquido-líquido y sólido-líquido en las paredes del recipiente y sólidos presentes, en donde forman capas de manera que la interacción de sus partes hidrofóbicas y el medio polar sea la mínima posible. Esta característica dota a los surfactantes de actividad superficial, son capaces de disminuir la tensión superficial e interfacial del medio en el que se encuentran disueltos, además de dar pie a la detergencia, la actividad emulsificante, la formación de espuma y el efecto dispersor, en función de su balance hidrofílico / lipofílico. Otra manera de minimizar la interacción de las partes hidrofóbicas de los surfactantes y el agua es formar agregados en el seno de la solución con sus grupos hidrofílicos orientados a la fase acuosa, dichos agregados, que pueden tener diversas formas (esférica, cilíndrica o laminar) se llaman micelas (Gecol 2006; Karsa

2006; Schramm *et al.* 2003; Cullum 1994). Los surfactantes también son conocidos como tensoactivos y ténsidos.

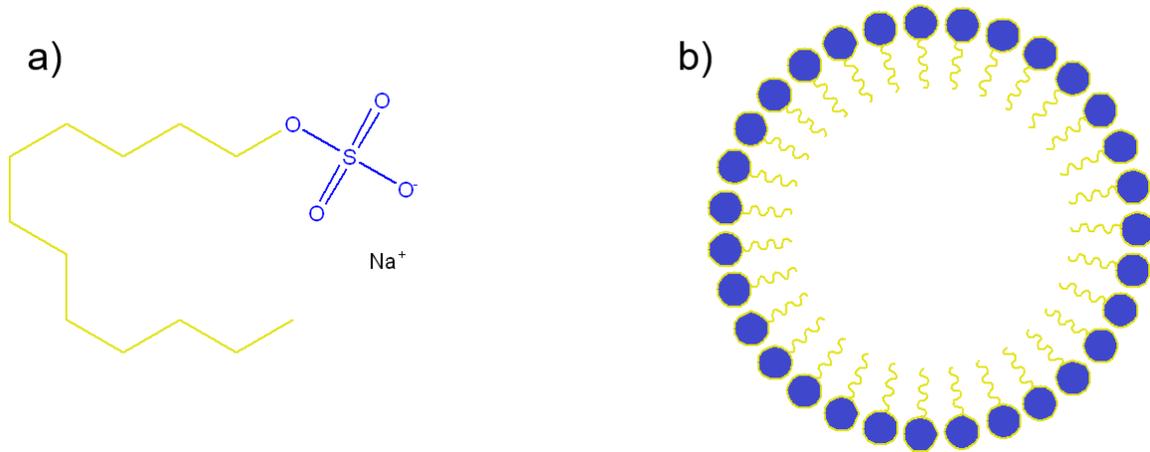


Figura 2-1 Estructura del dodecil sulfato de sodio (parte hidrofóbica en amarillo e hidrofílica en azul), b) Representación de la estructura de una micela.

2.1.1. Actividad superficial

La actividad superficial se debe a que las moléculas del surfactante se intercalan entre las moléculas de la capa límite (superficie o interfase), disminuyendo las fuerzas cohesivas y provocando que la tensión superficial disminuya. La tensión superficial (expresada como mN m^{-1} o dina cm^{-1}) es una propiedad termodinámica definida como el exceso de energía libre por unidad de área superficial y se debe a la diferencia entre las fuerzas que actúan en las moléculas del seno del fluido y las que se encuentran en la superficie. Las fuerzas que actúan sobre las moléculas que están en el seno de un fluido son uniformes en toda dirección, al contrario de lo que sucede con las de la superficie, por lo que la fuerza neta en estas últimas no es cero. La tensión superficial puede medirse con métodos como el del anillo de Du Noüy o el del plato de Wilhelmy. Un ejemplo de actividad superficial es el de la surfactina, un lipopéptido que en solución acuosa 0.005% w/w a 20°C disminuye la tensión superficial del agua de 72.8 a 27 mN m^{-1} .

2.1.2. Concentración micelar crítica

A concentraciones bajas el surfactante se adsorberá a las superficies e interfaces gradualmente, disminuyendo la tensión superficial e interfacial de manera continua, conforme la concentración aumenta. Sin embargo, la adsorción se detendrá al llegar a la saturación, donde no será posible que aumente la cantidad de moléculas de surfactante en las superficies e interfaces y la tensión cesará de reducirse. En este punto el surfactante adicional comenzará a agregarse en micelas. A esto se le llama concentración micelar crítica (CMC).

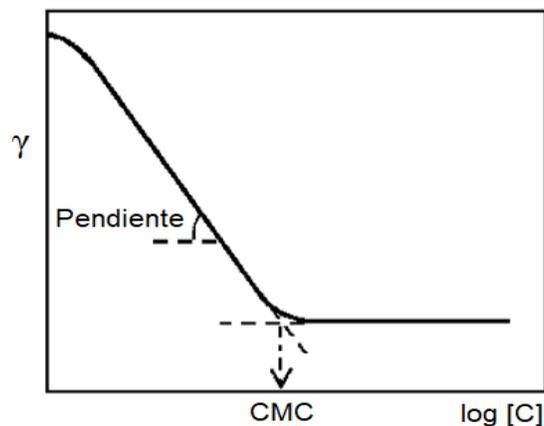


Figura 2-2 Tensión superficial en función de la concentración de surfactante. Tomado de Gecol (2006), p. 30.

2.1.3. Clasificación de los surfactantes

Los surfactantes químicos se pueden clasificar según las características de su parte polar, la cual puede ser o no iónica. Los iónicos se subdividen en aniónicos, catiónicos y anfotéricos (*zwitterionicos*) (Karsa 2006). Las partes hidrofóbicas también pueden constituirse por una gran variedad de estructuras químicas, por ejemplo, alquilbencenos, cadenas alifáticas lineales o ramificadas y polisiloxanos.

2.2. Los biosurfactantes: características y clasificación

Los biosurfactantes son sustancias tensoactivas producidas por algunas especies de microorganismos. Estos compuestos tienen el propósito de facilitar la adaptación del microorganismo a su entorno. Se reporta que su principal utilidad podría ser incrementar la solubilidad y disponibilidad de distintos sustratos no miscibles en agua, además de otras funciones tales como auxiliar en la movilidad o actuar como microbicidas para eliminar competidores (Chrzanowski *et al.* 2012; Hausmann y Syldatk 2015; Jeziarska *et al.* 2018). Están clasificados principalmente por su estructura química y su origen microbiano (Banat *et al.* 2010). Una de sus partes es hidrofílica, y puede tratarse de un mono-, di-, o polisacárido o péptidos. La otra parte corresponde a una estructura hidrofóbica, por ejemplo, una cadena alifática de un ácido graso. Estas estructuras les confieren una amplia variedad de propiedades, incluyendo la habilidad de disminuir la tensión superficial e interfacial en líquidos o formar micelas y emulsiones (Banat *et al.* 2010). Algunos de los géneros de microorganismos comúnmente asociados a la producción de biosurfactantes son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Candida* (Oliveira *et al.* 2015; Shenkar *et al.* 2015; Luna *et al.* 2016; Varjani y Upasani 2017).

Los primeros trabajos sobre biosurfactantes, que aparecieron desde finales de la década de los 60, en su mayoría se enfocaban en las propiedades, biosíntesis y química de estas sustancias, posteriormente comenzó a realizarse investigación en torno a las posibles aplicaciones comerciales, la producción y genética de los microorganismos (Desai y Banat 1997). En la actualidad también se investigan estrategias para poder desarrollar procesos más eficientes y menos costosos que logren consolidar y diversificar las aplicaciones de los biosurfactantes en el mercado (Singh *et al.* 2018), tales como el cultivo en medio sólido (Jiménez-Peñalver *et al.* 2018); el uso de materias primas baratas y accesibles, como residuos de la industria agroalimentaria, entre los que se puede mencionar a los desechos de la refinación o extracción de aceites vegetales (Das y Kumar 2018; Jadhav *et al.* 2019; Maass *et al.* 2015); la modificación genética de las cepas (Van Bogaert *et al.* 2016); la optimización del medio de cultivo con adición diversas sustancias, por ejemplo

nanopartículas de Fe y Fe-sílice (Kiran *et al.* 2014; Sahebnazar *et al.* 2018); y coproducción con otra sustancia de importancia económica, como enzimas lipasas y pectinasas (Colla *et al.* 2010; Kavuthodi *et al.* 2015).

Los biosurfactantes presentan ventajas sobre sus contrapartes sintéticos, como una menor toxicidad y mayor biodegradabilidad (Singh *et al.* 2018) lo cual los hace buenos candidatos para su uso en la agricultura (Sachdev y Cameotra 2013), la industria alimentaria (Nitschke y Silva 2018), remediación de suelo y agua (Ashraf *et al.* 2017; Mahanti *et al.* 2017; Mulligan 2017), recuperación del petróleo (Geetha *et al.* 2018), la industria cosmética (Bezerra *et al.* 2018), o como detergentes y limpiadores (Kourmentza *et al.* 2017). También pueden mencionarse sus efectos antibióticos y bioactivos, así como su gran diversidad estructural (Hausmann y Syldatk 2015).

El interés por los biosurfactantes en los últimos años se ha visto reflejado en la industria, creándose y comercializándose nuevos productos que los incluyen en sus formulaciones. Entre las compañías que destacan en el pequeño mercado de los biosurfactantes se encuentran Croda (Reino Unido), Evonik Industries (Alemania), Biotensidon (Alemania), Ecover (Bélgica), Jeneil Biotech (Estados Unidos), Saraya (Japón), AGAE Technologies (Estados Unidos) y Holiferm (Inglaterra).

2.2.1. Clasificación de los biosurfactantes

A diferencia de los surfactantes de origen sintético, que son clasificados de acuerdo con la naturaleza de su extremo polar, los biosurfactantes principalmente se agrupan según su origen microbiano y su estructura molecular. De forma general también se pueden clasificar como biosurfactantes de bajo peso y de alto peso molecular (Banat *et al.* 2010), como se muestra en la Figura 2-4. Los primeros se caracterizan por su efecto tensoactivo al reducir la tensión superficial e interfacial, los segundos no tienen una actividad superficial tan importante, pero se destacan por su eficiencia emulsionante, por lo que también son llamados bioemulsificantes. Los principales subgrupos de biosurfactantes de bajo peso molecular son los

glicolípidos y los lipopéptidos; de alto peso molecular, los bioemulsificantes, que engloban moléculas poliméricas tales como lipopolisacáridos y lipoproteínas (Desai y Banat 1997; Banat *et al.* 2010; Hausmann y Syldatk 2015).

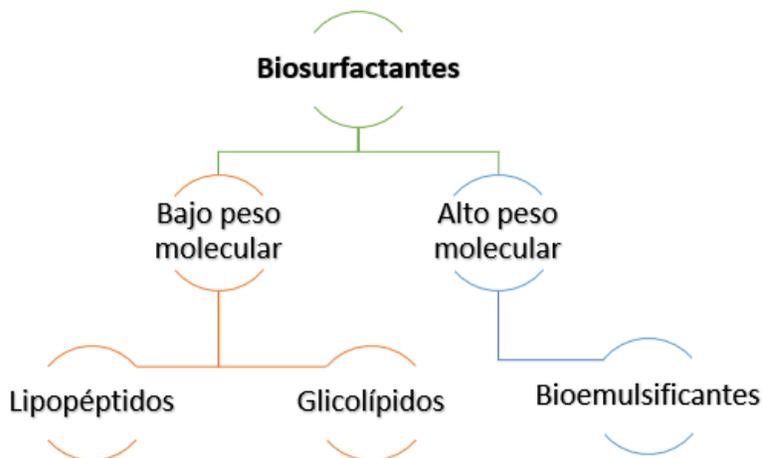


Figura 2-4 Clasificación de los biosurfactantes de acuerdo con su peso molecular (Banat *et al.* 2010).

2.2.2. Glicolípidos

Los glicolípidos son los biosurfactantes de mayor importancia comercial, así como los más estudiados (Jeziarska *et al.* 2018). Se trata de compuestos de bajo peso molecular, cuya parte hidrofílica puede ser glucosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico o ramnosa. La parte lipídica puede estar constituida por ácidos o alcoholes grasos. Entre los glicolípidos más estudiados se puede mencionar a los soforolípidos, los ramnolípidos, los lípidos de trehalosa, y los lípidos de manosileritritol (Banat *et al.* 2010; Hausmann y Syldatk 2015). Los ramnolípidos son producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Soberón-Chávez *et al.*, 2021) y el resto de los que se mencionan son producidos por diversas especies de levaduras.



Figura 2-5 Ejemplos de glicolípidos. Derecha: α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato, ramnolípido característico de *P. aeruginosa*. Izquierda: Lípido de manosil eritritol típico de *Pseudozyma sp.* ($n = 6, 8, 10$ o 12). Tomado de Hausmann y Syltatk (2015), p.6 y 7

2.2.3. Lipopéptidos

Estos compuestos microbianos con actividad superficial son producidos por una amplia variedad de bacterias y hongos, entre los que se destaca *Bacillus subtilis* productor de surfactina, iturina y fengicina. Por sus propiedades emulsificantes y desemulsificantes encuentran posible aplicación en la industria alimentaria y cosmética; también en la biorremediación gracias a que logran solubilizar hidrocarburos. Su capacidad de desestabilizar membranas biológicas los hace potenciales candidatos para aplicaciones antimicrobianas y antivirales.

Su estructura consta de ácidos grasos como parte hidrofóbica y péptidos como parte hidrofílica. Se clasifican en tres familias dependiendo de la secuencia de aminoácidos, las antes mencionadas surfactinas, iturinas y fengicinas. El lipopéptido más conocido es la surfactina (Mnif y Ghribi 2015; Hausmann y Sildtak 2015). Esta sustancia es capaz de reducir la tensión superficial del agua, a 20°C, de 72.8 hasta 27 mN/m a una concentración tan baja como 0.005% w/w (Mnif y Ghribi 2015; Hausmann y Sildtak 2015).

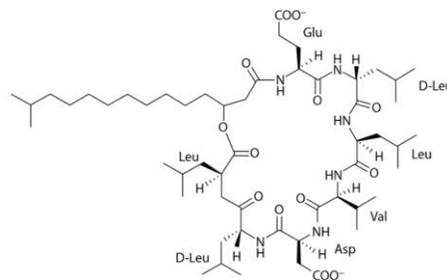


Figura 2-6 Representación de la Surfactina, biosurfactante producido por *Bacillus subtilis*. Tomado de Hausmann y Sildtak (2015).

2.2.4. Bioemulsificantes

Los bioemulsificantes son mezclas complejas de heteropolisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas. También se conocen como biopolímeros de alto peso molecular. Estas sustancias no son tan efectivas como los biosurfactantes para reducir la tensión superficial, sin embargo, son eficientes para emulsificar dos líquidos inmiscibles y estabilizar las emulsiones en sistemas o/w (*oil in water*). Su capacidad de formar emulsiones estables se atribuye al gran número de grupos polares expuestos en sus estructuras (Banat *et al.* 2010; Uzoigwe *et al.* 2015).

El emulsan es uno de los biosurfactantes más estudiados, se trata de un lipopolisacárido con un peso molecular aproximadamente de 1000 kDa, producido por *Acinetobacter calcoaceticus*, que muestra actividad emulsionante a concentraciones tan bajas como 0.01 – 0.001% w/w. Fue el primer bioemulsificante que estuvo disponible comercialmente (Banat *et al.* 2010; Uzoigwe *et al.* 2015).

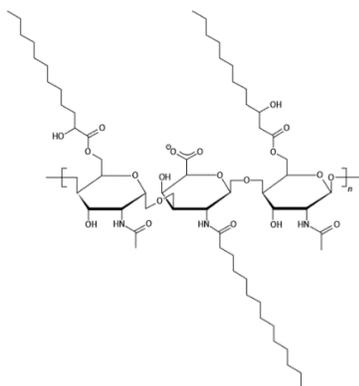


Figura 2-7 RAG-1 emulsan de *Acinetobacter* sp. ATCC 31012. Tomado de Hausmann y Sildatk (2015), p.12

2.3. Soforolípidos

Se trata de uno de los biosurfactantes más ampliamente estudiados y además el principal en cuanto a producción a escala industrial. Este tipo de glicolípidos es comercializado por compañías como Soliance® (Francia), Ecover® (Francia) y

Evonik® (Alemania). Comúnmente se asocian a la levadura *Starmerella bombicola*, aunque también son generados por otros organismos como *Candida apicola* o *Rhodotorula bogoriensis*.

El interés en estos biosurfactantes ha crecido en la última década, la búsqueda de la palabra *sophorolipids* en *Web of Science* (consultado el 20/08/2021) arroja un total de 471 publicaciones en el lapso que comprende del año 2000 al 2021 de los cuales 374, cerca del 80%, aparecieron en los últimos diez años.

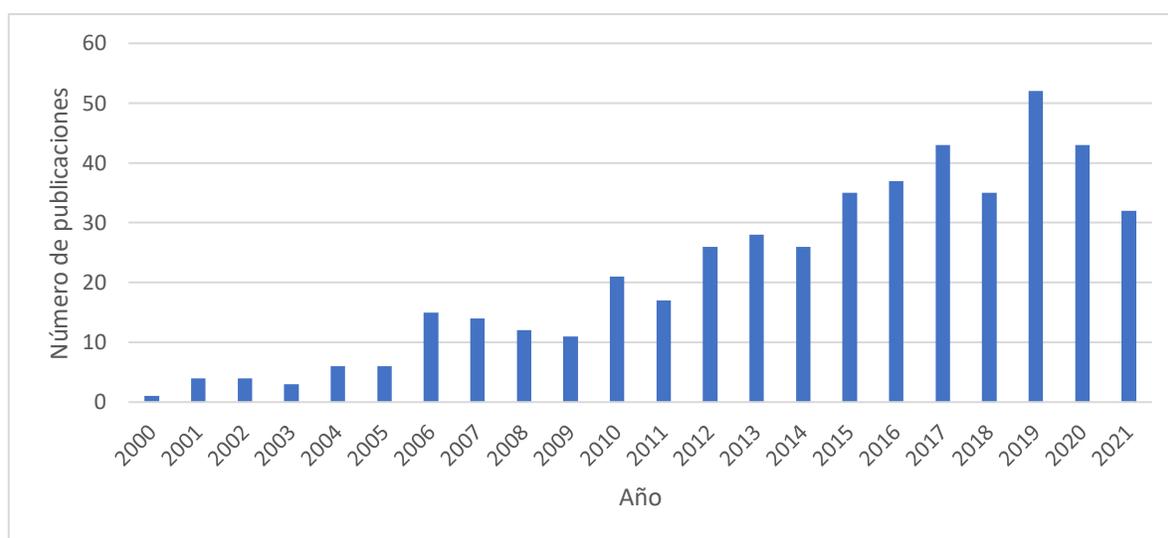


Figura 2-8 Número de publicaciones referentes a sofrolípidos en los últimos 20 años

Los sofrolípidos están formados por un disacárido constituido por dos unidades de glucosa enlazadas β -(1,2), llamado sofrosa, y una cadena lipofílica proveniente de un ácido graso de 18 o 16 carbonos que puede o no estar insaturado, típicamente un ácido 17-L-hidroxi-octadec-9-enoico unido a la sofrosa mediante un enlace glicosídico. Pueden presentarse en dos conformaciones distintas: lactónica y acídica, esto es debido a la cadena del ácido graso que puede o no enlazarse con el oxígeno del carbono 4'' de la sofrosa formando así un anillo lactónico (Hausmann y Syldatk 2015), ambas conformaciones se muestran en la Figura 2-9. La capacidad de formación de espuma, el efecto en la tensión superficial y los efectos antimicrobianos están fuertemente influenciados por esta característica. Los

soforolípidos lactónicos disminuyen más la tensión superficial y tienen mayor actividad antimicrobiana, mientras que los acídicos tienen mayor capacidad de formación de espuma y son más solubles en agua (Van Bogaert *et al.* 2007; Elshafie *et al.* 2015).

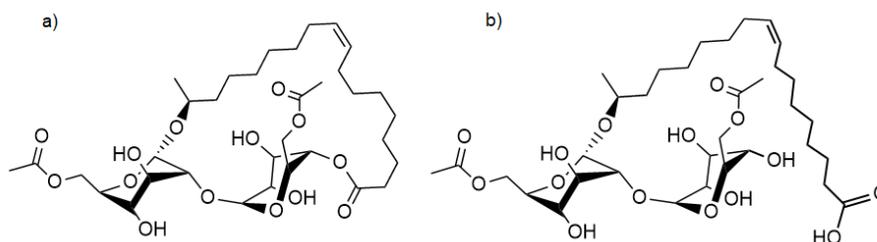


Figura 2-9 Soforolípidos en forma lactónica a) y acídica b)

Los soforolípidos fueron descritos por primera vez en la década de los sesenta. En 1961 Gorin *et al.* aislaron glicolípidos producidos por una levadura que inicialmente identificaron como *Torulopsis magnoliae*, la cual fue aislada de una flor de una planta del género *Sonchus*. Sin embargo, tiempo después los autores rectificaron la identidad del microorganismo confirmando que se trataba de *Torulopsis apicola*, actualmente llamada *Candida apicola*. Los componentes mayoritarios de esta mezcla de glicolípidos fueron unidades de 2-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranosas, parcialmente acetiladas, con enlaces β -glicosídicos a ácido 17-L-hidroxi- Δ 9-octadecenoico y a ácido 17-L-hidroxi-octadecanoico, es decir soforolípidos acetilados de cadenas hidrofóbicas de 18 carbonos con o sin insaturaciones. En 1970, Spencer *et al.* describen por primera vez a una levadura que identifican como *Torulopsis bombicola* la cual, afirmaron, producía soforolípidos. La clasificación de esta levadura más tarde cambiaría para llamarse *Candida bombicola* y posteriormente a *Starmerella bombicola*.

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas se puede mencionar su efecto tensoactivo: cuando se encuentran en solución acuosa los soforolípidos reducen la tensión superficial del agua de 72.8 hasta 40 – 30 mN/m, con una concentración micelar crítica de 40 – 100 mg/l. El balance lipofílico-hidrofílico (HLB) se encuentra

entre 10 y 13, lo que hace a los soforolípidos potencialmente útiles como detergentes y estabilizadores de emulsiones aceite en agua (Van Bogaert *et al.* 2007).

2.3.1. Biosíntesis de soforolípidos en *Starmerella bombicola*

En el año 2013 fue secuenciado el genoma completo de *S. bombicola*, gracias a ello ese mismo año fue identificado el *cluster* biosintético de los soforolípidos (Van Bogaert *et al.* 2013) mostrado en la Figura 2-10, posteriormente, derivado de análisis proteómicos fue posible identificar a todas las enzimas involucradas en su biosíntesis. Para 2014 solo restaba localizar a una enzima, la responsable de la conversión de las formas lactónicas a acídicas. Finalmente, dicha enzima fue identificada por Ciesielska *et al.* (2014). De esta manera se completó el descubrimiento del proceso de biosíntesis de ese valioso metabolito. A partir de entonces aparecieron publicaciones que avanzaron hacia la optimización de la producción de soforolípidos o a la generación de soforolípidos modificados a partir de ingeniería genética, sobreexpresando o inhibiendo los genes involucrados (Roelants *et al.* 2016; Van Bogaert *et al.* 2016).

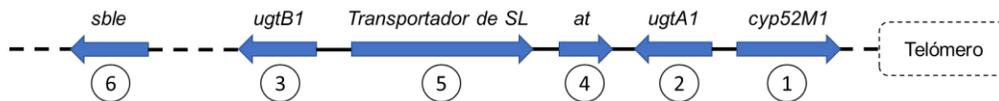
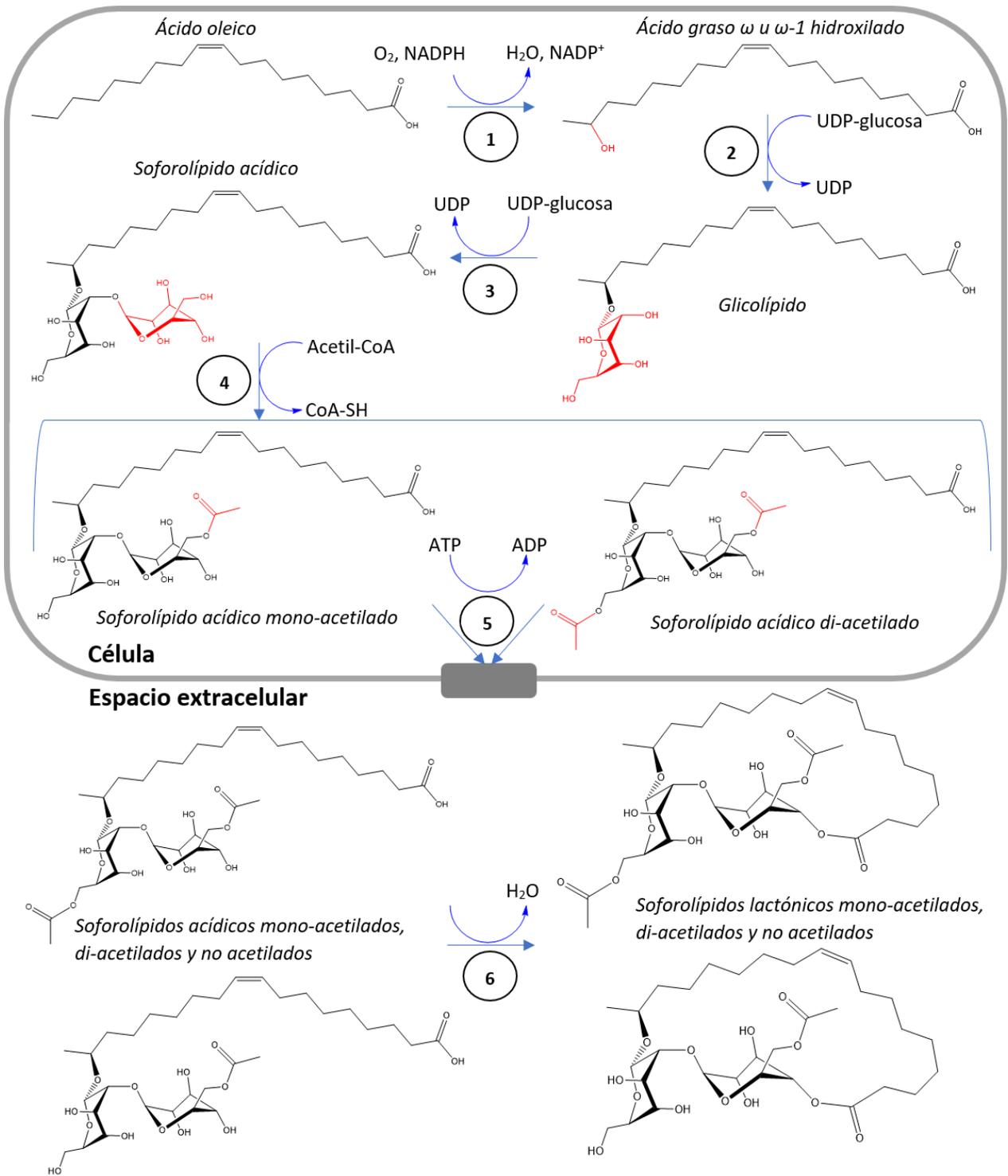


Figura 2-10 Cluster biosintético de los soforolípidos en *Starmerella bombicola*. Adaptado de Van Bogaert *et al.* (2013)

Las proteínas del *cluster* biosintético incluyen cinco enzimas y un transportador. La biosíntesis, Figura 2-11, inicia con la hidroxilación de un ácido graso catalizada por una monooxigenasa (*cyp52M1*). Posteriormente una glucosiltransferasa (*ugtA1*) cataliza la formación del enlace entre el ácido graso hidroxilado y una unidad de glucosa. El producto de la reacción anterior es utilizado como sustrato por una segunda glucosiltransferasa (*ugtB1*) que adiciona una segunda unidad de glucosa formando un soforolípidos. Posteriormente, una acetiltransferasa (*at*) cataliza la adición de acetilos al soforolípidos en las posiciones 6' y 6'', ya sea en ambas o solo en una de ellas. Los soforolípidos alcanzan el espacio extracelular gracias a un

transportador codificado en el *cluster*. Finalmente, la enzima lactona esterasa (*sble*) cataliza la esterificación intramolecular fuera de la célula, la lactonización, de los soforolípidos acídicos en un entorno acuoso. Esta reacción es inusual, debido a que en este ambiente la deshidratación no es favorable, esta característica podría otorgar un gran potencial a la enzima para su uso en aplicaciones en química verde (Waele *et al.* 2018).

Figura 2-11 Biosíntesis de soforolípidos en *Starmarella bombicola*. Elaboración propia, basado en Van Bogaert et al. (2013)



2.3.2. Aplicaciones de los soforolípidos

Actualmente existen formulaciones de diversos productos que incluyen soforolípidos como uno de sus componentes principales, entre estos se pueden mencionar algunos productos de limpieza y de uso cosmético, desarrollados por empresas principalmente europeas y estadounidenses. La empresa francesa Soliance, perteneciente a la suiza Givaudan, formula y comercializa productos a base de soforolípidos, entre los que se encuentra el agente antibacterial y de control de sebo Sopholiance® S. Su aplicación se enfoca en el control de las bacterias que producen el acné y el mal olor corporal, así como en la disminución del sebo en la piel. Otro ejemplo es el Rewoferm® SL de Evonik, un producto a base de soforolípidos el cual, según la compañía, cumple con los requerimientos de la OECD 301F y EN ISO 11734 en cuanto a biodegradabilidad en condiciones aerobias y anaerobias. También señalan que cumple con los estándares de la OECD 211 y 202 referente a ecotoxicidad. Su aplicación se enfoca en el cuidado del hogar para limpieza de superficies.

Existen diversos estudios publicados en los que se evalúa el desempeño de los biosurfactantes en una amplia gama de aplicaciones, de esta manera se han generado propuestas para su uso como sustitutos de surfactantes sintéticos o en nuevos productos con aplicaciones innovadoras:

Lydon *et al.* (2017) reportaron la actividad de los soforolípidos contra la formación de *biofilms* y como antibiótico en la curación de heridas. También probaron que no interfieren con la reparación de los tejidos en modelos animales. Esto apoya su posible aplicación como componentes en formulas terapéuticas enfocadas a la curación de heridas con infecciones crónicas o agudas.

Otra posible aplicación de estos biosurfactantes, en este caso en la agricultura, fue propuesta por Vaughn *et al.* (2014), quienes probaron los soforolípidos de *Starmerella bombicola* y *Candida kuoi* en una formulación de un herbicida, usándolos como emulsificantes y adyuvantes para la adhesión y la penetración del compuesto activo en los tejidos de las plantas. Los surfactantes utilizados para esta

aplicación son comúnmente las aminas polietoxiladas, cuya toxicidad en animales ha sido comprobada (Brausch y Smith 2007), por lo que es primordial sustituirlas con una opción más amigable con el ambiente como son los soforolípidos.

Farias *et al.* (2019) probaron la efectividad microbicida de tres biosurfactantes obtenidos de *Candida bombicola* (*S. bombicola*), *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* en una formulación de un enjuague bucal. Los microorganismos para los cuales se probaron las formulaciones fueron *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. acidophilus*, *S. salivarius* y *S. mutans*. Los resultados demostraron el potencial de los biosurfactantes en esta aplicación, ya que además de ser efectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos evaluados, se probó que presentan una menor citotoxicidad en comparación con un enjuague bucal comercial.

Entre las aplicaciones en la industria petroquímica se pueden mencionar estudios como el de Elshafie *et al.* (2015), que evaluaron el desempeño de los soforolípidos en la recuperación mejorada del petróleo. Es de destacar que el biosurfactante fue estable a condiciones de 13 – 15% de salinidad, un rango de pH de 2 a 12 y temperatura de hasta 100°C. Los soforolípidos redujeron la tensión superficial hasta $28.56 \pm 0.42 \text{ mN m}^{-1}$ y la interfacial hasta $2.13 \pm 0.09 \text{ mN m}^{-1}$, generaron emulsiones estables con petróleo crudo pesado y ligero, además de pentano, hexano, heptano y otros hidrocarburos. El potencial de los soforolípidos en la recuperación mejorada de petróleo se probó en experimentos de núcleo inundado, en donde se recuperó un 27.27% adicional de petróleo residual, lo que confirma el potencial de los soforolípidos para esta aplicación. Este resultado es similar al reportado por Bera *et al.* (2017) que lograron recuperar un 26% adicional usando Tergitol 15-S-12, un surfactante no iónico sintético; también se asemeja al resultado obtenido por Ko *et al.* (2014), que usando dodecil sulfato de sodio, un surfactante sintético aniónico, reportan una recuperación del 26.6 % de petróleo residual.

Algunas de las aplicaciones más atractivas se encuentran en el área ambiental. Freitas *et al.* (2016) estudiaron la viabilidad de la producción industrial y uso de los soforolípidos para tratar derrames de hidrocarburos en el mar. La acción dispersante favorece la rápida biodegradación del contaminante y disminuye sus impactos

inmediatos, tales como el bloqueo de la luz y de la transferencia gaseosa entre el agua y la atmósfera. Se evaluó la estabilidad de los soforolípidos libres de células, sin purificar. Se analizó también su capacidad dispersante, y se hizo una comparación con estimaciones de precios de venta de los soforolípidos y Corexit, un surfactante comúnmente usado en casos de derrame de hidrocarburos, en donde el precio final de los soforolípidos incluso resultaría ser más competitivo si se comercializa sin pasar por una etapa de purificación y optimizando el proceso de producción. Hay que recalcar que el costo inherente a la purificación eleva de forma notable el precio de venta, Elshafie *et al.* (2015) mencionan que los biosurfactantes podrían ser aplicados sin una excelente purificación en biorremediación y recuperación mejorada del petróleo, lo que reduciría el costo final y los haría una opción más atractiva.

Entre las posibles aplicaciones de los soforolípidos también se contempla su actividad anticancerosa que ha sido estudiada, entre otros, por Li *et al.* (2017) quienes hallaron que los soforolípidos lactónicos diacetilados provocan una disminución en la proliferación de células cervicales cancerígenas en estudios *in vitro* y actividad antitumoral induciendo apoptosis de células cancerígenas en estudios *in vivo* en ratones. Esta actividad contra células cancerosas también la estudiaron Ribeiro *et al.* (2015) que hallaron resultados similares en células mamarias en un estudio *in vitro*.

Tabla 2.1 Algunas aplicaciones de los soforolípidos

Área de aplicación	Microorganismo	Actividad	Aplicación	Referencia
Agricultura	<i>Starmerella bombicola</i> , <i>Candida kuoi</i>	Adyuvante para adhesión y penetración. Emulsificante.	Herbicida	Vaughn <i>et al.</i> 2014
Ambiental	<i>Starmerella bombicola</i>	Dispersante	Dispersante para derrames de hidrocarburos en el mar	Freitas <i>et al.</i> 2016
Biomédica	<i>Starmerella bombicola</i>	Antimicrobiana	Componente antimicrobiano en cremas para	Lydon <i>et al.</i> 2017

			prevenir infecciones durante la cicatrización de heridas	
Cosmética	<i>Starmerella bombicola</i>	Antimicrobiana	Enjuague bucal, en conjunto con quitosano y aceite esencial de menta	Farias <i>et al.</i> 2019
Petroquímica	<i>Starmerella bombicola</i>	Reductor de la tensión interfacial y superficial. Emulsificante.	Recuperación mejorada del petróleo	Elshafie <i>et al.</i> 2015

2.4. Producción de soforolípidos con *Starmerella bombicola* en cultivo en medio sólido y medio líquido

La mayoría de las publicaciones que describen la producción de soforolípidos por *Starmerella bombicola* se basan en sistemas líquidos y abordan temas como la optimización del medio de cultivo, el uso de desperdicios agroindustriales como sustratos o el uso de cepas de *S. bombicola* genéticamente modificadas. Los estudios en sistemas sólidos son relativamente recientes, apareciendo el primero de ellos en el año 2012, estos no son muy numerosos y se han enfocado principalmente en la utilización de residuos agroindustriales como sustratos. La Figura 2-12 resume el proceso de producción de soforolípidos ya sea en CMS o CML. En un primer paso se lleva a cabo el cultivo microbiano o fermentación y posteriormente se procede a recuperar los soforolípidos, separándolos del medio de cultivo, después de lo cual se puede realizar algún proceso de purificación para obtener cierto grado de pureza en función de los requerimientos de la aplicación final.

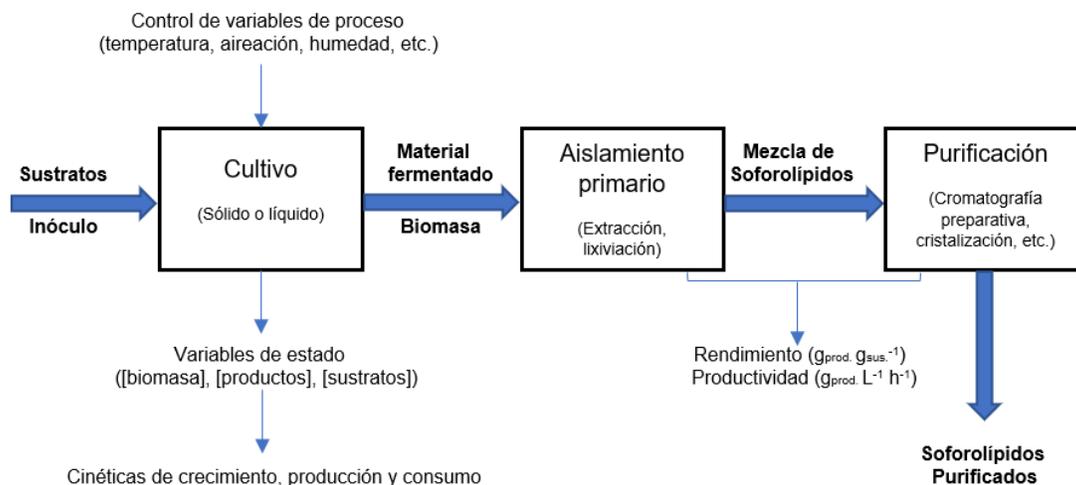


Figura 2-12 Proceso de producción de soforolípidos. Elaboración propia.

Existen dos publicaciones en las que se realizó a la par el proceso en los dos tipos de sistema, sin embargo, la comparación no es el objetivo principal de estos trabajos (Parekh *et al.*, 2012; Rashad *et al.*, 2014). En el primero el problema se centra en la obtención y uso de ácidos grasos de la semilla del mango para usarse como sustrato hidrófobo en la producción de soforolípidos. Los autores obtuvieron un rendimiento (g sustrato/g soforolípidos, $g\ g^{-1}$) de 0.17 en el caso de la fermentación en fase sólida, y 0.06 en el caso del cultivo en medio líquido. En el segundo, Rashad *et al.* (2014) estudiaron la producción de soforolípidos en medio sólido con *Starmerella bombicola*, utilizando aceite de soya y torta comprimida de semillas de girasol como fuentes lipídicas de carbono. Obtuvieron un rendimiento en el CMS de $0.22\ g\ g^{-1}$ al realizar la extracción con acetato de etilo, sin embargo, también probaron un nuevo método de extracción en dos pasos, utilizando en una primera extracción metanol y en una segunda acetato de etilo, de esta manera obtuvieron un rendimiento de $0.49\ g\ g^{-1}$. En el caso del CML con un medio de cultivo formulado con los mismos sustratos, los autores reportaron un rendimiento de $0.21\ g\ g^{-1}$.

Entre los estudios realizados en sistemas líquidos se pueden encontrar comparativos entre medios formulados con fuentes de carbono de alto costo (medios sintéticos que contienen fuentes de carbono como glucosa y ácido oleico) y de bajo costo (medios formulados con desechos agroindustriales como melaza,

suero de leche y residuos de aceites vegetales). En estos se comparan las fuentes baratas de carbono, frente a medios considerados estándar, de alto costo pero que han probado tener los mejores rendimientos. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Daverey y Pakshirajan (2009), quienes realizaron un estudio en el que utilizaron un medio de cultivo de bajo costo basado en melaza de caña de azúcar y tres tipos de aceite vegetal (soya, girasol y oliva), además de un medio formulado con glucosa, una fuente de carbono considerada de alto costo. Los experimentos se llevaron a cabo en medio líquido en matraces Erlenmeyer, y con una duración de cinco días. El rendimiento máximo entre los de bajo costo se obtuvo con melaza y aceite de soya, siendo de $23.25 \pm 1.07 \text{ g L}^{-1}$ (0.12 g g^{-1}), sin embargo, el rendimiento máximo global fue de $29.37 \pm 1.11 \text{ g L}^{-1}$ (0.14 g g^{-1}) y se obtuvo con el medio formulado con glucosa y aceite de soya. El proceso lo desarrollaron por lote, y al concluir sugieren que la producción de soforolípidos podría mejorar optimizando los parámetros del proceso y usando un cultivo tipo lote alimentado.

Al respecto de esta última conclusión, se puede citar como ejemplo de proceso de lote alimentado, *fed-batch*, el trabajo publicado por Kim *et al.* (2009) quienes utilizaron aceite de colza y glucosa, manteniendo a esta última en una concentración de 30 g L^{-1} con adiciones periódicas; en el caso del aceite la tasa de alimentación fue controlada mediante un modelo que tomaba en cuenta el NaOH adicionado para mantener el pH en 3.5. De esta forma lograron alcanzar una concentración de 365 g L^{-1} de soforolípidos en 8 días, es decir una productividad de $1.9 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Otro ejemplo es el trabajo de Dolman *et al.* (2017) en donde, además de utilizar un cultivo lote alimentado, se explora un arreglo que permite la separación de los soforolípidos por gravedad mediante una columna conectada al fermentador. La residencia de la mezcla en la columna permite la separación de dos fases, una rica en soforolípidos y otra conformada por el medio y la biomasa, esto permite el aislamiento del biosurfactante debido a la diferencia de densidades de este con el resto de los componentes, separándolos y recirculando estos últimos al biorreactor. En los diferentes experimentos la alimentación del sustrato (aceite de colza y glucosa) se controló en su composición para ajustar la densidad del medio y permitir

la separación de los soforolípidos en la parte superior o inferior de la columna. Un punto importante es que mediante la separación integrada de los soforolípidos se logró extender la fermentación hasta las 1023 h, un lapso aproximadamente cinco veces mayor a los que se logran en procesos en lote, lo que permitió la recuperación de 623 g de soforolípidos de un volumen inicial de un litro. La productividad de esta fermentación extendida fue de $0.61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y el rendimiento de 0.47 gg^{-1} .

En cuanto a los sistemas de CMS se puede mencionar el trabajo publicado por Jiménez-Peñalver *et al.* (2018) quienes estudiaron la producción de soforolípidos usando ácido esteárico (C18:0) como fuente de carbono hidrofóbica. Ellos señalan que este compuesto es una fuente de carbono de bajo costo, pero difícil de trabajar en sistemas líquidos debido a su alta temperatura de fusión. El rendimiento máximo que obtuvieron fue de $0.211 \text{ g soforolípidos g}^{-1}$ sustrato. En la Tabla 2.2 se resumen algunos de los estudios dedicados a la producción de soforolípidos con *Starmerella bombicola* en medio líquido y sólido.

Tabla 2.2 Resumen de estudios de producción de soforolípidos con *Starmerella bombicola* en medio líquido y sólido.

Tipo de fermentación	Sistema de fermentación	Fuentes de carbono	Rendimiento de soforolípidos, g g^{-1}	Productividad, $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Referencia
Líquida	Lote alimentado	Glucosa, aceite de colza	0.47	0.61	(Dolman et al. 2017)
Líquida	Lote	Bagazo de sorgo, rastrojo de maíz, aceite residual de cocina	0.56	0.12	(Samad et al. 2017)
Líquida	Lote	Glucosa, petróleo, aceite de palma	0.13	0.22	(Shah et al. 2017)
Líquida	Lote	Glucosa, melaza de caña, aceite de soya, de olivo y girasol	0.14	0.24	(Daverey y Pakshirajan 2009)
Líquida	Lote	Suero desproteinizado, glucosa, ácido oleico	0.17	0.17	(Daverey y Pakshirajan 2010)
Líquida	Lote	Glucosa, ácidos grasos de	0.06	---	(Parekh et al. 2012)

		semilla de mango			
Sólida	Lote	Glucosa, ácidos grasos de semilla de mango	0.17	---	(Parekh et al. 2012)
Sólida	Lote	Melaza de remolacha, residuos de la refinación de aceite vegetal	0.24	0.04	(Jiménez-Peñalver et al. 2016)
Sólida	Lote	Melaza de remolacha, ácido esteárico	0.21	0.58	(Jiménez-Peñalver et al. 2018)
Sólida	Lote	Glucosa, ácido oleico, polvo de soya, polvo de cacahuete	0.18	---	(Parekh y Pandit 2012)

3. Justificación

Debido al daño ambiental producido por el ser humano, causado por el uso y generación de sustancias contaminantes y el consumo de recursos no renovables, ha crecido el interés por utilizar sustancias y procesos menos dañinos al ambiente que puedan sustituir a los productos sintéticos. Los surfactantes han sido relacionados con afectaciones ambientales (Lechuga *et al.* 2016), por lo que la investigación en torno a la obtención y uso de biosurfactantes de origen microbiano se ha intensificado en años recientes (Naughton *et al.* 2019).

Los soforolípidos se han posicionado como los biosurfactantes con mayor potencial para su uso a gran escala, ya que son producidos en cantidades importantes por organismos no patógenos al ser humano (Van Bogaert *et al.* 2011) entre los que destaca *Starmerella bombicola*, una levadura que presenta una alta productividad y en CML alcanza concentraciones de soforolípidos superiores a 300 g⁻¹ L. Se ha propuesto el uso de soforolípidos en aplicaciones que incluyen la recuperación mejorada del petróleo (Elshafie *et al.* 2015), como emulsificante cosmético (Farias *et al.* 2019), antimicrobiano de uso tópico (Lydon *et al.* 2017), adyuvante para herbicidas (Vaughn *et al.* 2014), dispersante de derrames de petróleo en el mar (Freitas *et al.* 2016), aditivo para detergentes (Joshi-Navare *et al.* 2013) e incluso se ha demostrado su actividad anticancerosa (Li *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2015). Sin embargo, el costo de producción es un obstáculo que ha frenado su producción industrial (Singh *et al.* 2018). Para superar este obstáculo es preciso, entre otras cosas, optimizar el cultivo, los procesos de recuperación y utilizar materia prima accesible de bajo costo. Uno de los puntos que es prometedor para lograrlo es la elección del sistema de cultivo, ya sea este en medio sólido o líquido. Debido a que ambos sistemas tienen ventajas y desventajas inherentes a su naturaleza, mismas que tienen impacto en la economía y practicidad del proceso, es necesario realizar un estudio que permita obtener datos cuantitativos que demuestren el impacto de estos factores en los resultados, tomando en cuenta variables clave como la productividad y el rendimiento. Una primera aproximación es el estudio a nivel

laboratorio, que puede ofrecer información relevante para poder llevar a cabo un futuro escalamiento a nivel piloto e industrial.

4. Hipótesis

Existen diferencias significativas en las condiciones en que se llevan a cabo el CMS y CML en la producción de soforolípidos con *S. bombicola*, lo que tendrá impacto en la selección del sistema al comparar rendimientos, productividades, cinéticas y composición del producto y el proceso de recuperación.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Comparar el cultivo en medio sólido con el cultivo en medio líquido de la levadura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 para la obtención de soforolípidos y determinar las diferencias en rendimientos, cinética y composición del producto.

5.2. Objetivos particulares

1. Cultivar *Starmerella bombicola* en medio sólido, caracterizar la cinética y determinar la productividad y rendimiento de soforolípidos.
2. Cultivar *Starmerella bombicola* en medio líquido, caracterizar la cinética, y determinar la productividad y rendimiento de soforolípidos.
3. Caracterizar los productos de la fermentación y evaluar su desempeño como biosurfactantes.
4. Purificar uno de los productos mayoritarios del CMS y elucidar su estructura molecular mediante análisis espectroscópico por RMN, FTIR y MS.

6. Materiales y métodos

En este apartado se describen los materiales y métodos empleados en este trabajo. Los resultados de cada uno de los pasos experimentales se describen y discuten más adelante en el capítulo correspondiente.

6.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Starmerella bombicola* ATCC 22214 de la American Type Culture Collection.

6.2. Conservación de la cepa

6.2.1. A corto plazo

La cepa se conservó sembrada en estrías en tubos inclinados con agar nutritivo (YPD) (g/L: glucosa, 20; peptona de carne, 20; extracto de levadura, 10; agar, 15). Los tubos fueron incubados por 48 horas y posteriormente conservados a 4°C por un periodo máximo de dos semanas.

6.2.2. A mediano plazo

A largo plazo la cepa se conservó en viales con medio nutritivo (YPD) y glicerol como crioprotector a -20°C.

6.3. Medios de cultivo

6.3.1. Medio para la producción de inóculo

Se utilizó un medio YPD (g/L: extracto de levadura, 10; peptona de carne 20; dextrosa; 20) preparado con insumos de la marca MCD LAB, Bioxon y J.T. Baker respectivamente.

El inóculo se preparó tomando una azada del tubo inclinado e inoculando con ella 5 mL del medio YPD, el cual se dejó en incubación por 24 horas. Posteriormente el contenido del tubo se usó para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del mismo medio, el cual se incubó por 24 horas más.

6.3.2. Medio para cultivo sólido

Se utilizó con la siguiente composición (g/L): aceite de cártamo (Oléico®), 150; y glucosa (J.T. Baker), 150; $MgSO_4$, 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2; KH_2PO_4 , 1.2; K_2HPO_4 , 2.8; $FeSO_4$, 0.05; $MnSO_4$, 0.05; $CuSO_4$, 0.05; y ácido cítrico, 1.5; todo de la marca J.T. Baker. La solución con las sales fue ajustada a un pH de 6.5 utilizando una solución de KOH 0.5 M. La glucosa, el aceite y la solución de sales se esterilizaron por separado en una autoclave a 121°C por 20 minutos.

El soporte, aserrín de pino o agrolita, fue lavado con agua desionizada a 60 - 70°C, después con agua fría, y posteriormente fue secado hasta alcanzar una humedad <5%, seguido de la esterilización en autoclave a 121°C por 40 minutos.

El medio, así como el inóculo del punto 6.3.1., se incorporaron al soporte previamente esterilizado para ser luego homogeneizado dentro de una bolsa estéril.

6.3.3. Medio para cultivo líquido

Se formuló un medio de cultivo basado en el anteriormente descrito para el CMS. El medio se compone por (g L⁻¹): aceite de cártamo, 100; glucosa, 100; $MgSO_4$, 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2; KH_2PO_4 , 1.2; K_2HPO_4 , 2.8; $FeSO_4$, 0.05; $MnSO_4$, 0.05; $CuSO_4$, 0.05; y ácido cítrico, 1.5. La solución de sales fue ajustada a un pH de 6.5 utilizando KOH 0.5 M.

La glucosa, el aceite y la solución de sales se esterilizaron por separado en una autoclave a 121°C por 20 minutos.

6.4. Producción de soforolípidos en CMS

El proceso se llevó a cabo en dos tipos de biorreactores a escala laboratorio: a) frascos de vidrio de un litro de capacidad, con tapas adaptadas con dos orificios para la conexión de las líneas de entrada y salida de gases y b) en columnas de vidrio de 17 x 5 cm (aproximadamente 334 mL). Los sistemas se muestran en la Figura 6-1.

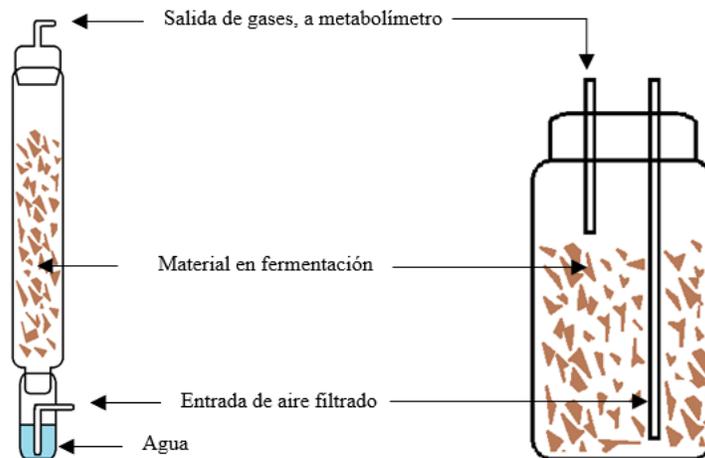


Figura 6-1 Sistemas utilizados para el CMS

En todos los casos, el soporte impregnado con el medio de cultivo e inoculado, como se explica en el punto anterior, se introdujo en los biorreactores sin oprimirlo y en cantidades iguales para cada caso (columnas o frascos). Posteriormente se incubaron a 30°C y fueron conectados a las líneas de entrada y salida de gases. El aire de entrada para cada unidad experimental se filtró (Pall 2 μ m), y cada salida hacia el metabolímetro se conectó a una columna rellena de sílica gel para eliminar la humedad antes de llegar al equipo.

Se utilizó un metabolímetro descrito en la patente 336733 desarrollada por Saucedo-Castañeda, et al. (2013). Este equipo registró mediciones de CO₂ y O₂ del gas de salida y entrada en intervalos de 40 minutos para cada unidad experimental.

6.5. Producción de soforolípidos en CML

El CML se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con baffles y con tapones de algodón y gasa, mismos que fueron hechos cuidando que tuvieran el mismo peso ± 0.1 g. El volumen de llenado final se fijó en 55 mL. Se utilizó una agitación orbital de 180 rpm.

El medio de cultivo fue preparado como se indica en el punto 6.3.3. y se adicionó un 10% v/v del inóculo mencionado en el punto 6.3.1., posteriormente se incubó a 30°C. El proceso se llevó a cabo por 10 días.

6.6. Recuperación de los soforolípidos a nivel laboratorio

La recuperación de la mezcla cruda de soforolípidos se realizó mediante extracciones con acetato de etilo, el cual posteriormente fue removido usando un evaporador rotatorio (Rotavapor Büchi, modelo R-100), y finalmente se lavó con hexano, el cual fue descartado.

En el caso del CMS el material fermentado fue secado con ayuda de una estufa y la recuperación se llevó a cabo una extracción sólido-líquido en tres etapas utilizando una proporción masa volumen de 1:5, es decir por cada 20 gramos de material fermentado seco inicial (humedad <5%) se utilizaron 100 mL de solvente. En la primera etapa el material fermentado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se adicionó el solvente, se tapó y se colocó en agitación orbital a 200 rpm por una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la agitación, el solvente fue recuperado y se reemplazó con más solvente fresco, reiniciándose el proceso de agitación por una hora más. La tercera etapa se llevó a cabo de la misma manera. El disolvente recuperado de las tres etapas sucesivas de extracción fue combinado y filtrado usando papel filtro Whatman grado 2. El filtrado se colocó en un matraz bola y se acopló al Rotavapor, con un baño de temperatura a 60°C y aplicando vacío (gradualmente hasta llegar a los 280 mbar), hasta conseguir remover el acetato de

etilo. Posteriormente se llevó peso constante a 60°C y se registró su masa (en una balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg). El producto fue una pasta muy viscosa color ámbar que se lavó dentro del mismo matraz con hexano para eliminar el aceite residual el cual fue desechado. Finalmente, el producto se llevó a peso constante.

En el caso del CML, la recuperación se realizó mediante una extracción líquido-líquido. La proporción de medio de cultivo fermentado-acetato de etilo utilizada fue de 1:5 (v/v), homologando así la extracción del CMS. Se realizaron tres extracciones consecutivas utilizando para cada una de ellas un embudo de separación de 500 mililitros en donde se colocaron ambos líquidos, el medio de cultivo proveniente de la fermentación fue colocado sin tratamiento previo. En seguida se procedió a agitar manualmente por tres minutos, después de lo cual se colocó en un soporte para permitir la separación de fases. La fase orgánica fue recuperada y la fase acuosa se sometió a dos extracciones más. Las fases orgánicas recuperadas de las tres etapas de extracción fueron combinadas, se mezclaron con 1 g de Na₂SO₄ anhidro por cada 100 mL y posteriormente se filtraron utilizando papel filtro Whatman grado 2. La remoción del acetato de etilo con ayuda del Rotavapor se realizó de la misma manera que para el CMS.

6.7. Cuantificación de biomasa

La biomasa se recuperó y cuantificó únicamente en el caso del estudio del inóculo y del CML para la producción de soforolípidos, a partir de la fase acuosa separada del punto 6.6. En el caso del inóculo, se tomaron muestras de un mililitro de medio de cultivo cada hora por 24 horas, estas muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm, y el pellet de células fue resuspendido con agua destilada para ser nuevamente centrifugado. El contenido de biomasa se cuantificó gravimétricamente con el peso seco y los resultados fueron expresados como g L⁻¹ de medio de cultivo. Una segunda forma de cuantificación fue realizada por conteo de UFC, al tomar un mililitro de medio de cultivo cada hora por 24 horas y realizando diluciones consecutivas de 1:10. Se utilizaron las diluciones quinta y sexta. Finalmente, el

contenido celular también fue evaluado realizando mediciones de turbidez en un espectrofotómetro Perkin Elmer. Lambda 24 a 600 nm, de una disolución 1:10 de una muestra tomada del medio de cultivo cada hora por 24 horas

La cuantificación de biomasa del CML la fase acuosa del punto 6.6 fue centrifugada a 3000 rpm en una centrifuga Beckman Coulter modelo Allegra X-12R, el sobrenadante fue reservado para la medición de glucosa y el pellet fue resuspendido en agua destilada y centrifugado nuevamente, se eliminó el segundo sobrenadante y el pellet fue llevado a peso constante a 60 °C. Los resultados de la cuantificación de la biomasa se reportaron como g de biomasa/l de medio de cultivo. En el caso del CMS no se cuantificó la biomasa, en lugar de ello se monitoreó la producción de CO₂, la cual puede ser relacionada con el crecimiento celular.

6.8. Purificación de los soforolípidos

La purificación de las diferentes especies de soforolípidos a partir de la mezcla cruda, obtenida según el punto 6.6., se llevó a cabo utilizando cromatografía preparativa. Se utilizó una columna preparativa de vidrio de 30 cm de longitud y 2 cm de diámetro, empacada con sílica gel 60 Å, 2-25 µm de tamaño de poro, marca Sigma-Aldrich previamente suspendida en cloroformo.

Se diluyeron 1.5 gramos de la mezcla cruda de soforolípidos en cloroformo, y esta solución se introdujo en la columna una vez empacada. Para la elución se utilizaron soluciones de cloroformo y metanol 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20 (% v/v). Se recolectaron las fracciones y la separación se confirmó mediante cromatografía en capa fina, como se señala en el punto 6.9.8.

Adicional a la purificación con cromatografía preparativa, se realizó una recristalización de los soforolípidos obtenidos de esta. Para este fin, el polvo blanquecino resultante se diluyó en metanol grado HPLC y se introdujo en un congelador a -5°C. El resultado fueron cristales blancos y una solución madre ligeramente amarilla de la que fueron separados.

6.9. Métodos analíticos

6.9.1. Cuantificación de soforolípidos y lípidos residuales

Se cuantificó como producto el total del material resultante de la extracción descrita en el punto 6.6., para ello se utilizó el método gravimétrico descrito a continuación. El material resultante de la eliminación parcial del acetato de etilo se colocó en un matraz bola de 50 mililitros cuyo peso había sido previamente registrado, posteriormente se eliminó el resto del acetato usando nuevamente el rotavapor. Enseguida se realizó el lavado con 30 mililitros de hexano, el cual fue descartado y finalmente el matraz con el producto se llevó nuevamente a peso constante. La masa final se consideró como soforolípidos recuperados y la diferencia entre esta masa y la anterior fue registrada como lípidos residuales.

6.9.2. Cuantificación de glucosa

En el caso del CMS, la glucosa se cuantificó realizando una extracción sólido-líquido del material fermentado y seco (humedad <5%) utilizando agua destilada en una proporción 1:50 m/v, seguido del uso de un kit Glucose-LQ GOD POD (Spinreact) de determinación cuantitativa de glucosa con el cual es posible determinar la concentración a través de la colorimetría, para este fin se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS. El proceso se describe a continuación. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocó una muestra de material seco de 0.5 g y 25 mL de agua destilada, a continuación, se tapó el matraz y se colocó en agitación orbital a 150 rpm por 30 minutos a 30°C. Posteriormente el líquido fue recuperado y filtrado con papel Whatman grado 2. Se tomaron alícuotas de 10 µL de cada muestra y se adicionaron en un mL de la solución reactiva, tal como indica el manual de uso del kit, en el caso de las muestras más concentradas se realizó una dilución 1:5 para que la concentración medida se encontrara dentro de la curva de calibración. Para la medición se utilizó un espectrómetro UV-VIS Lambda 24 (Perkin Elmer). Para el

caso de la cuantificación en el CML se tomó una alícuota del extracto acuoso después de la extracción con acetato de etilo y se diluyó con agua destilada en una proporción 1:200, llevándose a cabo entonces el mismo procedimiento antes descrito con el kit Glucose-LQ GOD POD (Spinreact).

6.9.3. Medición de pH en los cultivos

El potencial de hidrógeno fue determinado utilizando un potenciómetro marca Metrohm modelo 827, tomando mediciones a 25°C. Para el caso de la medición del pH en las muestras del CMS se realizaron extracciones al material fermentado húmedo utilizando agua destilada en una proporción 1:5 w/v, la extracción se llevó a cabo con agitación, 250 rpm, por 30 minutos a temperatura ambiente, después la solución fue filtrada para después determinar el pH.

6.9.4. Monitoreo de la producción de CO₂ y consumo de O₂

La concentración de CO₂ y O₂ en la corriente gaseosa de entrada y salida de los biorreactores fueron registradas utilizando un metabolímetro descrito en la patente 336733 (Saucedo-Castañeda et al., 2013). La medición de los gases de salida se utilizó para monitorear la actividad metabólica, misma que puede relacionarse con el crecimiento microbiano. Se obtuvieron 140 mediciones en el lapso entre el inicio y el fin del CMS.

6.9.5. Resonancia magnética nuclear

Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance III de 500 MHz a 20°C. La muestra se disolvió en CDCl₃ y se adquirieron los espectros de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC y HMBC. Adicionalmente se obtuvo un espectro de ¹H con CDCl₃ + D₂O agregando unas gotas de D₂O a la primera disolución. Se usó TMS como referencia. Los espectros

fueron procesados con el software TopSpin 3.6.2 de Bruker. Los ángulos diedros entre los núcleos fueron obtenidos con el software MestReJ de Mestrelab usando las constantes de acoplamiento. El desplazamiento químico (δ) se expresa en ppm y la constante de acoplamiento (J) en Hz.

6.9.6. Espectrometría de masas

Se utilizó un espectrómetro Micro-TOF II (Bruker) con la técnica ESI-TOF (Ionización por electrospray – Tiempo de vuelo) en modo de ionización positiva. La muestra, previamente purificada, fue diluida en metanol e inyectada directamente. Las señales reportadas son las de mayor intensidad relativa y se identifican por su relación masa/carga (m/z).

6.9.7. Análisis infrarrojo FTIR

Los espectros de infrarrojo fueron adquiridos con un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier Tracer-100 (Shimadzu), mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR). Los datos obtenidos son procesados utilizando el software LabSolutions IR y están expresados en transmitancia (%) contra número de onda (cm^{-1}). Las bandas se reportan en máxima absorbancia/número de onda ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$).

6.9.8. Humedad

Las determinaciones de humedad se realizaron gravimétricamente con dos métodos: llevando a peso constante las muestras en una estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente pesando en una balanza analítica. El segundo utilizando una termobalanza Ohaus MB45. Para el primer caso se determinó el peso constante después de registrar el valor en al menos dos ocasiones siendo el resultado

definitivo aquel que no varió en más de 5 µg después de dos horas de calentamiento en estufa y posterior enfriamiento en desecador.

6.9.9. HPLC

Se utilizó HPLC para la comparación y caracterización de los productos de fermentación en CMS y CML, crudos y semipurificados. Se utilizó un equipo marca Shimadzu modelo Prominence, acoplado a un detector de arreglo de diodos (SPD-M20A) y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-LTII). La columna cromatográfica de fase reversa utilizada fue una Kromasil, C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, 100 Å. La temperatura del horno se fijó a 40°C durante todo el análisis. La fase móvil utilizada fue MeOH 100%. Se usó un flujo isocrático. El detector ELSD se configuró a una ganancia de 6 y a una temperatura de 40°C.

6.9.10. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de 5 cm de largo con sílica gel 60 marca Sigma Aldrich, con indicador fluorescente. Para la elución se utilizó una fase móvil conformada por cloroformo, metanol y agua (65:15:2 Vol.), como lo reportan Cooper y Paddock (1984) y Asmer et al. (1988). El revelado se realizó con p-anisaldehído (solución preparada con 5 mL de p-anisaldehído, 5 mL de H₂SO₄ concentrado, 90 mL de etanol 96% y un mililitro de ácido acético glacial), luz UV y yodo.

6.9.11. Tensión superficial

Se utilizó un tensiómetro Dataphysics modelo DCAT 11 equipado con un anillo de Du Noüy. En un matraz aforado se preparó una solución acuosa de 0.5 g/L de cada muestra y a partir de esta se prepararon las soluciones de menor concentración. Las mediciones se realizaron a 20°C. Cada determinación se realizó por triplicado.

6.9.12. Análisis termogravimétrico

Se utilizó un analizador termogravimétrico de TA Instruments modelo Q50. Se colocó en la charola la cantidad de 10 mg de muestra. El método consistió en una rampa de temperatura de 20°C/min de 30 a 1000°C.

6.10. Análisis estadístico

Se trabajó con triplicados para cada determinación. En el caso de la comparación entre dos medias se utilizó la prueba de t-Student para determinar diferencias significativas, considerando un $p < 0.05$.

6.10.1. Ajuste de modelos matemáticos a las cinéticas de crecimiento, producción y consumo

El crecimiento microbiano (CML) y la producción acumulada de CO₂ (CMS) fueron ajustados al modelo logístico:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} X \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right)$$

Para el caso del ajuste de la producción de sofrolípidos se utilizó un modelo (Soto-Cruz *et al.*, 2002) derivado de la ecuación de Luedeking-Piret y la ecuación 1:

$$P(X) = P_0 + \alpha(X - X_0) + \frac{\beta X_{m\acute{a}x}}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln \left(\frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{X_{m\acute{a}x} - X} \right)$$

Por otra parte, el consumo de sustratos se ajustó al modelo (Soto-Cruz *et al.*, 2002) derivado de la ecuación de Pirt para el consumo de lactato y la ecuación 1:

$$L(X) = L_0 - \frac{1}{Y_{X/L}} (X - X_0) + \frac{mX_{m\acute{a}x}}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln \left(\frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{X_{m\acute{a}x} - X} \right)$$

Para llevar a cabo los ajustes se utilizó el software IBM SPSS® Statics 25 y Excel®.

7. Resultados

En este capítulo se exponen los resultados de los cultivos *S. bombicola* en medio líquido y sólido a escala laboratorio. Cabe señalar que para el presente trabajo se tomaron como base algunos resultados obtenidos con el proyecto CONACyT PEI-PROINNOVA 250609, en donde colaboraron la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, la empresa Polioles y la Universidad Iberoamericana, en el marco del Programa de estímulos a la innovación de CONACyT. Tal es el caso de las condiciones optimizadas del CMS a partir de las cuales se prepararon los experimentos para la producción del biosurfactante en medio sólido, y que sirvieron como base para el diseño de los experimentos del CML. A continuación, se muestran los resultados de los experimentos realizados en ambos sistemas.

7.1. Estudio del cultivo de *Starmerella bombicola* para la producción de inóculo

En una primera etapa se realizó un estudio del desarrollo de la cepa en el medio de cultivo utilizado para generar el inóculo, con el fin de determinar el momento de iniciar el proceso de fermentación, para ello se utilizó un medio de cultivo compuesto por, g/l: extracto de levadura 10, peptona de carne 20 y glucosa 20. Este medio contiene una alta concentración de nitrógeno, lo cual favorece a que el inóculo tenga una gran densidad celular, un factor fundamental para el proceso, ya que durante el cultivo para la producción de soforolípidos el medio estará restringido en nitrógeno para limitar el crecimiento celular y de esta manera conducir rápidamente a metabolismo secundario, esto será ideal para obtener buenos rendimientos de soforolípidos, al ser estos metabolitos secundarios que se producen mayoritariamente al concluir la fase exponencial de crecimiento. En conclusión, el estudio cinético del crecimiento celular en el medio YPD es útil para establecer el momento en el que la densidad celular es mayor y la levadura se encuentra aún en

crecimiento. La Figura 7-1, que muestra el crecimiento de *S. bombicola* con respecto al tiempo, utilizando para ello mediciones de peso seco, densidad óptica a 600 nm y UFC/mL.

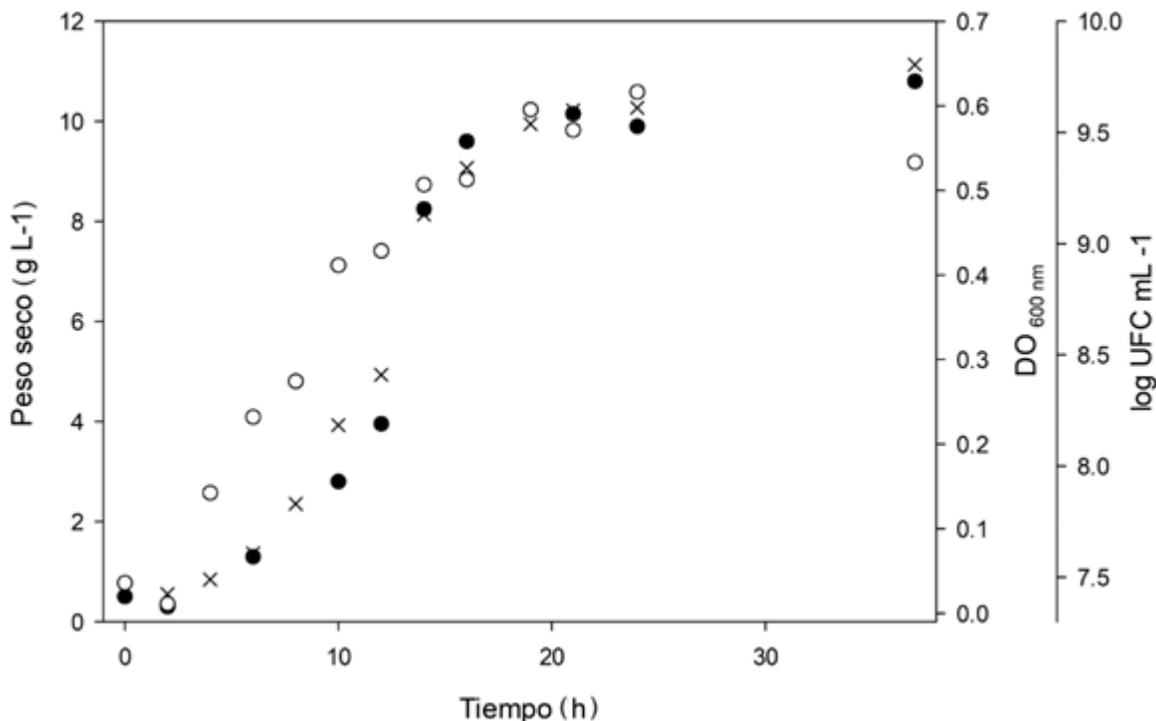


Figura 7-1 Cinética de crecimiento de *S. bombicola* en medio YPD. (○) log (UFC/ml), (●) Peso seco g/l, (x) Densidad óptica a 600 nm.

A partir de los resultados se puede afirmar que la fase de crecimiento concluye entre las 20 y 24 horas. Esta información es de utilidad para la generación de inóculos con la máxima densidad de células viables posible. A partir de estos resultados la edad del inóculo utilizado para el CMS y el CML se fijó en 24 horas.

7.2. Cultivo en medio sólido (CMS)

Para llevar a cabo el CMS se eligió al aserrín como soporte y como medio de cultivo una formulación previamente optimizada por un grupo de trabajo asignado al proyecto CONACyT PEI-PROINNOVA antes mencionado. Inicialmente, para la selección del soporte se tomaron en cuenta dos opciones, agrolita y aserrín. Se llevó a cabo un experimento para comparar la producción del biosurfactante en CMS en

ambos sistemas de lo cual se concluyó que la producción del soforolípido en el aserrín es significativamente mayor, logrando un rendimiento $Y_{P/S}$ de 0.220 ± 0.016 (gramos de producto/gramos de sustrato, $g_p g_s^{-1}$) en comparación con el obtenido con agrolita de $0.122 \pm 0.006 g_p g_s^{-1}$.

Rendimientos	CMS Agrolita	CMS Aserrín
$\frac{g_{soforol\u00edpidos}}{g_{sustratos}}$	0.122 ± 0.006	0.220 ± 0.016

Tabla 7.1 Rendimiento en el CMS utilizando aserrín y agrolita

Además de ofrecer mayores rendimientos, el aserrín posee una gran resistencia mecánica, lo que puede facilitar, el posterior escalamiento del proceso permitiendo la agitación del sistema sin modificar el tamaño de las partículas. Otro punto a su favor es la gran retención de humedad que evita escurrimientos y favorece la homogeneidad del medio, finalmente, es importante señalar que se trata de un residuo de la industria maderera que de esta forma puede ser valorizado.

Con el fin de comparar los productos obtenidos en el CMS con agrolita y aserrín, se obtuvieron los espectros de infrarrojo (FTIR/ATR) de ambos extractos, mismos que corresponden a la Figura 7-2. Se observa que los espectros son prácticamente idénticos incluso en la zona de la “huella dactilar” ($<1400 \text{ cm}^{-1}$). De esta evidencia se concluye que el producto obtenido por ambos sistemas tiene un alto grado de similitud a pesar de la diferencia en el soporte. En ambos espectros se aprecia la banda ancha característica de tensión O-H en hidroxilos, con un máximo en 3360 cm^{-1} ; inmediatamente a la derecha aparece una pequeña banda en 3005 cm^{-1} , que corresponde a la tensión carbono-hidrógeno en C=C-H, evidenciando la presencia de insaturaciones; la banda en 1739 cm^{-1} es generada por la tensión C=O en carbonilos, en este caso se encuentra en una posición que corresponde a ésteres (O-C=O); enseguida, la banda en 1651 cm^{-1} podría indicar tensión entre carbonos sp^2 C=C, finalmente, las bandas en 1076 y 1036 cm^{-1} son características de estiramientos C-O.

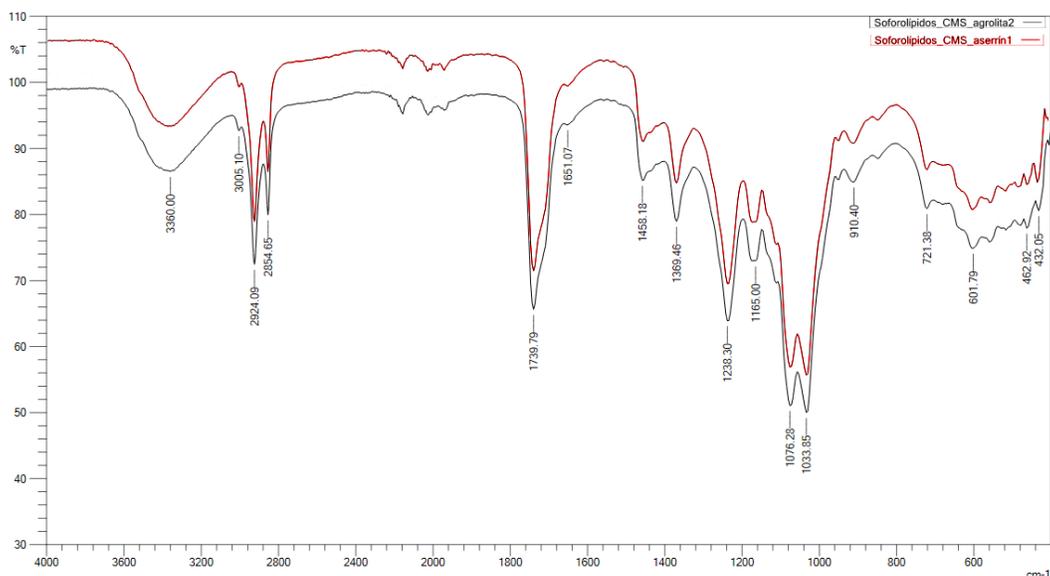


Figura 7-2 Espectros de FTIR de los productos de fermentación del CMS de *S. bombycola* en aserrín (rojo) y agrolita (azul)

Al ser el aserrín un material de origen vegetal se esperaba que pudiera contener sustancias naturales extraíbles con el acetato de etilo junto con el producto. Para conocer la cantidad y características del extracto de la madera se realizaron pruebas de extracción al aserrín con acetato de etilo después de ser lavado con agua, hallando que este contiene cerca del 2% m/m de resina y demás especies extraíbles (1.99 ± 0.05 g por cada 100 g de aserrín). El proceso se realizó con tres extracciones sucesivas con acetato de etilo en una relación 1:5 m/v, el mismo proceso que se realiza para la recuperación de los soforolípidos. El porcentaje promedio de resina retirada en cada extracción se muestra en la Figura 7-3.

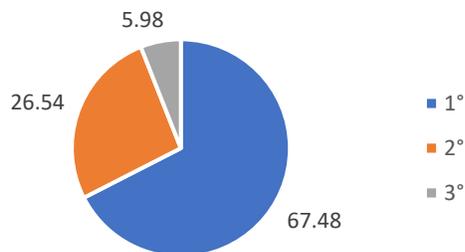


Figura 7-3 Resina recuperada (%) en cada extracción con acetato de etilo.

Se obtuvo el espectro de infrarrojo (FTIR, ATR) de la resina extraída del aserrín, Figura 7-4, el cual ofrece información relevante sobre sus características químicas.

La banda más intensa, en 1700 cm^{-1} , corresponde al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de un carbonilo, por su posición puede tratarse de un ácido carboxílico o una cetona (un aldehído se descarta al no presentarse la banda característica de la tensión $\text{C}-\text{H}$ entre $2700\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, la absorción ancha que se traslapa con las bandas de tensión de metilos y metilenos, 2924 y 2854 cm^{-1} , es decir en las frecuencias comprendidas entre 2700 y 3500 cm^{-1} sugiere la presencia de tensión $\text{O}-\text{H}$ que podría corresponder a un ácido carboxílico. Otra señal de gran importancia es la que aparece en 1639 cm^{-1} que, al tratarse del estiramiento $\text{C}=\text{C}$, indica la presencia de insaturaciones.

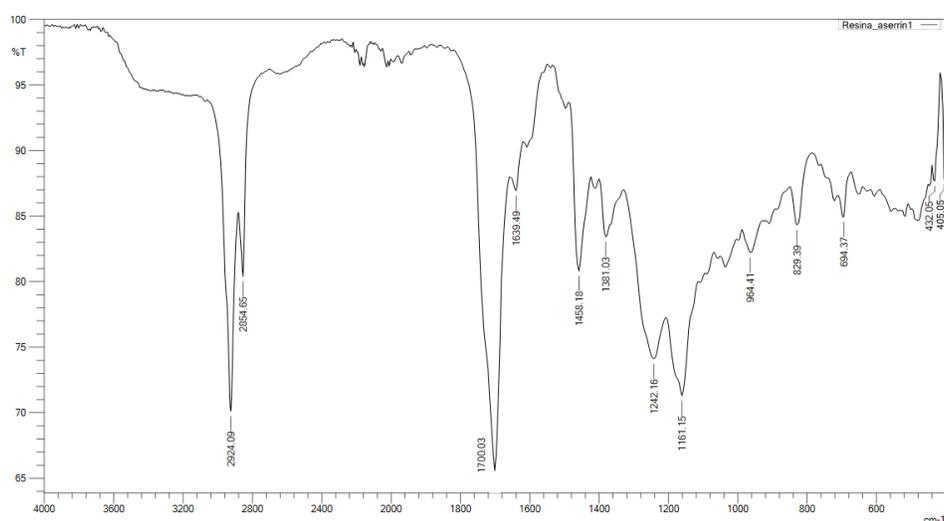


Figura 7-4 Espectro del extracto recuperado del aserrín, utilizando acetato de etilo como disolvente.

Es probable que el extracto del aserrín de pino, obtenido con acetato de etilo, sea una mezcla de ácidos resínicos, entre los cuales se encuentre el ácido abiético, un diterpeno presente en resina de coníferas. El espectro de FTIR/KBr del ácido abiético obtenido de la literatura y su estructura molecular se presentan en la Figura 7-5. En el espectro, aparecen bandas intensas en 2927 , 2860 y 1693 cm^{-1} , así como una banda ancha entre 2400 y 3600 cm^{-1} que se traslapa con las dos primeras, esto coincide con la descripción anteriormente realizada al extracto del aserrín.

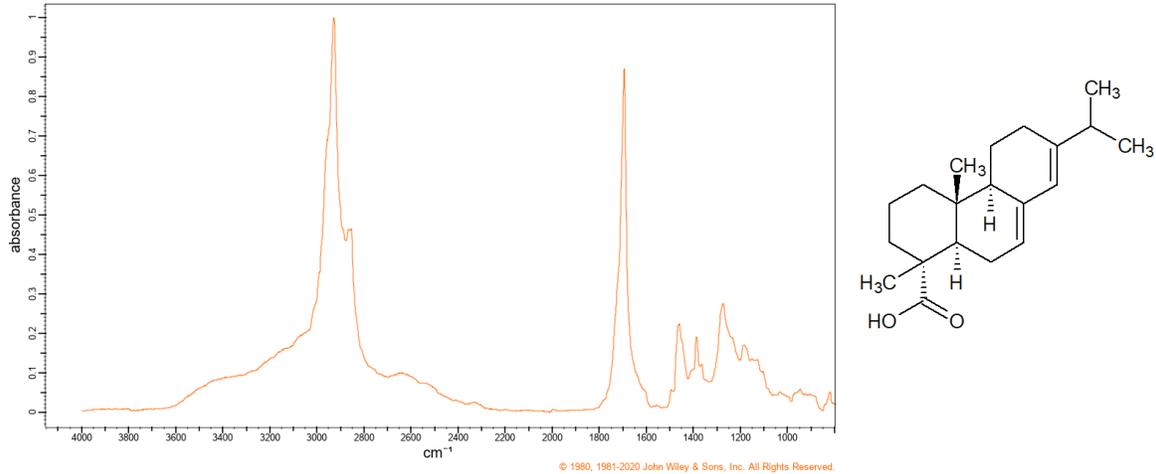


Figura 7-5 Molécula y espectro de FTIR/KBr (absorbancia) del ácido abiético. Obtenido de <https://spectrabase.com/spectrum/U8oQ6NXqt>. John Wiley & Sons.

Se ha estudiado el efecto de los compuestos presentes en la resina de las plantas de la familia de las pináceas, entre ellos el ácido abiético, demostrándose su efecto microbicida y fungistático sobre algunos microorganismos (Feio *et al.* 1999) por este motivo se realizó un experimento para comprobar el posible efecto de la resina del aserrín usado como soporte, comparando el perfil de la respiración en dos grupos: aserrín lavado con agua y aserrín sometido a extracción previa con acetato de etilo y posteriormente lavado con agua. La extracción de la resina en el segundo grupo se realizó de la misma forma en que se describe la extracción de los soforolípidos; posteriormente se dejó secar en una campana de extracción y después al aire libre cubierto por un paño por tres días para eliminar los residuos de acetato de etilo. Finalmente, aserrín se lavó con agua caliente y después se colocó en una estufa a 50°C para secarlo hasta llegar a una humedad menor al 5% wt. A continuación, se muestran las gráficas de la tasa de producción de CO₂, Figura 7-6, y la producción total de CO₂, Figura 7-7, para los dos casos.

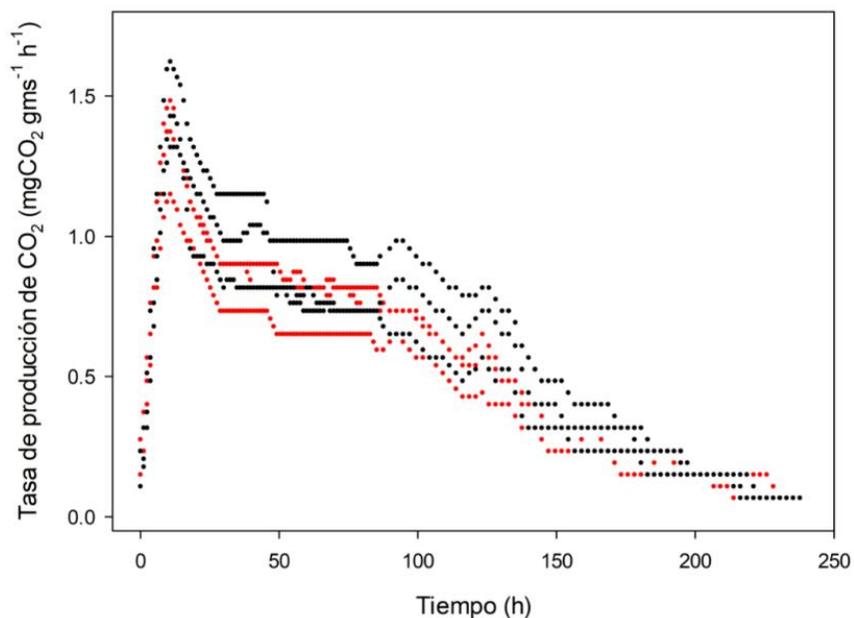


Figura 7-6 Tasa de producción de CO₂ del CMS de *S. bombicola* en aserrín con resina (negro) y sin resina (rojo)

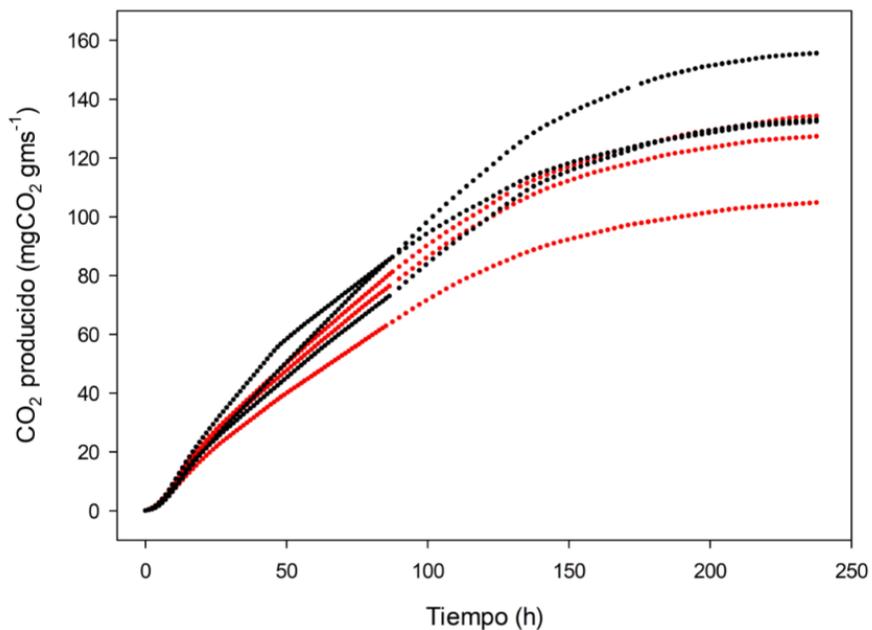


Figura 7-7 Producción acumulada de CO₂ del CMS de *S. bombicola* en aserrín con resina (negro) y sin resina (rojo)

La producción total de CO₂ en los cultivos con el aserrín con resina fue de 140.3 ± 13.2 mgCO₂ gms⁻¹ (miligramos de CO₂ sobre gramo de material base seca), mientras que con el aserrín sin resina fue de 122.1 ± 15.4 mgCO₂ gms⁻¹, aunque el

promedio de este último es menor no son significativamente diferentes según la comparación de medias ($\alpha = 0.05$) por prueba t de dos muestras. Mediante la comparación de los perfiles de producción de CO₂ como herramienta para evaluar el desarrollo de *S. bombicola* en ambas condiciones no se demostró que la resina tuviera algún efecto que causara la inhibición en su crecimiento o una modificación en su metabolismo, por lo que los experimentos posteriores fueron realizados en aserrín con resina.

Una vez definido el soporte se procedió a ejecutar un experimento para la caracterización de la cinética de producción de soforolípidos, consumo de sustratos y crecimiento de *S. bombicola* en CMS. Se utilizaron columnas de vidrio como biorreactores debido a que permiten la aplicación de aireación forzada, lo cual favorece la disponibilidad de oxígeno en el sistema. El diámetro pequeño de las columnas (5 cm) reduce la acumulación de calor metabólico, factor de importancia al considerar la baja conductividad térmica del soporte. Las columnas se muestran en la Figura 7-8.



Figura 7-8 Columnas de vidrio de 17 x 5 cm (333.8 mL) utilizadas como biorreactores en CMS

Los resultados de las determinaciones cinéticas del CMS se muestran en la Figura 7-9, los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se observan la producción de soforolípidos, consumo de glucosa y consumo de aceite. Los resultados indican que la glucosa es la fuente de carbono más utilizada en la primera etapa de crecimiento, consumiéndose cerca del 95% en las primeras 72 horas. Por otra parte,

el aceite se consume en la misma proporción en que los sofrolípidos son generados, llegando a consumirse aproximadamente el 98% al llegar a las 240 horas.

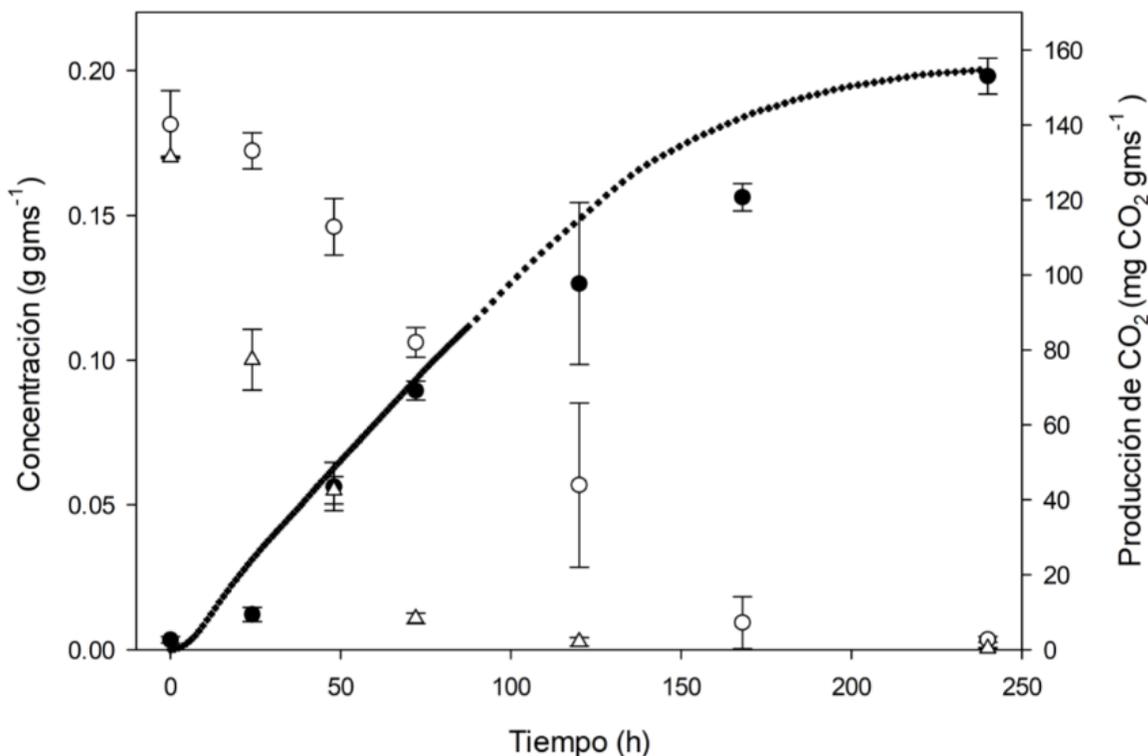


Figura 7-9 Cinéticas del CMS de *S. bombicola*. Se muestran las curvas de la producción de sofrolípidos (●), el consumo de aceite (○), el consumo de glucosa (△) y la producción acumulada de CO₂

Los datos de la producción total de CO₂, mgCO₂ gms⁻¹, fueron ajustados al modelo logístico, ecuación 8.1, obteniéndose un coeficiente de determinación R² = 0.992. Los coeficientes de la ecuación (con un intervalo de confianza de 95%) fueron los siguientes: X_{máx} = 152.7 ± 2.0 g gms⁻¹, X_o = 13.3 ± 1.0 g gms⁻¹ y μ = 0.030 ± 0.001 h⁻¹.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{máx} X \left(1 - \frac{X}{X_{máx}} \right)$$

Ecuación 7-1 Modelo logístico

Posteriormente, la producción de sofrolípidos fue ajustada al modelo descrito por Soto-Cruz *et al.* (2002), ecuación 7-2, el cual está basado en el modelo logístico de crecimiento, ecuación 7-1, y el modelo de Luedeking y Piret (1959) para la

producción de metabolitos, ecuación 7-3. Este último contiene dos parámetros, α y β , los cuales están relacionados con la producción asociada y la no asociada al crecimiento, respectivamente. El modelo se ajustó sin la constante (P_0) con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.983$. Los parámetros de la ecuación obtenidos fueron: $\alpha = 0.001$ y $\beta = 30.235$.

$$P = P_0 + \alpha(X - X_0) + \frac{\beta X_{m\acute{a}x}}{\mu_{m\acute{a}x}} \text{Ln} \left(\frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{X_{m\acute{a}x} - X} \right)$$

Ecuación 7-2 Modelo de Soto-Cruz et al. (2002) ajustado a la producción de soforolípidos por S. bombicola en CML.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

Ecuación 7-3 Modelo de Luedeking y Piret (1959)

El rendimiento obtenido en el CMS fue de 0.46 ± 0.01 g_p g_s⁻¹ a las 240 horas, momento en el cual fue detenido el proceso. La producción de soforolípidos promedio fue de 0.198 ± 0.006 g g_s⁻¹. Finalmente, considerando un volumen de reactor de 333.8 mL, la productividad fue de 0.089 ± 0.003 g L⁻¹h⁻¹.

Jiménez-Peñalver (2017) señala que la eficiencia de la extracción de los soforolípidos en la lixiviación del material sólido fermentado está influenciada por la presencia de lípidos residuales, siendo el proceso más eficiente al existir una menor cantidad de lípidos. La Figura 7-10 muestra el porcentaje extraído de soforolípidos que el autor obtuvo en distintos momentos de la fermentación usando tres extracciones consecutivas con acetato de etilo. Al avanzar el tiempo la cantidad de lípidos disminuye debido al consumo de estos por el microorganismo, por lo que en etapas avanzadas de la fermentación la eficiencia en la extracción se ve incrementada.

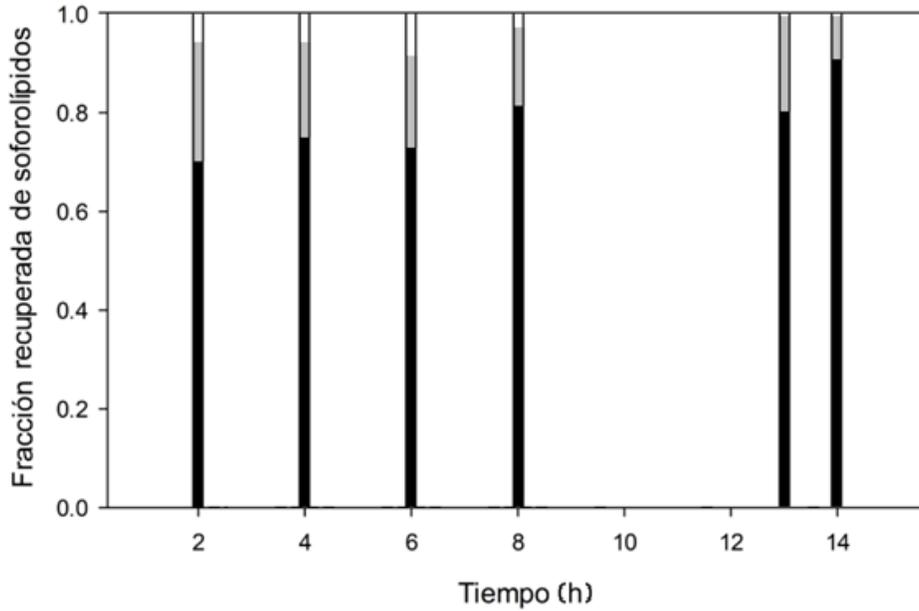


Figura 7-10 Fracción de soforolípidos recuperados en seis muestras a diferentes tiempos, cada una de las tres extracciones aplicadas al material. Primera extracción (negro), segunda (gris) y tercera (blanco). Adaptado de Jiménez-Peñalver (2017).

Para la optimización de la extracción de la mezcla de los soforolípidos se debe tomar en cuenta la cantidad de lípidos residuales. Según los datos representados en la Figura 7-9, los lípidos son prácticamente consumidos a las 240 horas, momento en el cual también se alcanza un máximo en la producción de soforolípidos, por lo que a partir de ese momento sería recomendable llevar a cabo la recuperación de soforolípidos.

En la Figura 7-11, se muestra la evolución del pH del CMS. Un incremento pronunciado en la acidez se observa en las primeras 24 horas del proceso, este lapso corresponde a la etapa de crecimiento microbiano exponencial. Se observa que el pH se mantiene entre 3.2 y 3.5.

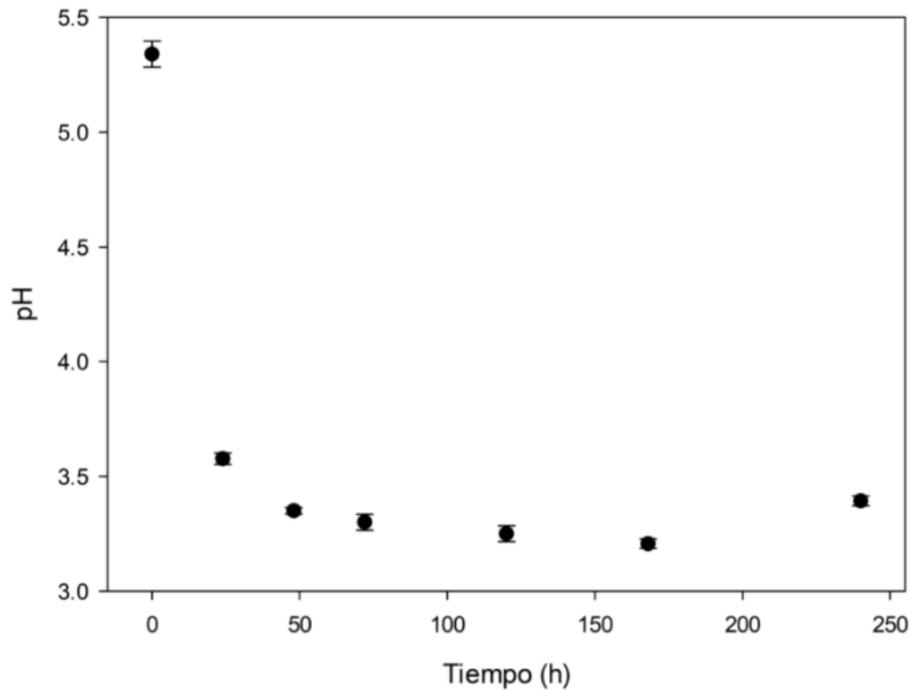


Figura 7-11 Evolución del pH en el CMS de S. bombicola

7.3. Cultivo en medio líquido (CML)

En la Figura 7-12 se presentan los resultados del crecimiento microbiano, producción de soforolípidos, consumo de aceite y consumo de glucosa en CML.

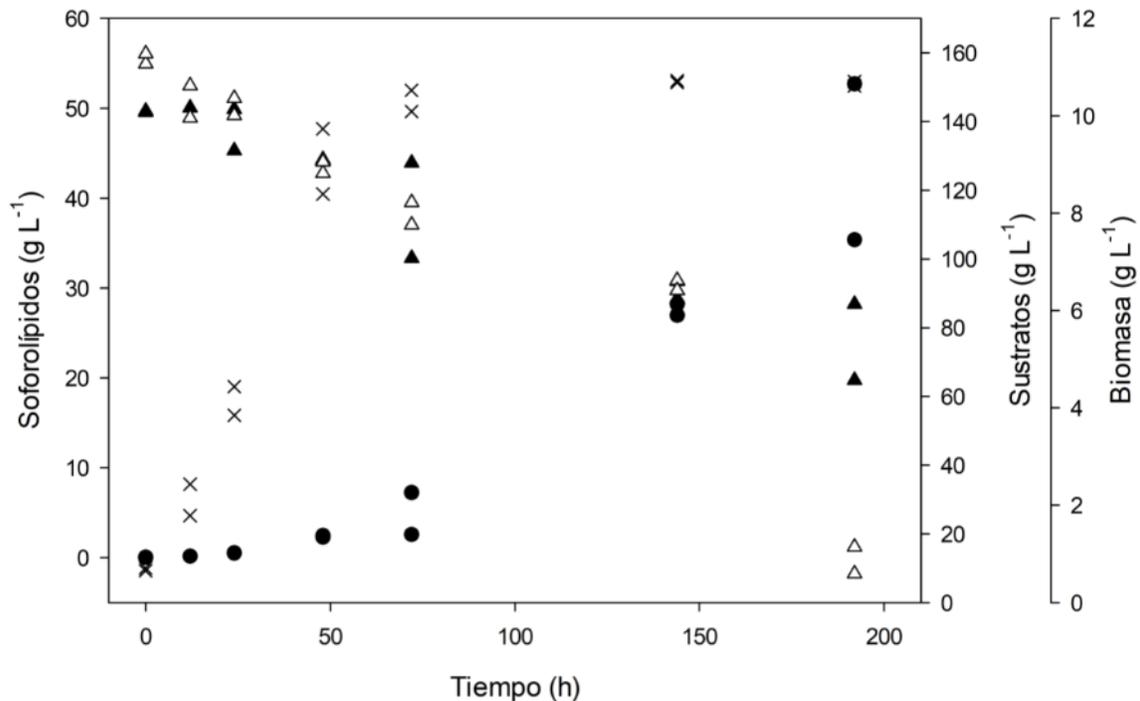


Figura 7-12 Cinética del CML de *S. bombicola*. Se muestra: el crecimiento microbiano (x), producción de soforolípidos (●), consumo de aceite (▲) y consumo de glucosa (△)

El crecimiento celular de *S. bombicola* medido, mediante peso seco (g/L), fue ajustado al modelo logístico, obteniéndose un coeficiente de correlación $r^2 = 0.994$. Los parámetros de la ecuación obtenidos (con un intervalo de confianza de 95%) fueron los siguientes: $X_{\text{máx}} = 10.64 \pm 0.35 \text{ g L}^{-1}$, $X_0 = 0.79 \pm 0.27 \text{ L}^{-1}$ y $\mu = 0.088 \pm 0.014 \text{ h}^{-1}$.

La producción de soforolípidos fue ajustada al modelo descrito por Soto-Cruz et al. (2002), ecuación 7-2, el cual está basado en el modelo logístico de crecimiento, ecuación 7-1, y el modelo de Luedeking y Piret (1959) para la producción de

metabolitos, ecuación 7-3. Este último contiene dos parámetros, α y β , los cuales están relacionados, respectivamente, con la producción asociada y la no asociada al crecimiento. El modelo se ajustó considerando $P_0=0$ y se obtuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0.968$. Los parámetros de la ecuación obtenidos fueron (con un intervalo de confianza de 95%): $\alpha = -0.649 \pm 0.590$ y $\beta = 421.967 \pm 76.15$.

Derivado de estos ajustes es posible deducir un punto importante. En el modelo ajustado a la producción de soforolípidos se observa la diferencia de magnitudes de los coeficientes α y β , siendo el segundo 650 veces más grande que el primero ($|\beta|/|\alpha| = 650.18$). De esta forma se puede considerar que α , el coeficiente de producción asociada al crecimiento es despreciable frente a β , el coeficiente de producción no asociada al crecimiento. Gaden (1959) clasifica los procesos de fermentación tres grupos: I. Procesos en los que el producto principal aparece como resultado del metabolismo energético primario, II. Procesos en los que el producto principal se genera indirectamente de reacciones del metabolismo energético y III. Procesos en los que el producto principal no se genera a partir del metabolismo primario, sino que es elaborado de forma independiente por las células. La extrapolación de lo señalado por Gaden al modelo de Luedeking y Piret sería: Tipo I: $\alpha \neq 0, \beta = 0$; Tipo II: $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$; y Tipo III: $\alpha = 0, \beta \neq 0$. Por lo que la producción de soforolípidos por *Starmarella bombicola* en CML estaría incluido en el tipo III, es decir una producción no asociada al crecimiento. Esto concuerda con lo observado por Davila *et al.* (1992) quienes señalaron, a partir de sistemas de CML, que la producción de soforolípidos no estaba asociada al crecimiento.

Según Gilmanov *et al.* (2002) la producción de soforolípidos es altamente dependiente de la disponibilidad de oxígeno y en el caso del cultivo en medio líquido, derivado de la baja solubilidad de O_2 en agua, fácilmente se puede llegar a concentraciones debajo del umbral necesario para obtener rendimientos altos del biosurfactante si no se cuenta con una aireación y/o agitación adecuadas. Es probable que esta situación se presente al usar matraces, incluso aquellos que cuenten con deflectores, tal como los bafleados, como biorreactores, sin embargo, su utilización es justificada por la cantidad de unidades experimentales requeridas

por el diseño experimental, así como la indisponibilidad de sistemas más eficientes para el CML, ya que permiten tener muchas unidades experimentales sin una inversión de recursos mayor.

A pesar del probable inconveniente de obtener bajas productividades por un nivel subóptimo de oxígeno, es posible observar claramente el comportamiento de la levadura en el CML. La producción de los soforolípidos comienza a la par de la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo, como es característico en la aparición de metabolitos secundarios. La producción del biosurfactante parece no estar asociada con el crecimiento. Otro punto a destacar es el agotamiento de la glucosa, que se observa próximo en el tiempo final, mientras que el aceite continúa presente en altas cantidades en el medio. Este hecho es comprensible, ya que el consumo de este monosacárido generalmente está favorecido por su pronta incorporación al metabolismo y la presencia de transportadores de glucosa en las membranas de diversos microorganismos, sin embargo, es importante resaltarlo para considerar la adición de glucosa al medio en un tiempo estimado por el estudio cinético en caso de que se desee configurar un proceso tipo lote alimentado que pudiera ser más eficiente, tal como lo señalan diversos autores tales como Dolman *et al.* (2017) o Kim *et al.* (2009). Para optimizar el proceso, además de considerar la adición de la(s) fuente(s) de carbono hidrofílica(s) en diferentes etapas de la fermentación tipo lote alimentado, también debe considerarse la adición de la(s) fuente(s) de carbono hidrofóbica(s) y la remoción de los soforolípidos ya que estos, señala Dolman *et al.* (2017), inhiben la producción al incrementar la viscosidad del medio y disminuir considerablemente la oxigenación.

La Figura 7-13 muestra la comparación de los modelos de producción de soforolípidos, basados en este trabajo, en CMS y CML en un lapso de 192 horas. Se puede observar que la producción exponencial del biosurfactante inició primero en el CMS, dentro de las primeras 24 horas de fermentación, y la producción continuó hasta las últimas horas con una tendencia asintótica debido a la desaceleración que responde al agotamiento de las fuentes de carbono en el cultivo, esto también se puede apreciar en la Figura 7-9. Por otra parte, la producción en el

CML se aprecia hasta las 48 horas. En la Figura 7-12, del CML, se puede observar que las fuentes de carbono no se habían agotado al finalizar el experimento, esta diferencia entre los dos sistemas puede responder a la disponibilidad de oxígeno, el cual es de suma importancia para el aprovechamiento de los sustratos para la producción de los soforolípidos. De esta manera la comparación entre los dos tipos de cultivo indica que con el CMS se obtienen rendimientos más altos y un proceso más eficiente en las condiciones estudiadas.

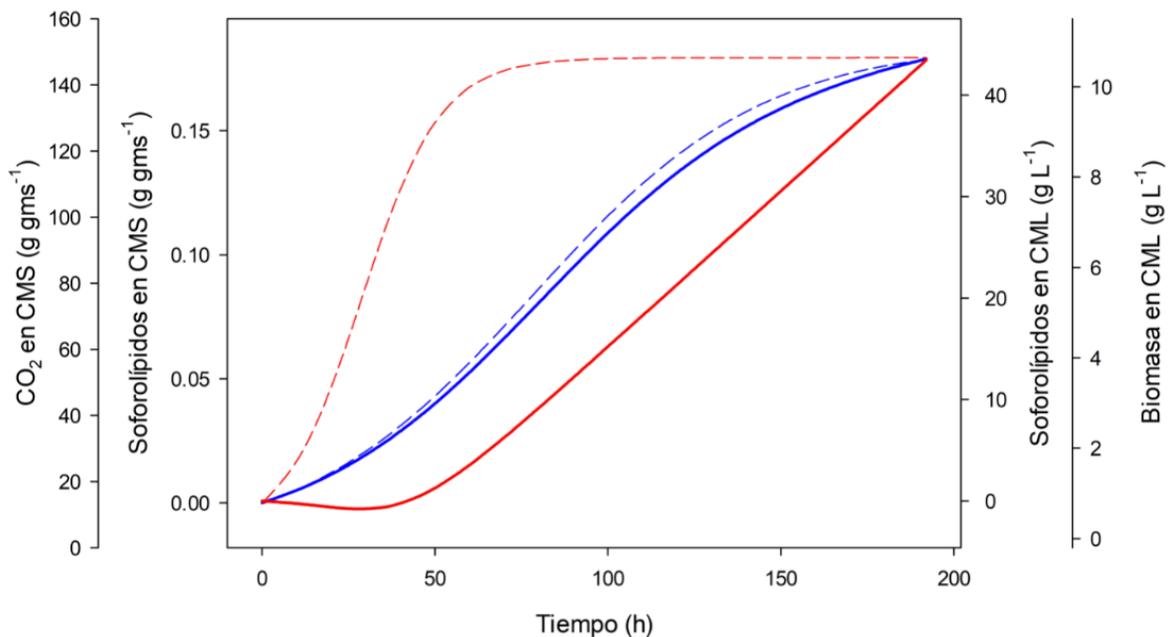


Figura 7-13 Comparación de las cinéticas de producción de soforolípidos ajustadas con el modelo de Soto-Cruz et al. (2002) para CML (rojo) y CMS (azul). La línea sólida representa producción de soforolípidos y la punteada biomasa en CML y producción de CO₂ en CMS.

Un comparativo con los resultados de rendimiento hallados en la literatura se muestra en la Figura 7-14, los casos de CML fueron seleccionados con base en la similitud de los sustratos utilizados con los de este trabajo (aceite vegetal con glucosa). Los casos de CMS se seleccionaron al ser los que reportan claramente los rendimientos y representan casi el total de publicaciones de CMS con *S. bombicola*. Los rendimientos se calcularon como la relación entre los gramos de soforolípidos obtenidos con los gramos de sustratos utilizados (hidrofílico + hidrofóbico) al tiempo final. Al comparar los rendimientos de este trabajo, el CMS

($0.465 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$) destaca sobre el CML ($0.239 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$). Como ya se ha mencionado, esto puede derivarse de un nivel de oxígeno subóptimo en el CML, aun cuando en este caso se utilizaron matraces con agitación orbital como biorreactores con 20% de llenado. Al analizar los resultados de CML de la literatura, en la Figura 7-14, se puede ver que los rendimientos son mayores que los obtenidos en el CML de este trabajo, un ejemplo es el resultado de Zhou *et al.* (1992) quienes con un CML obtuvieron el rendimiento más alto reportado ($0.683 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$), Las condiciones de proceso fueron muy diferentes al utilizar un biorreactor de 20 L (con un volumen de trabajo de 15 L) y aireación (15 L min^{-1}), en donde se tuvo control de la oxigenación del medio, en ese caso la concentración final de soforolípidos alcanzó los 140 g L^{-1} , uno de los valores más altos reportados. Sin embargo, el rendimiento del CMS reportado en este trabajo es comparable o superior al resto de los resultados del CML de la literatura mostrados en la Figura 7-14, es importante mencionar que el resultado de Cooper y Paddock (1984) de $0.344 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, el de Daverey y Pakshijaran (2010) de $0.167 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$ y el de Maddikeri *et al.* (2015) de $0.463 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, fueron obtenidos con cultivos en biorreactores agitados con aireación, mientras que el de Parekh *et al.* (2012), con un rendimiento de $0.300 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, se llevó a cabo en matraces con agitación orbital, similares a los usados en este trabajo.

El rendimiento del CMS de este trabajo es comparable al obtenido por Jiménez-Peñalver *et al.* en 2016, en ese estudio los autores utilizaron residuos de la extracción del aceite de girasol y melaza como sustratos. Cabe señalar que el rendimiento máximo que reportan en la publicación ($0.424 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, calculado con base en sus resultados reportados) se obtuvo al implementar agitación intermitente en el proceso.

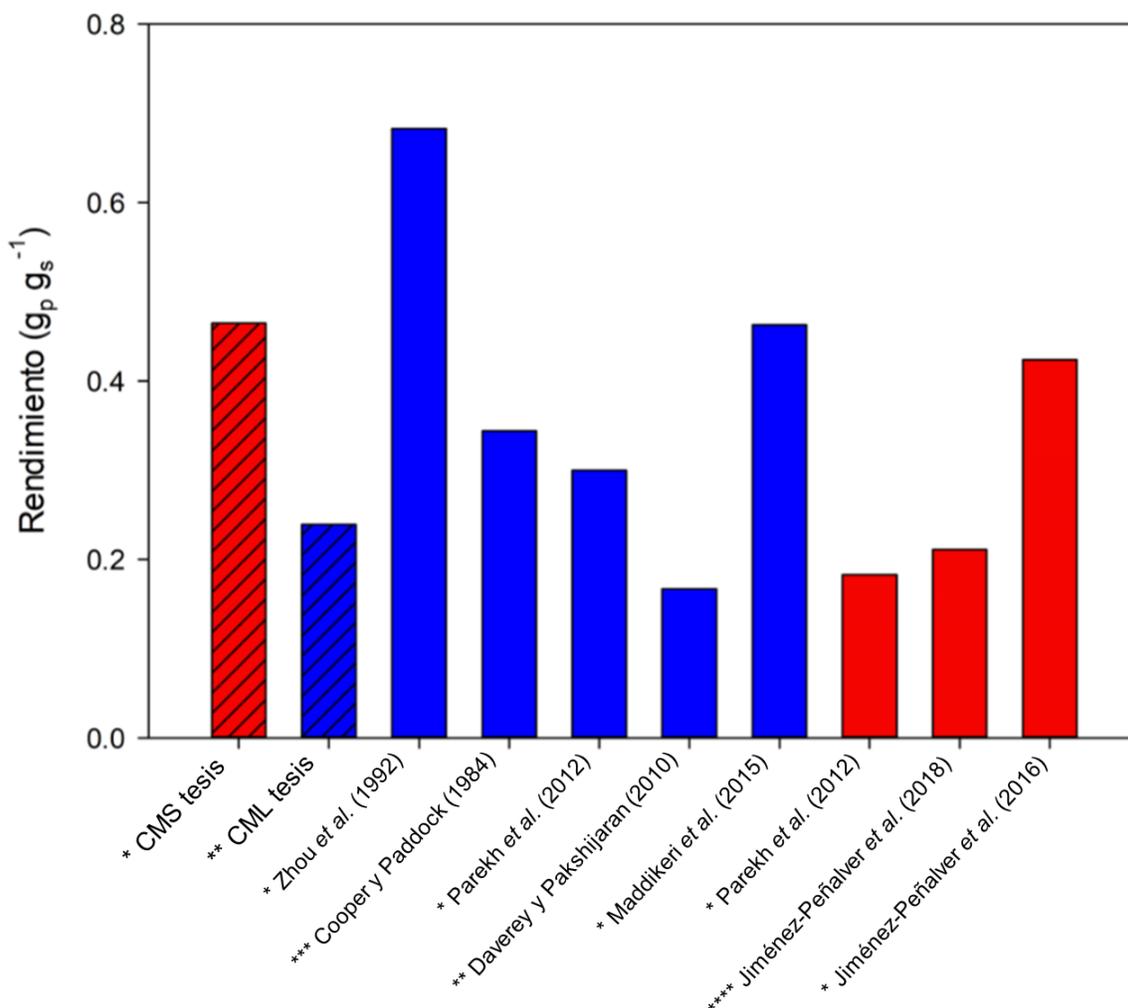


Figura 7-14 Comparativo de rendimiento de cultivos en medio sólido (rojo) y medio líquido (azul) de la literatura y este trabajo. Los asteriscos indican la duración del proceso de cultivo: *240, **192, ***150 h, ****312 h.

Un punto relevante que es importante considerar es la comparación de la composición de los productos de ambas fermentaciones (CMS y CML), mismos que fueron obtenidos mediante la extracción del material fermentado con acetato de etilo. Estos extractos se analizaron mediante HPLC, fase reversa (metanol 100%, columna Kromasil C18 250 x 4.6 mm) acoplado a un detector UV-Vis (PDA) y a un detector ELSD. El objetivo de este análisis fue comparar cualitativamente ambas mezclas, al visualizar la presencia o ausencia e intensidad de picos correspondientes a las diferentes especies que las componen. Los cromatogramas obtenidos con el detector ELSD (Figura 7-15) muestran las especies que no son

volátiles, entre las que se incluyen los diferentes tipos de soforolípidos, mientras que los obtenidos mediante el detector PDA (Figura 7-16) muestran las especies que absorben a la longitud de onda especificada (210 nm). En los cromatogramas se señala como punto de referencia al soforolípido lactónico C18:1 diacetilado que fue caracterizado en este trabajo; así es posible sugerir las zonas donde se encontrarían los soforolípidos de mayor o menor polaridad con respecto a este. La polaridad en el caso de los soforolípidos se ve afectada por la presencia de insaturaciones, la acetilación en la soforosa y de manera muy importante por su conformación acídica o lactónica.

Los soforolípidos insaturados son ligeramente más polares que los saturados, esto es debido a que los electrones del enlace π son más polarizables, contribuyendo a la presencia de momentos dipolares instantáneos (Wade, 2004). La acetilación disminuye la polaridad ya que los grupos hidroxilo son más polares que los acetilos, por lo que en fase reversa (fase estacionaria no polar + fase móvil polar) los soforolípidos no acetilados tendrán menores tiempos de retención que los acetilados. Finalmente, la configuración acídica es más polar que la lactónica, ya que el ácido carboxílico y un hidroxilo se condensan para formar el éster que es notablemente menos polar, de manera que serán los acídicos los que tendrán menores tiempos de retención en este sistema.

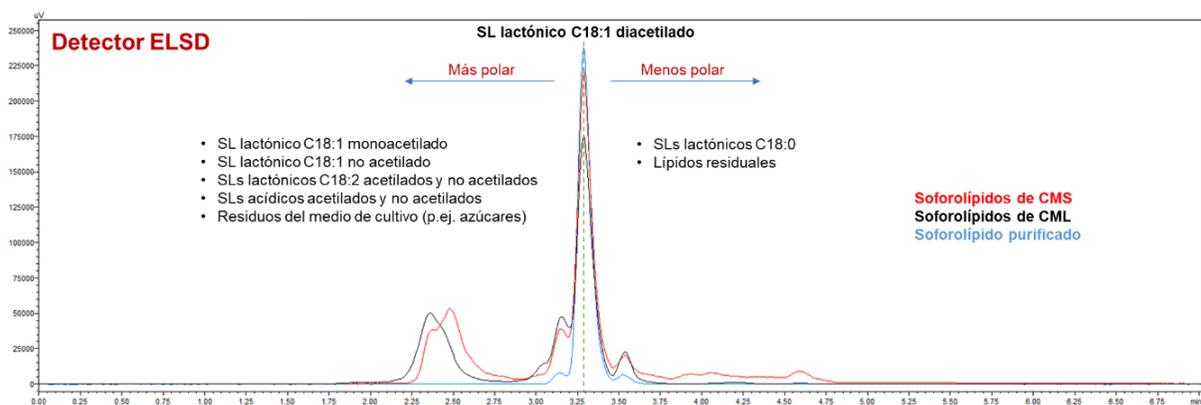


Figura 7-15 Comparación cromatográfica de los productos del CMS (rojo) [muestra]: 5 mg/mL, CML (negro) [muestra]: 5 mg/mL y el Soforolípido purificado y caracterizado en este trabajo (azul) [muestra]: 1.5 mg/mL. HPLC fase reversa, detector ELSD (30°C, ganancia: 6). Se indica como punto de referencia el soforolípido lactónico C18:1 diacetilado que se caracterizó en este trabajo.

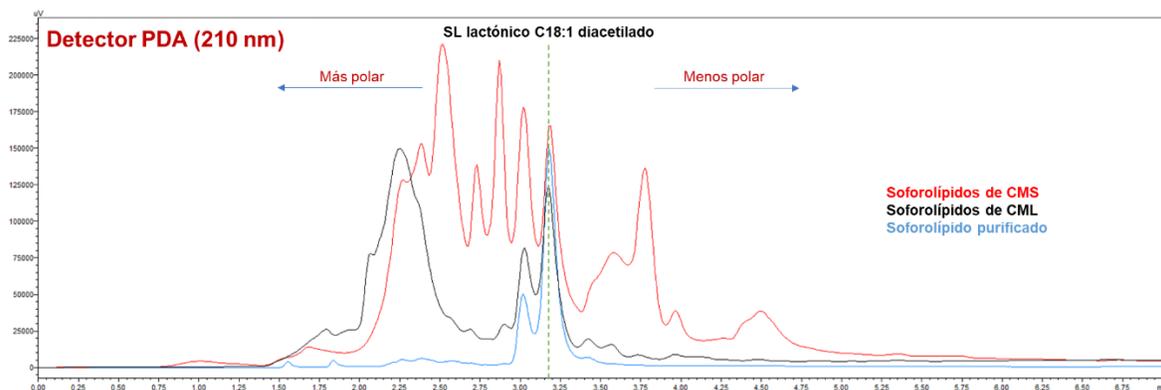


Figura 7-16 Comparación cromatográfica de los productos del CMS (rojo) [muestra]: 5 mg/mL, CML (negro) [muestra]: 5 mg/mL y el Soforolípido purificado y caracterizado en este trabajo (azul) [muestra]: 1.5 mg/mL. HPLC fase reversa, detector PDA (210 nm). Se indica como punto de referencia el soforolípido lactónico diacetilado que se caracterizó en este trabajo.

Tanto el producto del CMS como el del CML presentan un pico intenso en ELSD a 3.3 min (3.2 min PDA) correspondiente al soforolípido lactónico diacetilado C18:1, siendo más intensa en el CMS que en CML. Considerando que ambas mezclas fueron analizadas en la misma concentración es posible sugerir que esta especie se encuentra en mayor concentración en el CMS, siendo esta especie la mayoritaria en la mezcla. El pico que aparece en ELSD a 2.35 minutos en el CML se encuentra en mayor proporción que en CMS, podría tratarse de un conjunto de especies de soforolípidos ácidos, a juzgar por su bajo tiempo de retención y por tanto su mayor polaridad. El pico en 2.5 minutos en el CMS en el ELSD, también con un corto tiempo de retención, podría tratarse también de un grupo de soforolípidos ácidos.

Es preciso mencionar los tres grandes picos que aparecen en el PDA en el caso del CMS entre 2.5 y 2.9 minutos que no parecen estar presentes en el ELSD. Se tratarían de compuestos que son volátiles y/o se encuentran en pequeñas concentración y que por su estructura química su absorbancia es alta a 210 nm, quizá compuestos con varias insaturaciones o dobles enlaces conjugados en los que se den transiciones electrónicas del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Siguiendo a la derecha, en el ELSD aparece en 3.15 minutos un pico que es común a los tres cromatogramas, este podría ser un soforolípido lactónico con más de una insaturación (p.ej. C18:2) a juzgar por la intensidad de su pico en el PDA en 3.05 minutos. Siguiendo en tiempos de retención más altos, podemos observar otra

especie en común en 3.55 minutos del ELSD, esta podría ser un soforolípido saturado C18:0 a juzgar por su baja absorbancia en el PDA (3.45 minutos).

A tiempos de retención más altos se encuentran las especies menos polares. En el caso del CMS se observan algunos picos en el ELSD entre 3.9 y 4.6 minutos. En esta zona se podrían localizar residuos de la fuente de carbono lipídica (triglicéridos, ácidos grasos, etc.) o bien residuos del soporte, en este caso aserrín. Se observa que estas especies se encuentran en menores proporciones en el CML.

En conclusión, se puede observar un alto grado de similitud entre los productos del CMS y CML, sobre todo al observar los cromatogramas de ELSD que nos muestran las especies no volátiles. Sin embargo, existen algunas diferencias que vale la pena mencionar, como la presencia de especies que presentan alta absorbancia a 210 nm en el CMS, así como las especies que aparecen en tiempos de retención altos que no están presentes en el CML. Así mismo, el CMS parece tener una mayor proporción del soforolípido lactónico diacetilado C18:1.

Una vez observada la similitud de los productos mediante la comparación en HPLC se procedió a comparar su efecto en la tensión superficial del agua. Este análisis se llevó a cabo utilizando un tensiómetro Dataphysics (DCAT 11) mediante el método del anillo de Du Noüy. La disminución de la tensión superficial del agua es una de las principales funciones de un surfactante y está relacionada con su desempeño en diversas aplicaciones. La tensión superficial y la interfacial tenderán a disminuir al incrementarse la concentración de un surfactante en la solución, pero este decremento se detiene al llegar a la concentración micelar crítica (CMC). En este punto la adición de más surfactante solo genera la aparición de micelas sin tener un efecto apreciable en la tensión superficial. La Figura 7-17 muestra el efecto de la concentración del producto de ambas fermentaciones. No se observa una diferencia significativa entre ambas opciones. La CMC se alcanza en ambos casos alrededor de las 100 ppm. La tensión superficial mínima alcanzada con el producto del CMS fue de $34.26 \pm 0.08 \text{ mN cm}^{-1}$ mientras que con el CML fue $34.14 \pm 0.29 \text{ mN cm}^{-1}$. En

conclusión, el comparativo de la reducción de la tensión superficial no permite diferenciar los productos del CMS y CML.

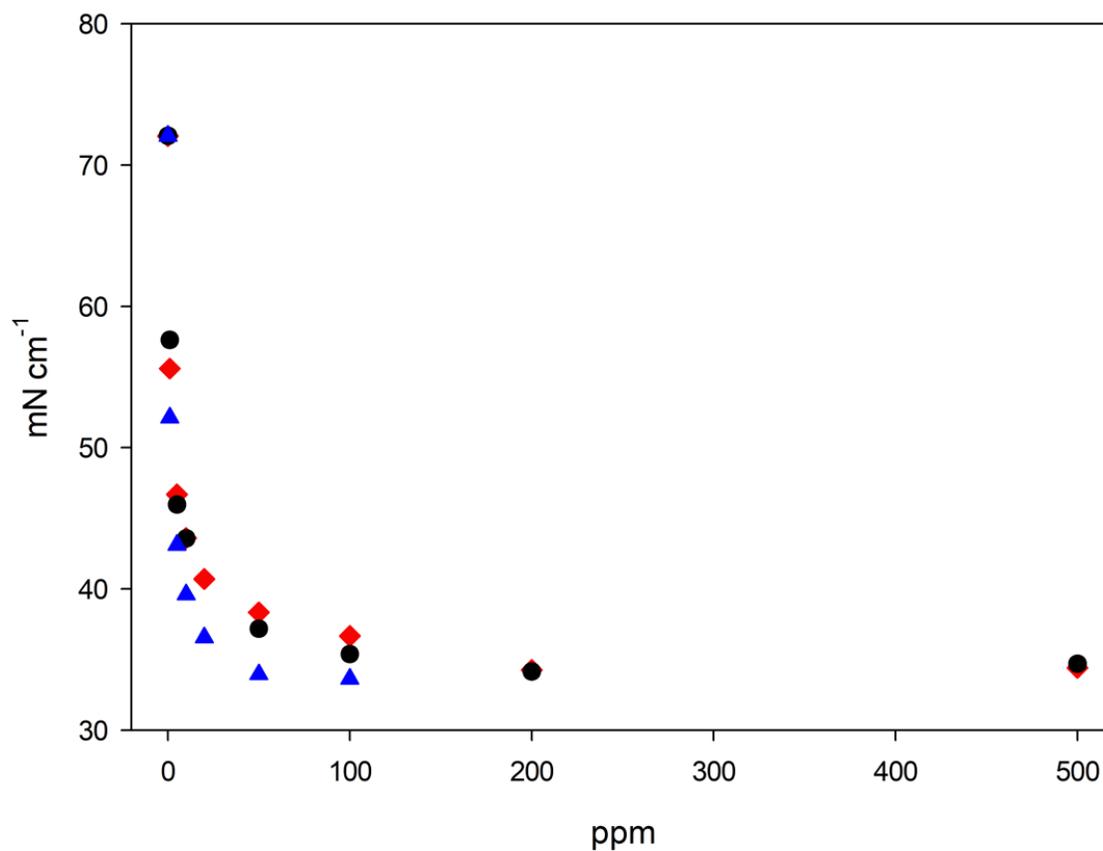


Figura 7-17 Efecto del producto del CMS (rojo) y CML (negro), así como del soforolípido lactónico purificado (azul) en la tensión superficial del agua a 20°C mediante el método del anillo de Du Noüy. Se observa que el comportamiento es similar en los productos de CMS y CML. La TS con SL purificado únicamente se midió hasta las 100 ppm que estaba cerca del límite de solubilidad de este compuesto en agua.

7.4. Purificación a partir de la mezcla cruda obtenida del CMS

Se recurrió a la cromatografía preparativa en columna para purificar la mezcla cruda extraída del CMS en sus diferentes componentes. La mezcla cruda está compuesta de soforolípidos lactónicos y acídicos, los cuales pueden o no estar acetilados, el extremo lipídico de estas moléculas puede o no contener insaturaciones, todo esto aunado a la presencia de residuos de sustratos, diversos metabolitos, la resina del soporte y otras sustancias, hacen de esta una mezcla muy compleja. Sin embargo, es sabido que uno de los compuestos principales de la fermentación de *Starmmerella bombicola* son los soforolípidos lactónicos.

El proceso de purificación se realizó con una columna preparativa de vidrio de 80 mL de capacidad. La columna fue empacada con 25 g de sílica suspendida en cloroformo y metanol 95:5 (v:v). Esta mezcla de solventes fue utilizada como fase móvil aplicando un gradiente desde 95:5 hasta 80:20. La cantidad de muestra cruda de soforolípidos colocada en la columna fue de 1.5 g aproximadamente. Se recolectaron 18 fracciones, 12 de las cuales (de la 5 a la 18) contenían a los soforolípidos semipurificados, mientras que las cuatro primeras contenían aceite residual. Las especies de soforolípidos contenidas en dichas fracciones pueden observarse en las placas de cromatografía en capa fina mostradas en la Figura 7-18.

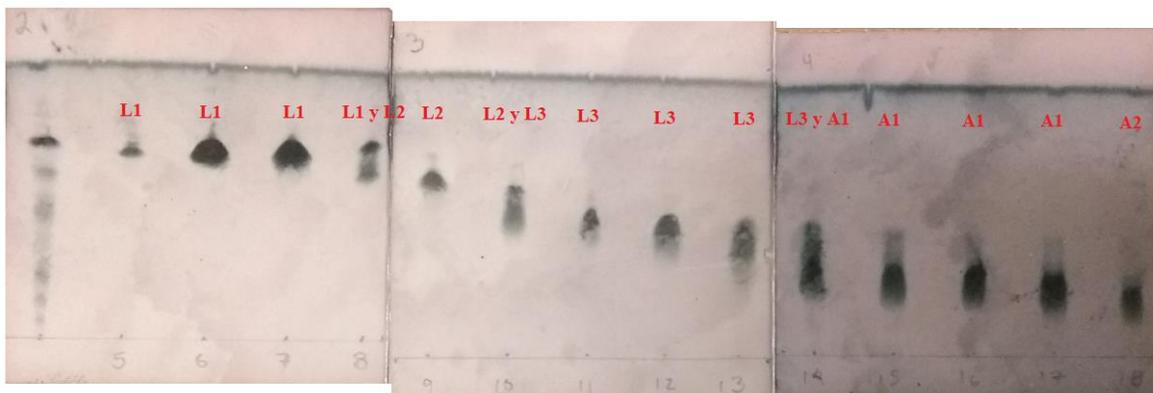


Figura 7-18 Fracciones provenientes de la cromatografía preparativa analizadas con cromatografía en capa fina. En rojo se indica la especie a la que corresponde el spot, L indica lactónico y A ácido.

La Tabla 8.2 presenta los factores de retención (R_f) de cada uno de los puntos del primer carril de la Figura 7-18, que corresponde a la separación de la mezcla cruda del CMS. Las especies fueron identificadas como A para acídicas y L para lactónicas. Esta aseveración se basa en lo establecido por Asmer *et al.* (1988) quienes describieron la separación de estas especies mediante un sistema de TLC previamente desarrollado por Cooper y Paddock (1984) e indicaron el orden de elución y los respectivos R_f con el mismo sistema que fue utilizado en el presente trabajo.

Tabla 7.2 Factor de retención (R_f) para cada especie en la mezcla cruda, correspondiente a la primera línea de la figura 8-15.

Especie	R_f
A3	0.09
A2	0.14
A1	0.23
L3	0.46
L2	0.60
L1	0.69

La Tabla 8.3 presenta los R_f de las especies que lograron ser separadas y recuperadas mediante cromatografía preparativa y que se muestran en la Figura 7-18 a partir del segundo carril. Fue posible obtener fracciones enriquecidas con 5 especies diferentes del producto extraído del CMS. Posteriormente, se optó por caracterizar la fracción 7, que corresponde a la especie identificada como L1, la razón de esta elección fue la gran intensidad que presentaba después del revelado con p-anisaldehído en comparación con las demás.

Tabla 7.3 Factor de retención (R_f) para cada especie de las fracciones obtenidas con cromatografía preparativa.

Fracción	Especie
5	L1
6	L1
7	L1
8	L1 y L2
9	L2
10	L2 y L3

11	L3
12	L3
13	L3
14	L3, A1
15	A1
16	A1
17	A1
18	A2

En la Figura 7-19 se muestra el sólido obtenido de la fracción 7. Se trata de un polvo blanco, que contrasta con la mezcla cruda, una sustancia viscosa color ámbar. También se muestra la apariencia del sólido resultante de una recristalización en metanol, llevada a cabo con el fin de incrementar la pureza del producto. Las figuras 7-15 y 7-16 muestran los cromatogramas de ELSD y PDA del compuesto purificado en esta etapa. Se observa que existe un pico predominante y al menos dos más en pequeñas proporciones.



Figura 7-19 Comparación de la mezcla cruda (izquierda) con los soforolípidos semipurificados usando cromatografía preparativa (centro) y recristalizados (derecha)

7.5. Caracterización del soforolípido purificado

La estructura del compuesto se elucidó utilizando espectroscopía de infrarrojo FTIR, espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN). Gracias a la información obtenida con dichas técnicas fue posible proponer una estructura para el soforolípido. Además, también fue evaluada su estabilidad térmica mediante un análisis termogravimétrico (TGA).

7.5.1. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 7-20 se muestra el espectro de FTIR obtenido con ATR del producto purificado en un rango de frecuencias de 500 a 4000 cm^{-1} . Se pueden observar bandas correspondientes a hidroxilos, alquenos, alcanos, ésteres y éteres, las cuales se listan en la Tabla 8.4.

El pico romo y ancho centrado en 3368 cm^{-1} es característico de tensión -O-H en alcoholes. Su aparición es un claro indicio de la presencia de hidroxilos, que en este caso pertenecerían a la soforosa. Asimismo, las señales en torno a 1000 cm^{-1} indican tensión -C-O.

La señal en 1744 cm^{-1} se debe a la tensión C=O, además, esta frecuencia en particular se encuentra en una zona característica de carbonilos de ésteres. Es importante destacar que cuenta con una protuberancia, u hombro, que posiblemente indica la presencia de carbonilos no equivalentes, los cuales podrían corresponder a los esterios de los acetilos y del enlace lactónico.

Las bandas en 3001 y 1651 cm^{-1} son resultado de la tensión carbono-hidrógeno en C=C-H y la tensión entre carbonos sp^2 C=C, respectivamente, por lo que su aparición sugiere la presencia de insaturaciones.

Finalmente, las bandas en 2927 y 2854 cm^{-1} son resultado de la tensión C-H en metilos y metilenos.

Figura 7-20 Espectro de FTIR (ATR) del soforolípido purificado.

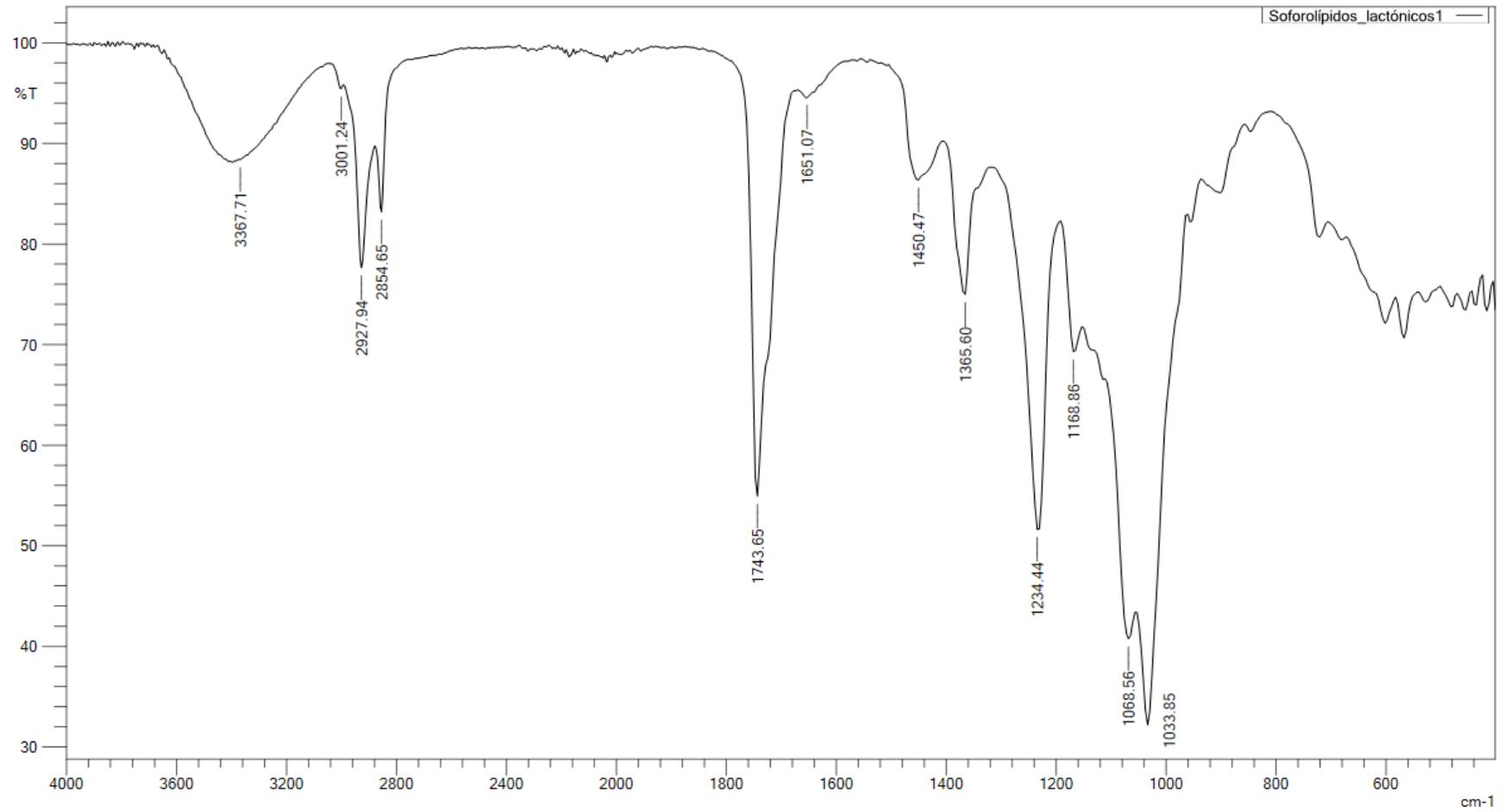


Tabla 7.4 Asignaciones del espectro de FTIR (ATR).

Banda (cm ⁻¹)	Asignación	Grupo funcional
3368	-OH tensión	Alcoholes
3001	-HC=CH- cis, C=C-H tensión	Alquenos
2928	CH ₃ -, C-H tensión	Alcanos
2855	-CH ₂ -, CH ₃ -, C-H tensión	Alcanos
1744	-CH ₂ -CO-O-R, C=O tensión	Carbonilo (en este caso ésteres)
1651	-HC=CH- cis, C=C tensión	Alquenos
1450	-CH ₂ -, CH ₃ -C, C-H torsión	Alcanos
1366	-CH ₂ -CO-O-R, -HC=CH- cis, CH ₃ -C, C-H tensión	Alquenos
1234	-CH ₂ -CO-O-R, C-O tensión	Carbonilo (en este caso ésteres)
1169	-CH ₂ -O-CH ₂ - y -OH secundario, C-O tensión	Éteres y alcoholes
1069	-CH ₂ -O-CH ₂ -, tensión C-O tensión	Éteres y alcoholes

7.5.2. Espectrometría de masas

En este caso se utilizó espectrometría de masas con detección por tiempo de vuelo e ionización por electrospray (ESI/ToF) con ionización en modo positivo, el resultado del análisis ofreció información importante para la determinación del peso molecular de la sustancia mayoritaria de la fracción purificada. En la Figura 7-21 se muestran las señales más intensas, o de mayor abundancia relativa en el rango estudiado. Se trata de las señales en 689.37 y 711.35 m/z. La primera de ellas se identificó como el soforólido ionizado protonado (M+1), por lo cual el peso molecular de la especie sin ionizar (M) es de 688.37 Da. La segunda señal, en 711.35 m/z se identificó como el aducto de sodio (M+Na). Ya que la masa del ion Na⁺ es de aproximadamente 23 Da, el peso de la especie sin el sodio coincide con el señalado anteriormente, 688.35 Da. Esta masa corresponde al soforólido que se encuentra

en mayor proporción en la fracción purificada. Alrededor de las dos señales más intensas se pueden observar pequeños picos que corresponden a impurezas y a moléculas del sofrolípido mayoritario que contienen isotopos pesados (^{13}C), en este último caso la m/z se incrementa en una unidad de manera consecutiva.

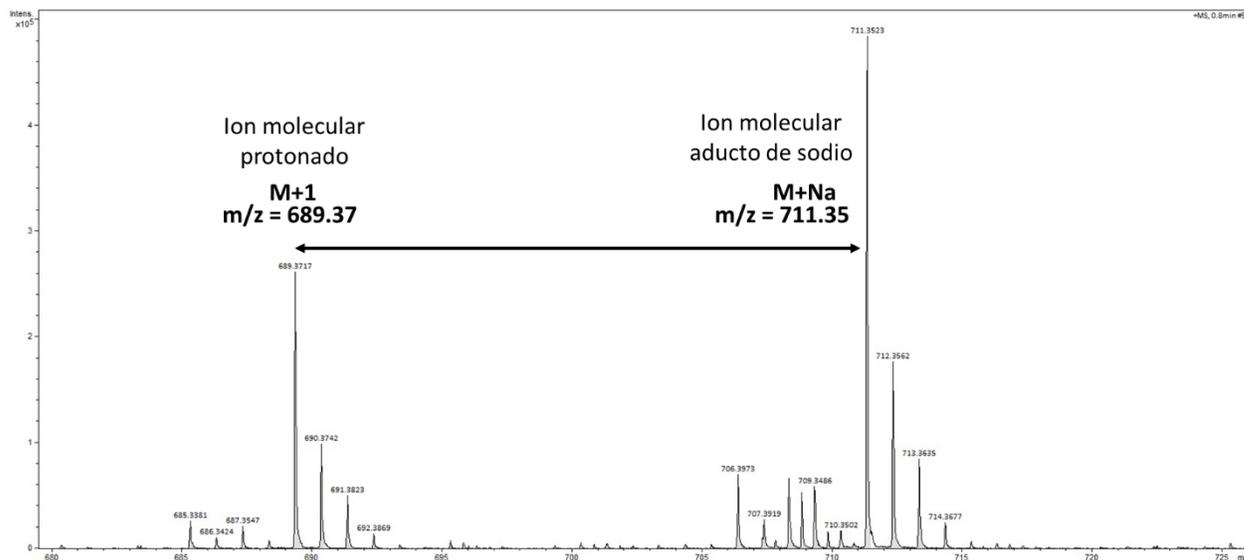


Figura 7-21 Espectro de masas (ESI ToF) de la fracción purificada de sofrolípido

7.5.3. Resonancia magnética nuclear

El sofrolípido purificado fue analizado en un espectrómetro de RMN (Bruker, AVANCE III) de 500 MHz con el que se adquirieron los espectros de RMN unidimensionales de ^1H y ^{13}C , además de los bidimensionales COSY, HSQC y HMBC. Estos últimos al mostrar interacciones homonucleares y heteronucleares a uno, dos o tres enlaces son de gran ayuda para la elucidación estructural del compuesto. Para el análisis, la muestra se disolvió en CDCl_3 . Adicionalmente, para obtener un segundo espectro de ^1H sin las señales de los $-\text{OH}$ se agregó óxido de deuterio a la solución.

Espectro de ^1H

El espectro de protón (^1H) se muestra en la Figura 7-22, las señales aparecen en el intervalo que va desde 1.25 hasta 5.35 ppm y están posicionadas en zonas características de alcanos, alcoholes, éteres y alquenos. Para su integración se utilizó el espectro obtenido de la muestra disuelta en una solución de CDCl_3 con óxido de deuterio (D_2O). La presencia de D_2O provoca la desaparición de las señales de protones intercambiables ($-\text{OH}$, lábiles), mismas que en el primer espectro se traslapaban con señales de otros protones y hacían irregular la línea base, de esta forma se facilitó el procedimiento de integración y análisis. El resultado de la suma de las áreas indica la presencia de 52 protones no intercambiables que se listan en la Tabla 8.5.

Tabla 7.5 Señales del espectro ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, ppm)

δ , ppm	Multiplicidad	J, Hz	No. de protones	Asignación
5.30-5.41	m (9)	6.1	2	j, i
4.93-4.99	t	9.7	1	d''
4.54-4.58	d	7.7	1	a''
4.44-4.47	d	7.8	1	a'
4.26-4.36	m	-	2	f
4.09-4.20	m	-	2	f''
3.73-3.80	m (6)	5.9	1	Q
3.61-3.70	m	-	3	c', c'', e''
3.48-3.56	m	8.6	2	b', b''
3.42-3.48	m	-	1	e'
3.35-3.42	m	9.3	1	d'
2.30-2.42	m (8)	7.3	2	B
2.08	s	-	3	h''
2.07	s	-	3	h'
1.98-2.06	m	7.0	4	h, k
1.53-1.71	m	6.9	2	C
1.43-1.53	m	-	2	P
1.25-1.43	m	.	16	e-g, l-o

1.21-1.25	d	6.0	3	R
-----------	---	-----	---	---

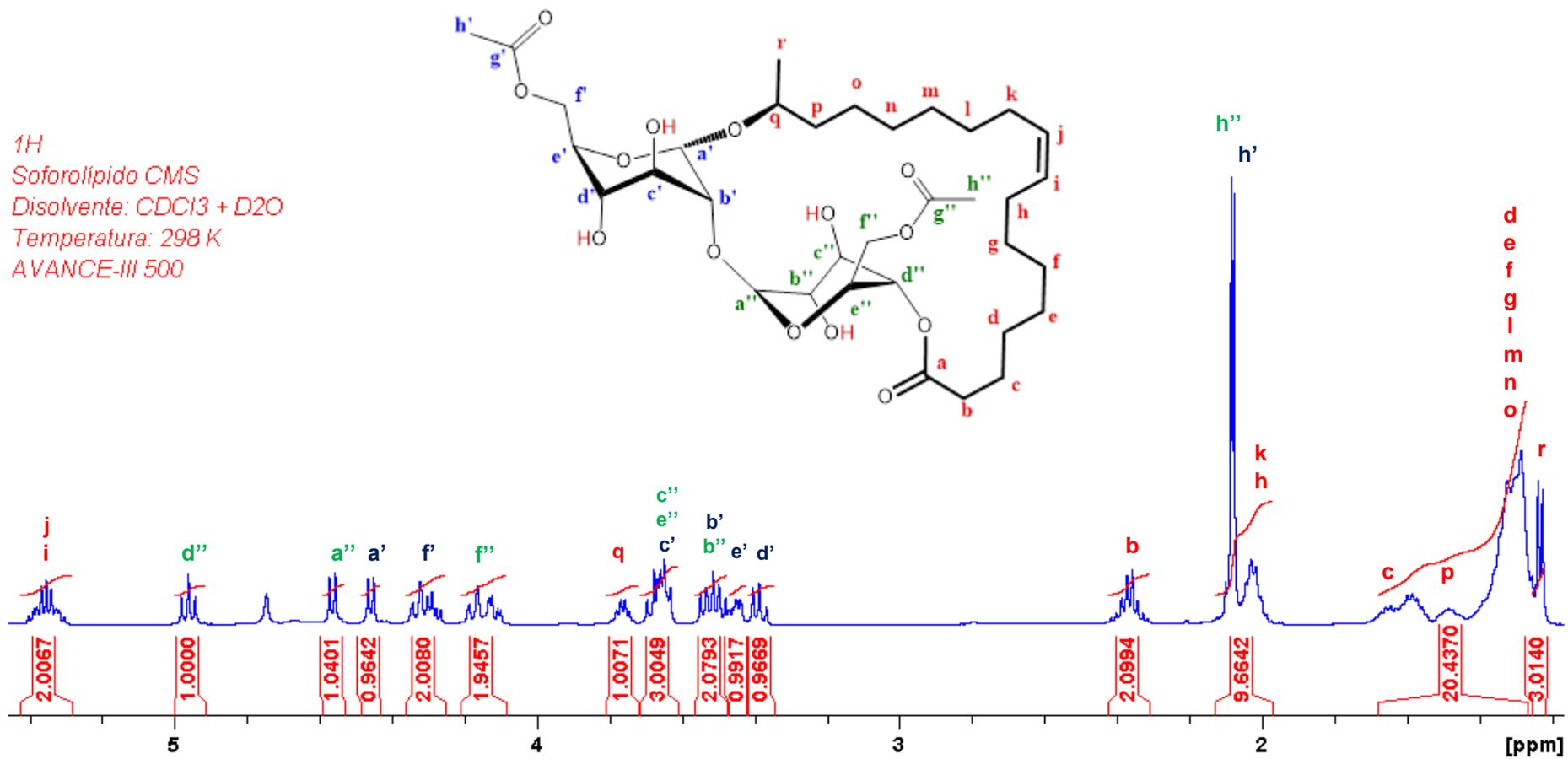
La señal que se encuentra a campo más bajo, δ 5.30-5.41 (m (9), $J = 6.1$ Hz, 2H: j, i) se localiza en una zona característica de protones vinílicos, es decir de protones enlazados a carbonos sp². Esta señal se asignó a un par de protones de dos carbonos del único doble enlace en la molécula.

Siguiendo hacia campos altos, las señales que se encuentran entre 4.93-4.99 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H: d'') y 3.35-3.42 (m, $J = 9.3$ Hz, 1H: d') se localizan en una zona característica de *bases de oxígeno*, es decir protones enlazados a carbonos sp³ que a su vez enlazan con oxígenos. La influencia de dicho elemento es la causa del desplazamiento de estas 13 señales hacia campos bajos, esto se debe a la electronegatividad que genera un efecto de *desapantallamiento* con respecto al campo magnético externo al atraer a hacia él la densidad electrónica.

Finalmente, el resto de las señales en campos altos corresponde a protones enlazados a carbonos sp³ en alcanos con un entorno químico similar y en algunos casos con acoplamientos fuertes lo que hace indistinguibles algunas señales en un análisis directo, particularmente las que se localizan en el multiplete 1.25-1.43 ppm (d, e, f, g, l, m, n, o). Sin embargo, algunas señales son identificables, entre estas cabe destacar a los dos singuletes (h'' y h') en 2.07 y 2.08, cada una con una integral relativa de tres protones, las cuales pertenecen a dos metilos, y su desplazamiento indica que se encuentran adyacentes a un carbonilo (α a carbonilo). Estas dos señales indican que el soforolípido se encuentra doblemente acetilado.

Figura 7-22 Espectro de 1H del soforolípido purificado

1H
Soforolípido CMS
Disolvente: CDCl3 + D2O
Temperatura: 298 K
AVANCE-III 500



Espectro de ^{13}C

El espectro desacoplado de carbono se muestra en la Figura 7-23, en este se pueden observar 34 señales entre 20.77 y 173.35 ppm. Las señales que aparecen en 173.35, 171.59 y 170.50 ppm (a, g', g'') se localizan en una región característica de carbonos carbonílicos de ésteres y corresponden, respectivamente, al éster lactónico formado al condensarse el ácido carboxílico terminal del soforolípido ácido con el hidroxilo del carbono 4'' de la soforosa por acción de la lactonasa en el medio extracelular y a los ésteres de los acetilos en los carbonos 6' y 6''.

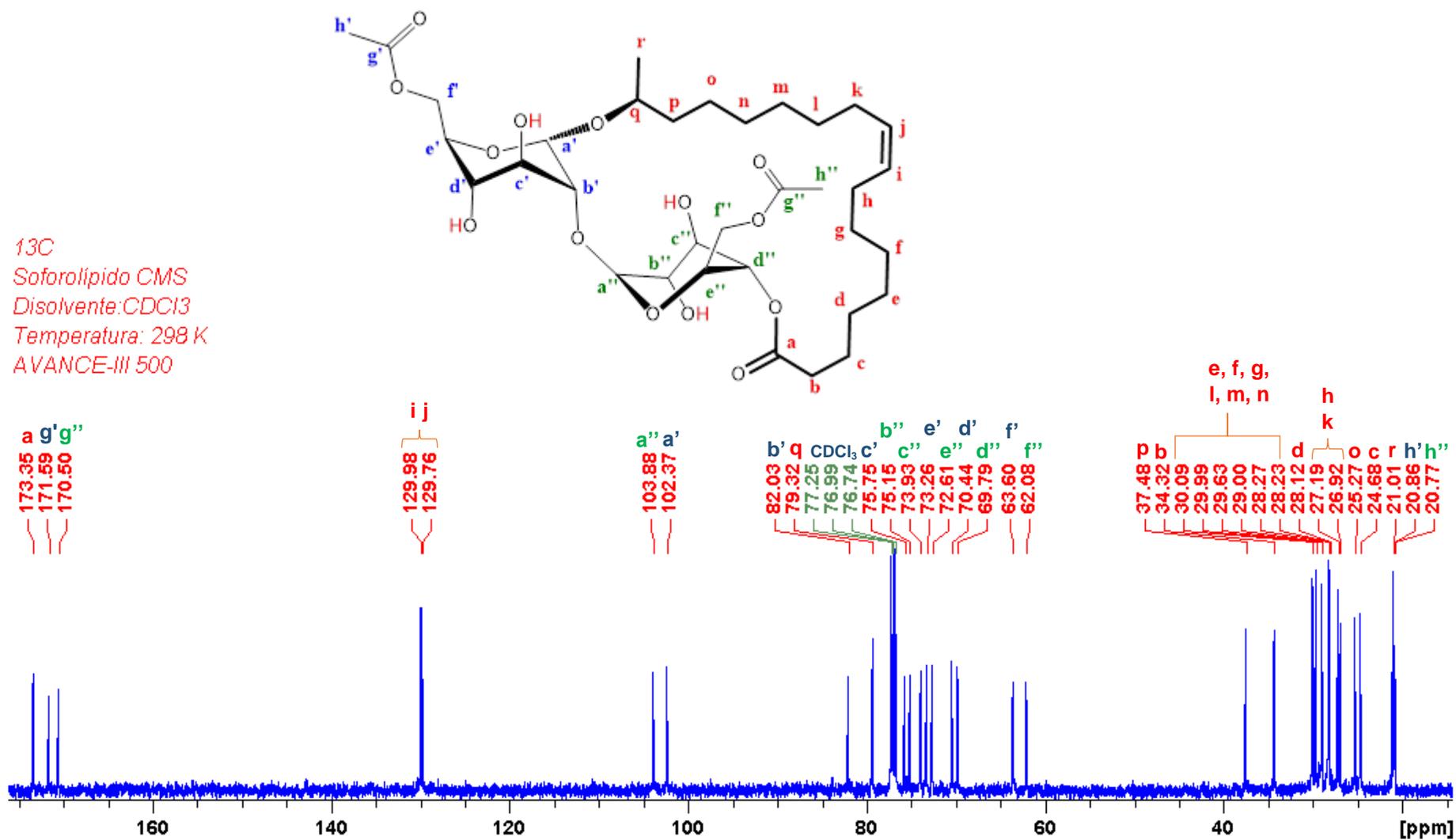
Los carbonos en 129.98 y 129.76 ppm (i, j) se localizan en un intervalo que corresponde a alquenos, es decir, se trata de carbonos sp^2 . El doble enlace que los une se encuentra en la cadena lipofílica de 18 carbonos que, haciendo un paralelo con el ácido oleico usado como sustrato, permite suponer que se encuentra en el carbono 9 del mismo.

Existen dos señales, 102.37 y 103.88 ppm (a', a'') que a decir de su desplazamiento son carbonos cada uno enlazado a dos oxígenos. Este tipo de carbonos se encuentran doblemente desapantallados por el efecto electroattractor del oxígeno. Su desplazamiento químico es característico y relativamente sencillo de identificar. Corresponderían a los dos carbonos anoméricos en las dos unidades de glucosa en la soforosa.

Las señales que se encuentran entre 82.03 y 62.08 ppm (a excepción de 77.25, 76.99 y 76.74 ppm debidas al solvente CDCl_3) son *bases de oxígeno*, es decir, carbonos que se encuentran enlazados a oxígenos. Estos se encuentran en la estructura de la soforosa diacetilada.

Finalmente, el resto de las señales corresponde a carbonos sp^3 que no se encuentran bajo la influencia del oxígeno, estos se localizan en la cadena lipofílica del soforolípido.

Figura 7-23 Espectro de ^{13}C del soforolípido purificado



Espectros bidimensionales

Se obtuvieron los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC para el compuesto purificado. Estos espectros brindan información muy relevante para la elucidación estructural. El primero de ellos muestra el acoplamiento de protones vecinos, es decir, los que se encuentran en carbonos adyacentes. El segundo indica que protones están enlazados a que carbonos. Finalmente, el tercero muestra interacciones a dos o tres enlaces entre protones y carbonos.

Espectro COSY

El espectro COSY es la representación de los acoplamientos de espines de protones vecinos en la molécula. Es simétrico, tanto el eje X como el eje Y son los espectros unidimensionales de ^1H , en él se puede observar una diagonal que cruza del extremo inferior izquierdo al superior derecho. Las señales que se encuentran en la diagonal no son de interés ya que son el cruce de una señal con ella misma, por otra parte, las señales que se encuentran fuera de esta diagonal muestran los acoplamientos espín-espín de núcleos distintos, indicando cuales son adyacentes unos de otros. En la Figura 7-24 se muestra el espectro COSY del soforólido purificado. La señal 1 muestra el acoplamiento de los protones vinílicos de la insaturación (j, i) con sus vecinos, los protones alílicos (h, k), esta involucra a cuatro posiciones debido a que j e i así como h y k son equivalentes, de manera que solo aparece una señal para los cuatro. Las señales 2, 3 y 7 pertenecen a acoplamientos en la unidad de glucosa unida al ácido graso con el enlace lactónico, mientras que las 4, 5 y 8 corresponden a la segunda unidad de glucosa enlazada al ácido graso en su posición $\omega-1$. Las señales 9, 10, 11 y 12 son acoplamientos en la cadena del ácido graso. El resto de los acoplamientos en esta parte de la molécula no son distinguibles debido a que en zonas centrales de la cadena los sistemas se encuentran fuertemente acoplados impidiendo su identificación individual, dichos protones aparecen en torno a 1.25-1.43 ppm.

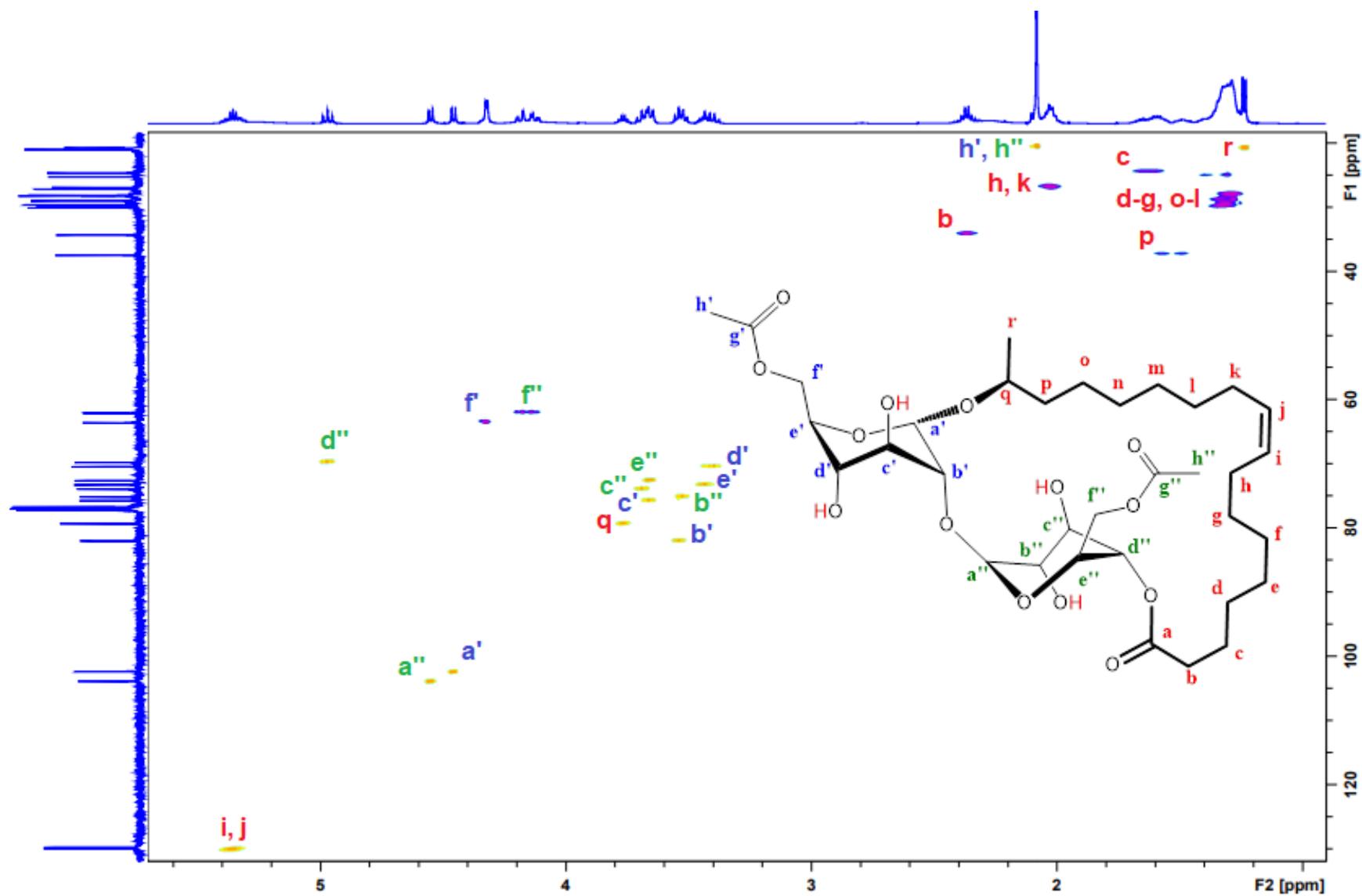
Espectro HSQC

La Figura 7-25 corresponde al espectro HSQC en donde es posible observar las interacciones de los protones (^1H) con los carbonos (^{13}C) a los que estos se encuentran enlazados. El espectro bidimensional correlaciona el espectro de ^1H con el ^{13}C los cuales corresponden a los ejes X y Y respectivamente. Otra característica notable es que presenta a los carbonos de metinos (CH) y metilos (CH_3) en un color y a los carbonos de metilenos (CH_2) en otro, en este caso azul los primeros y amarillo los segundos. Los datos que ofrece son de ayuda para confirmar información obtenida de los espectros ^1H y ^{13}C , es útil particularmente en zonas en donde hay traslapes o acoplamiento fuertes que no permiten en primera instancia identificar claramente señales individuales. Por ejemplo, en 3.61-3.70 ppm del espectro ^1H aparece un multiplete con una integral relativa que corresponde a tres protones. Gracias al espectro HSQC es sencillo observar que se trata de tres metinos (e'' , c'' y c') de los carbonos 72.61, 73.93 y 75.75 ppm.

Tres señales de particular interés son las h' , h'' y r que indican la presencia de tres metilos en la molécula. Se trata, respectivamente, de los metilos de los dos acetilos en 6' y 6'' en la soforosa y del metilo terminal (ω) del ácido graso. Este último metilo existe debido a que durante la biosíntesis de los soforolípidos el ácido graso fue hidroxilado por *S. bombycola* en la posición ($\omega-1$). Esto se confirma con la información del COSY (señal 10) que correlaciona a q , un metino, con r , un metilo. La señal i, j constata el doble enlace en la cadena del ácido graso. Las señales a' y a'' a su vez reafirman la existencia de dos carbonos anoméricos, correspondientes a los carbonos 1' y 1'' en las unidades de glucosa de la soforosa.

Cabe señalar, que el eje correspondiente al espectro de ^{13}C se interrumpe inmediatamente después de las señales en 129.76 y 129.98 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos, debido a que a campos más bajos ya no hay carbonos enlazados a hidrógenos. En la zona omitida solo se encuentran los carbonos carbonílicos de los tres ésteres de la molécula.

Figura 7-25 Espectro HSQC. Muestra enlaces carbono-hidrógeno, distinguiendo entre -CH, -CH₃ (amarillo) y -CH₂ (azul).



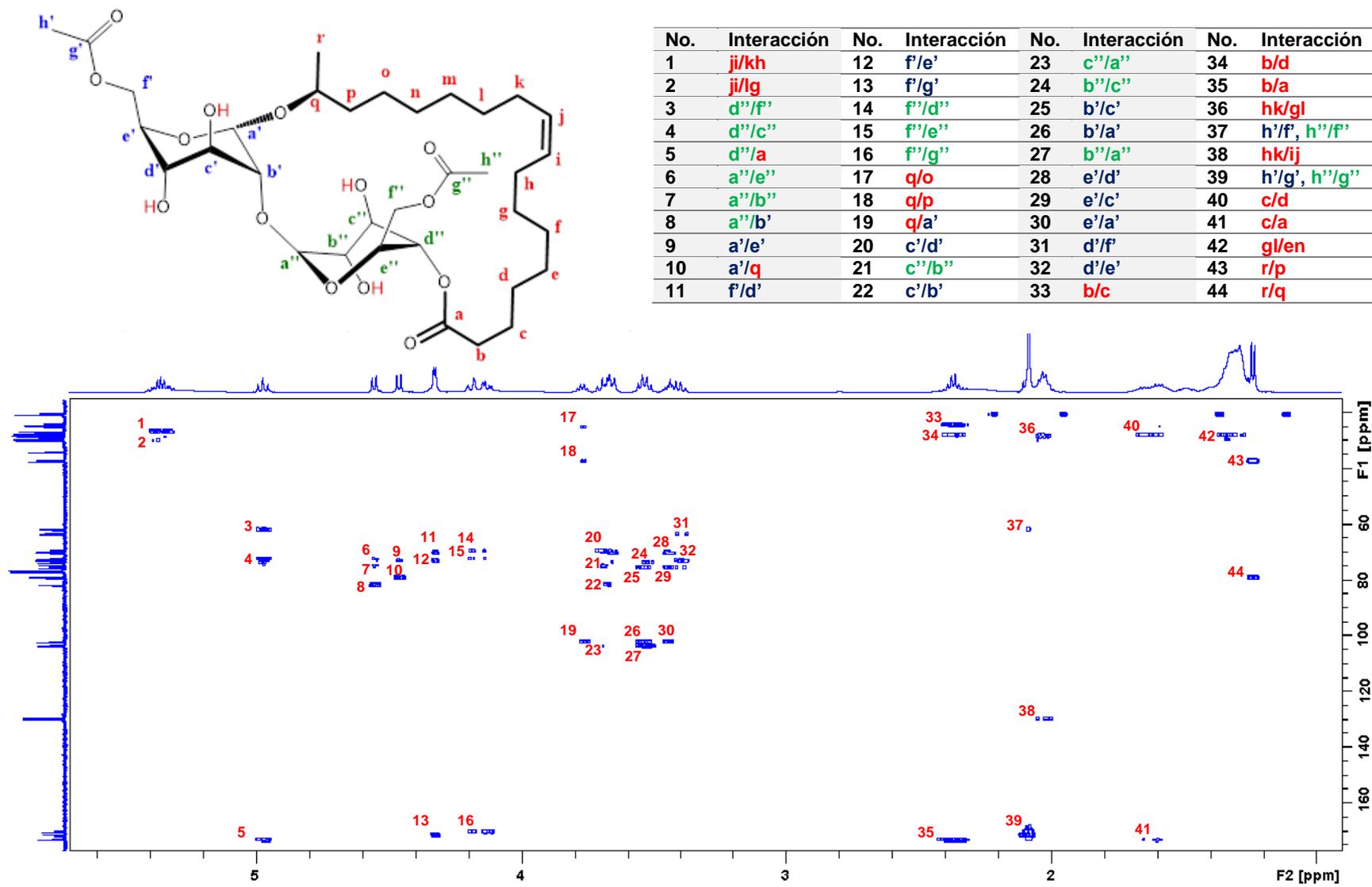
Espectro HMBC

Este espectro muestra los acoplamientos de carbonos e hidrógenos a dos o tres enlaces. La información obtenida por esta herramienta es de gran utilidad para confirmar aspectos estructurales clave para este tipo de compuestos. La primera presunción que puede ser confirmada es la conformación cíclica de la molécula, la señal 5 (d''/a), en la Figura 7-26, indica que el carbono carbonílico del ácido graso interactúa con el protón del carbono 4'' de la soforosa mediante enlaces covalentes, donde se encuentra el enlace lactónico. La señal 10 (a'/q) claramente indica el acoplamiento del protón del carbono anomérico 1' de la soforosa con el carbono ω -1 del ácido graso, se puede asegurar que se trata del carbono ω -1 usando la información del COSY que muestra el acoplamiento de los protones del metilo r con el metino q , esto también lo indica la señal 44 del HSQC. Con esto queda confirmado que se trata de una molécula cíclica, un soforolípido lactónico.

La señal 37 a su vez indica que los protones en 2.07 y 2.08 ppm en el espectro ^1H , que corresponden a dos metilos, se acoplan con carbonos 6' y 6'' de la soforosa, corroborando que la molécula está diacetilada en dichas posiciones.

La señal 8 (a''/b') también es de gran importancia al señalar la interacción de los protones y carbonos de las posiciones 2' y 1'' en las dos unidades de glucosa que forman la soforosa, en estos enlaces covalentes, mediante los cuales se acoplan estos núcleos, se encuentra el enlace O-glucosídico del disacárido.

Figura 7-26 Espectro HMBC. Muestra interacciones a dos y tres enlaces.



7.5.4. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico consiste en la medición precisa del cambio en la masa de una muestra al incrementarse la temperatura en un intervalo definido, estos cambios se asocian a procesos tales como deshidratación o descomposición. Las curvas termogravimétricas son características de cada compuesto o sistema.

Se realizó un análisis termogravimétrico al soforolípido purificado proveniente del CMS, el resultado se muestra en la Figura 7-27. En un inicio se observa la pérdida de compuestos volátiles presentes, la pérdida de 1 – 2 % de masa desde 30 a 270°C puede corresponder a moléculas de agua. Se aprecia en la gráfica que el compuesto pierde cerca del 84% de su masa entre 270 y 500°C, en este punto se dan las reacciones de oxidación de las estructuras de carbono, formándose CO₂ y agua. También se puede observar que la muestra purificada contiene solo 0.3% de residuos inorgánicos correspondiente a las cenizas remanentes por encima de los 1000°C.

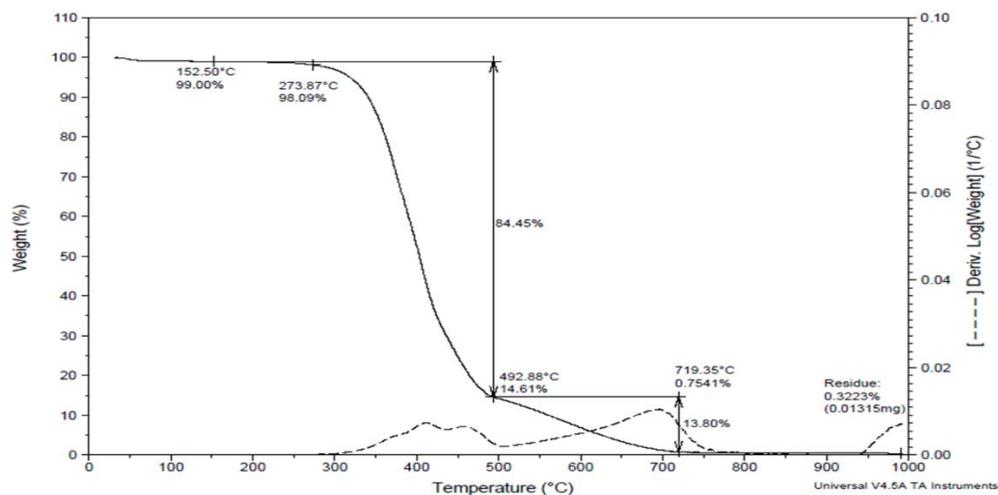


Figura 7-27 Análisis termogravimétrico del soforolípido lactónico diacetilado C18:1

8. Conclusiones

Se determinaron los perfiles cinéticos del crecimiento de *Starmerella bombicola* ATCC 22214 en cultivo en medio líquido y en medio sólido, incluyendo la producción de soforolípidos y el consumo de las fuentes de carbono. Al comparar los rendimientos de este trabajo, el CMS ($0.465 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$) supera al CML ($0.239 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$). La información derivada apoya la propuesta de que el CMS tiene un gran potencial para la producción de soforolípidos, pudiéndose llevar a cabo procesos eficientes y prácticos, que en ciertas condiciones pueden ofrecer mejores resultados que el CML. Además, el CMS es una excelente alternativa para valorizar residuos sólidos de diversas fuentes tales como el aserrín o subproductos de la industria alimentaria, mismos que pueden ser utilizados como sustrato y/o soporte como señalan Jiménez-Peñalver *et al.* (2016),

La utilización de aserrín en el CMS representa una alternativa para la valorización de este residuo de la industria maderera. El aserrín posee una gran resistencia mecánica, lo cual permitiría llevar a cabo el proceso de CMS con agitación, factor necesario para la producción a escala industrial, sin el riesgo de disminuir el tamaño de las partículas. Esta resistencia mecánica permitiría también su reutilización como soporte después de un proceso de lavado. Además, el aserrín puede retener una gran cantidad de líquido, lo cual lo posiciona como una excelente alternativa para su uso como soporte en procesos de cultivos microbianos en medio sólido. La resina presente en el aserrín no tiene un efecto evidente en el crecimiento de la levadura y en la producción de soforolípidos, aunque es preciso señalar que dicha resina puede ser extraída en cantidades no determinadas durante el *downstream* del biosurfactante, lo cual convierte al extracto crudo en una mezcla aún más compleja.

Fue posible separar el producto obtenido de la recuperación primaria utilizando cromatografía preparativa, de esta manera se lograron obtener cinco fracciones enriquecidas con las principales especies de soforolípidos, ácidos y lactónicos, acetilados y no acetilados. Una de las fracciones de soforolípidos lactónicos, la que correspondía al punto más intenso en TLC, se sometió a recristalización en metanol

con el fin de aumentar la pureza. La fracción purificada fue analizada con espectrometría de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear con lo cual se comprobó que se trata de un soforolípido lactónico el cual está acetilado en las posiciones 6' y 6'' de la soforosa, además, su cadena lipofílica contiene 18 carbonos con una insaturación Z, probablemente en la posición $\Delta 9$.

Dicha fracción fue analizada con HPLC-ELSD/PDA y se comparó con el cromatograma de la mezcla de origen del CMS y también con el cromatograma del producto del CML con lo que se confirmó que se trata de la especie mayoritaria en ambos sistemas de fermentación.

El producto purificado fue sometido a un análisis termogravimétrico, con lo que se concluyó que el producto es estable hasta temperaturas superiores a los 200°C, después de lo cual es degradado. Esta información es de importancia para el proceso de recuperación, así como para sus posibles aplicaciones.

La transición del uso de materia prima derivada del petróleo a fuentes renovables, del uso de sustancias tóxicas y peligrosas a sustancias inocuas, del tratamiento y disposición de los residuos a su aplicación como materia prima renovable y del uso de solventes convencionales a la aplicación de solventes “verdes” caracteriza al enfoque de la *química verde*, que busca el diseño de productos químicos y procesos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias dañinas al ser humano y al ambiente, como lo describen Anastas y Kirchhoff (2002) y Zimmerman *et al.* (2020). Los soforolípidos son un gran ejemplo de que este esquema puede ser aplicado, su producción puede llegar a cumplir con los requisitos que se plantean para la química del futuro, la química verde.

9. Perspectivas

La aplicación de agitación en el CMS puede ser un factor que influya positivamente en los resultados del bioproceso incrementado la homogeneidad del sistema, reduciendo el efecto negativo de la acumulación de calor metabólico y mejorando la disponibilidad de oxígeno para el microorganismo, Jiménez-Peñalvert *et al.* (2016)

estudiaron el efecto de la agitación intermitente en el CMS obteniendo un incremento del 31% en la producción de sofrolípidos. Asimismo, la agitación permitiría configurar un proceso de lote alimentado, *fed-batch*, aplicado en el CMS. En CML los procesos de lote alimentado han probado ser más eficientes que los procesos en lote para la producción de este biosurfactante, un ejemplo es el trabajo de Kim *et al.* (2009); sin embargo, este sistema aún no se ha implementado en CMS para *S. bombicola*, por lo que es una oportunidad de innovación que podría redundar en un proceso más eficiente y económicamente más competitivo.

La recuperación representa un gran porcentaje de los costos del bioproceso y para disminuirlos es preciso profundizar en la investigación de esta etapa y optimizar los procesos de *downstream* existentes, para el caso del CMS una opción que puede explorarse para maximizar la recuperación es la lixiviación a contracorriente, la cual se esquematiza en la Figura 9-1. También es de suma importancia encontrar alternativas más amigables con el medio ambiente. En este marco puede mencionarse la extracción con fluidos supercríticos, en especial el CO₂, que pudiera complementarse con un cosolvente no tóxico como el etanol. La extracción con CO₂ supercrítico se distingue por ofrecer productos libres de trazas de solventes, ser altamente selectiva y no producir residuos peligrosos.

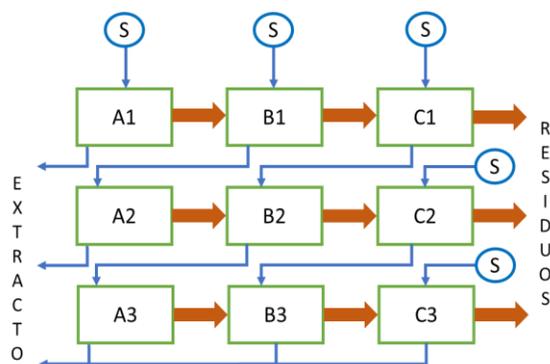


Figura 9-1 Extracción sólido-líquido (lixiviación) a contracorriente. Las letras A,B y C indican etapas sucesivas de extracción. Los números indican los procesos de extracción que se llevan a cabo en paralelo. S: solvente fresco.

Se ha planteado el uso de algunos residuos agroindustriales para la producción de sofrolípidos, sin embargo, los procesos deben ser optimizados y escalados para hacer de esas propuestas una realidad. Además, existen diversos residuos locales

susceptibles de valorización y que representan una oportunidad de acercamiento a lo planteado por la química verde, que orienta a procesos circulares en donde los residuos no solo se tratan y desechan, sino que son valorizados (Zimmerman *et al.* 2020).

Por el momento, debido a las limitaciones impuestas por los costos de producción no es realista plantear la sustitución de los surfactantes sintéticos por los biosurfactantes. Sin embargo, la introducción de estos en los productos de uso cotidiano puede darse en formulaciones que los contengan en pequeñas aunque significativas cantidades, lo cual será clave para la transición en el futuro (Banat *et al.* 2021).

10. Referencias

Anastas, P.T. y Kirchhoff, M.M. (2002). Origins, current status, and future challenges of Green Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 35(9), 686-694.

Ashraf, M.A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M. y Arif, M.S. (2017). Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: a review. *Journal of Environmental Management*, 198, 132–143.

Banat, I.M., Carboué, Q., Saucedo-Castañeda, G., y Cázares-Marinero, J.J. (2021). Biosurfactants: The Green Generation of Speciality Chemicals and Potential Production Using Solid-State Fermentation (SSF) Technology. *Bioresource Technology*. 320, 124222.

Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. y Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:427–444

Bera, A., Mandal, A., Belhaj, H. y Kumar, T. (2017). Enhanced oil recovery by nonionic surfactants considering micellization, surface, and foaming properties. *Petroleum Science*. 14, 362 – 371.

Brausch, J.M. y Smith, P.N. (2007). Toxicity of Three Polyethoxylated Tallowamine Surfactant Formulations to Laboratory and Field Collected Fairy Shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 52(2): 217-221.

Camilios-Neto, D., Bugay, C., Santana-Filho, A.P., Joslin, T., de Souza, L.M., Lanzi S., Mitchell, D.A. y Krieger, N. (2011). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89, 1395 – 1403.

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł. y Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 401–419.

Ciesielska, K., Van Bogaert, I.N., Chevineau, S., Li, B., Groeneboer, S., Sotaert, W., Van de Peer, Y. y Devreese, B. (2014). Exoproteome análisis of *Starmerella bombicola* results in the Discovery of an estearase requiered for lactonization of sophorolipids. *Journal of Proteomics*. 98, 159 – 174.

Colla, L.M., Rizzardi, J., Pinto, M.H., Reinehr, C.O., Bertolin, T.E. y Costa, J.A.V. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, 101, 8308–8314.

Cooper, D.G., y Paddock, D.A. (1984). Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47, 173-176.

Cullum, D.C. (1994). *Introduction to Surfactant Analysis*. UK: Springer Science & Business Media.

Daverey, A. y Pakshirajan, K. (2009). Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Research International*. 42, 499 – 504.

Daverey, A. y Pakshirajan, K. (2010). Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. 160, 2090 – 2101.

De Graeve, M., De Maeseneire, S., Roelants, S.L.K.W. y Soetaert, W. (2018). *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. *FEMS Yeast Research*.

Desai J.D. y Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(1), 47 – 64.

Develter, D.W.G. y Lauryssen, L.M.L. (2010). Properties and industrial applications of sophorolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112, 628 - 638.

De Waele, S., Vandenberghe, I., Laukens, B., Planckaert, S., Verweire, S., Van Bogaert I.N.A., Soetaert, W., Devreese, B. y Ciesielska, K. (2018). Optimized expresión of the *Starmerella bombicola* lactone esterase in *Pichia pastoris* through

temperature adaptation, codon-optimization and coexpression with *HAC1*. *Protein Expression and Purification*. 143, 62-70.

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

Elshafie A.E., Joshi, S.J., Al-Wahaibi, Y.M., Al-Bemani, A.S., Al-Bahry, S.N., Al-Maqbali, D. y Banat, I. (2015). Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1 – 11.

Farias, J.M., Stamford, T.C.M., Resende, A.H.M., Aguiar, J.S., Rufino, R.D., Luna, J.M. y Sarubbo, L.A. (2019). Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 129, 853 – 860.

Feio, S.S., Gigante, B., Roseiro, J.C., y Marcelo-Curto. (1999). Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *Journal of Microbiological Methods*. 35. 201-206.

Freitas, B.G., Brito, J.G.M., Brasileiro, P.P.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. y Sarubbo, L.A. (2016). Formulation of a Commercial Biosurfactant for Application as a Dispersant of Petroleum and By-Products Spilled in Oceans. *Frontiers in Microbiology*. 7:1646.

Geetha, S.J., Banat, I.M. y Joshi, S.J. (2018). Biosurfactants: production and potential applications in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 23 –32.

Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. y Tulloch, A.P. (1961). Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Canadian Journal of Chemistry*. 39(4): 846-855.

Hausmann, R. y Syldatk, C. (2015). Types and classification of microbial surfactants. En Kosaric, N. y Vardar-Sukan, F. (Ed.), *Biosurfactants. Production and Utilization*

– Processes, Technologies, and Economics (pp. 3 – 13). Boca Raton, FL., Estados Unidos: CRC Press Taylor & Francis Group.

Jadhav, J.V., Pratap, A.P. y Kale, S.B. (2019). Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. *Process Biochemistry*. 78, 15 – 19.

Jeziarska, S., Claus, S. y Van Bogaert, I. (2018). Yeast glycolipid biosurfactants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 592, 1312 – 1329.

Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A. y Font, X. (2016). Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochemical Engineering Journal*. 115, 93 – 100.

Jiménez-Peñalver, P. (2017). Sophorolipids production by solid-state fermentation: from lab-scale to pilot plant (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X. y Gea, T. (2018). Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *Journal of Cleaner Production* 172 (2018) 2735 – 2747.

Joshi-Navare, K., Khanvilkar, P. y Prabhune, A. (2013) Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. *Biochemistry Research International*. Vol. 2013. Article ID 169797. 11 páginas.

Karsa, David R. (2006). What Are Surfactants? En Farn, R.J. (Ed.) *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell Publishing: Oxford, UK.

Kavuthodi, B., Thoma, S.K. y Sebastian, D. (2015). Coproduction of pectinase and biosurfactant by the newly isolated strain *Bacillus subtilis* BKDS1. *British Microbiology Research Journal*, 10,1 –12.

Kim, Y.B., Yun, H.S., y Kim, E.K. (2009). Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. *Bioresource Technology*. 100. 6028-6032.

Kiran, G.S., Nishanth, L.A., Priyadarshini, S., Anitha, K. y Selvin, J. (2014). Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardioopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnology* 14, 48.

Ko, K.M., Chon, B.H., Jang, S.B. y Jang, H.Y. (2014). Surfactant flooding characteristics of dodecil alkyl sulfate for enhanced oil recovery. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 20 (1), 228 – 233.

Kourmentza, C., Freitas, F., Alves, V. y Reis, M.A. (2017). Microbial conversion of waste and surplus materials into high-value added products: The case of biosurfactants. En *Microbial Applications, Vol. Bioremediation and Bioenergy*. Kalia, V.C. and Kumar, P. (Eds.). pp. 29–77. Springer.

Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Núñez-Olea, J. y Ríos F. (2016). Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 125, 1 – 8.

Li, H., Guo, W., Ma, X.J., Li, J.S. y Song, X. (2017). In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Sophorolipids to Human Cervical Cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 181 (4):1372-1387.

Luna, J.M., Santos Filho, A.S., Rufino, R.D. y Sarubbo, L.A. (2016). Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 583–588.

Lydon, H.L., Baccile, N., Callahan, B., Marchant, R., Mitchell, C.A. y Banat, I.M. (2017). Adjuvant Antibiotic Activity of Acidic Sophorolipids with Potential for Facilitating Wound Healing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(5), 1 – 9.

Maass, D., Moya-Ramírez, I., García-Román, M., Jurado-Alameda, E., Ulson de Souza, A.A., Borges-Valle, J.A. y Altmajer-Vaz, D. (2015). Two-phase olive mil waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactat production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91, 1990 – 1997.

Mahanti, P., Kumar, S. y Patra, J.K. (2017). Biosurfactants: an agent to keep environment clean. *Microbial Biotechnology, Volume 1. Applications in Agriculture*

and Environment. ed. Patra, J.K., Vishnuprasad, C.N., and Das, G. pp 413–428. Singapore: Springer.

Mitchell, D.A., Berovic, M. y Krieger, N. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation. En Mitchell, D.A., Krieger, N. y Berovic, M. (Eds.). pp. 1 – 12. Alemania: Springer.

Mnif, I. y Ghribi, D. (2015). Review Lipopeptides Biosurfactants: Mean Classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications. Peptide Science. 104:3, 129 – 147.

Mulligan, C.N. (2017). Biosurfactants for the remediation of metal contamination. In Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation. En Das, S. and Dash, H.R. (Eds.). pp. 299–316. Boca Raton, FL: CRC Press.

Nagarajan, R. (2014). One Hundred Years of Micelles. Evolution of the Theory of Micellization. En Romsted L.S. (Ed.) Surfactant Science and Technology. Retrospects and Prospects. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group.

Naughton, P.J., Marchant, R., Naughton, V. y Banat, I.M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. Journal of Applied Microbiology. 127, 12 – 28.

Nitschke, M. y Silva, S.S.E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 58, 631– 638.

Oliveira, M.R., Magri, A., Baldo, C., Camilios-Neto, D., Minucelli, T. y Celligoi, M.A.P. (2015). Review: sophorolipids a promising biosurfactant and its applications. The International Journal of Advanced Biotechnology Research, 6, 161–174.

Parekh, V.J. y 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. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 6 (4), 418 – 424.

Parekh, V.J., Patravale, V.B. y Pandit, A.B. (2012). Mango kernel fat: A novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using

Starmerella bombicola NRRL-Y 17069. Annals of Biological Research. 3(4), 1798 – 1803.

Ribeiro, I.A.C., Faustino, C.M.C., Guerreiro, P.S., Frade, R.F.M., Bronze, M.R., Castro, M.F. y Ribeiro, M.H.L. (2015). Development of novel sophorolipids with improved cytotoxic activity toward MDA-MB-231 breast cancer cells. Journal of Molecular Recognition. 28: 155-165.

Roelants, S.L.K.W., Ciesielska, K., De Maeseneire, S.L., Moens, H., Everaert, B., Verweire, S., Denon, Q., Vanlerberghe, B., Van Bogaert, I.N.A., Van de Meeren, P., Devreese, B. y Soetaert, W. (2016). Towards the industrialization of new biosurfactants: biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. Biotechnology and Bioengineering. 113(3).

Sachdev, D.P. y Cameotra, S.S. (2013). Biosurfactants in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology. 97, 1005–1016.

Sahebnazar, Z., Mowla, D. y Karimi, G. (2018). Enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* growth and rhamnolipid production using iron-silica nanoparticles in low-cost medium. Journal of Nanostructures. 8,1 –10.

Samad, A., Zhang, J., Chen, D., Chen, X., Tucker, M. y Liang, Y. (2017) Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 44, 353 – 362.

Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Torres-Mancera M.T., Figueroa-Montero A., Rosales Zamora Gabriel. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO₂ y O₂ y flujo de los flujos de salida de procesos biológicos. Patente 336733 concedida por el IMPI el 22 de enero de 2016, transferida y en comercialización.

Schramm, L.L., Stasiuk, E.N. y Marangoni, D.G. (2003). Surfactants and their applications. Annual Reports on the Progress of Chemistry Section C. 99, 3 – 48.

Shah, M.U.H., Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., Talukder, M.M.R., Yusup, S.B. y Goto, M. (2017) Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. *Biochemical Engineering Journal*. 127, 60 – 67.

Shekhar, S., Sundaramanickam, A. y Balasubramanian, T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 45, 1522–1554.

Singh, P., Patil, Y. y Rale, V. (2018). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology* 126, 2 – 13. doi:10.1111/jam.14057

Smith, T.J.P., Perfumo, A., Marchant, R. y Banat, I.M. (2010). Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. En: Timmis, K.N. (Ed.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 2705–2723.

Soberón-Chávez G., González-Valdez A., Soto-Aceves M.P., Cocotl-Yañez M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*. 14(1):136–146.

Soccol, C.R., Ferreira da Costa, E.S., Junior-Letti, L.A., Grace-Karp, S., Lorenci-Woiciechowsky, A.L., Porto-de-Souza-Vandenberghe, L. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 1, 52 – 71.

Spencer, J.F.T., Gorin, P.A.J. y Tulloch, A.P. (1970). *Torulopsis bombicola* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 36, 129-133.

Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J. y Rahman, P.K.S.M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*. 6 (245), 1 – 6.

Van Bogaert, I.N.A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W. y Vandamme, E.J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76, 23 – 34.

Van Bogaert, I.N.A. y Soetaert, W. (2011). Sophorolipids. En Soberón-Chávez, G. (Ed.) Biosurfactants. From Genes to Applications. Microbiology Monographs 20. Alemania: Springer-Verlag.

Van Bogaert, I.N.A., Zhang, J. y Sotaert, W. (2011). Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry*. 46, 821 – 833.

Van Bogaert, I.N.A., Holvoet, K., Roelants, S.L.K.W., Li, B., Lin, Y.C., Van de Peer, Y. y Sotaert, W. (2013). The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. *Molecular Microbiology*. 88(3), 501-509.

Van Bogaert, I.N.A, Buyst, D., Martins, J.C., Roelants, S.L.K.W. y Soetaert, W.K. (2016). Synthesis of bolaform biosurfactants by an engineered *Starmerella bombicola* yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. 113, 2644 – 2651.

Varjani, S.J. y Upasani, V.N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* 232, 389–397.

Vaughn, S.F, Behle, R.W., Skory, C.D., Kurtzman, C.P. y Price, N.P.J. (2014). Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. *Crop Protection*. 59, 29 – 34.

Vieira-Santos, V.S., Silveira, E. y Barbosa-Pereira, B. (2019). Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater *Cladoceran* species. *Chemosphere*. 221, 519 – 525.

Wade, L.G., (2004). *Química Orgánica*. Quinta edición. Madrid: Pearson Educación.

Wang, H., Roelants, S.L.K.W., To, M.H., Patria, R.D., Kaur, G., Lau, N.S., Lau, C.Y., Van Bogaert, I.N.A, Soetaert, W. y Lin, C.S.K. (2019). *Starmerella bombicola*: recent advances on sophorolipid production and prospects of waste stream utilization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 94, 999 – 1007.

Winterburn, J.B. y Martin, P.J. (2012). Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnology Letters*. 34 (2), 187 – 195.

Zimmeman, J.B., Anastas, P.T., Erythropel, H.C., y Leitner, W. (2020). Design for a green chemistry future. Science, 367(6476), 397-400.

11. Anexo

11.1. Curva de calibración de glucosa, 505 nm, método enzimático GOD-POD

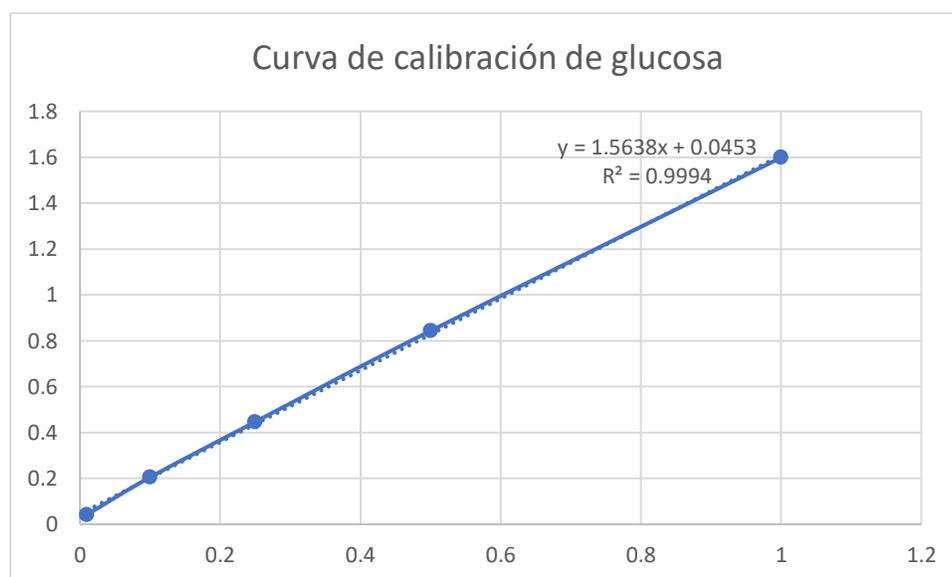


Figura 11-1 Curva de calibración de glucosa, 505 nm, método enzimático GOD-POD