



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**“Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por *Bacillus subtilis* en fermentación en medio sólido“**

**TESIS**

Para obtener el grado  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Luisa Marcela Valdés Velasco

Director:

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores:

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Mtra. Lorena Pedraza Segura

Julio 2016

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.

México, D. F. a 22 de julio de 2016

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis:

**Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por *Bacillus subtilis* en  
fermentación en medio sólido**

Que presentó:

**Luisa Marcela Valdés Velasco**

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Mtra. Lorena Pedraza Segura

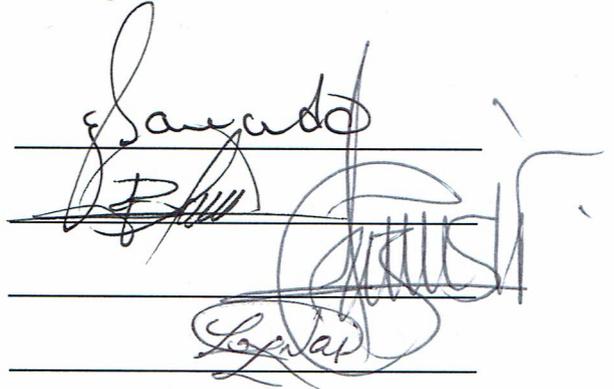
Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario: Dr. Javier Barrios Gonzáles

Vocal: Dr. José de Jesús Cázares Marinero

Vocal: Mtra. Lorena Pedraza Segura



The image shows four horizontal lines representing the signature area for the jury. The top line has a signature that appears to be 'Saucedo'. The second line has a signature that appears to be 'Barrios'. The third line has a signature that appears to be 'Cázares'. The fourth line has a signature that appears to be 'Lorena'.

"Huïremos del descanso, huïremos del sueño,  
tomaremos a toda velocidad el alba y la primavera  
y prepararemos días y estaciones a la medida de nuestros  
sueños"

MILAN KUNDERA, el libro de la risa y el olvido

"Convendría sentir menos curiosidad por las personas  
y más por las ideas."

MARIE CURIE

"Podrán morir las personas, pero jamás sus ideas."

CHE GUEVARA

A mis padres, mi orgullo y admiración... ¡grandes seres de luz!

A mis hermanos, ¡mis retos son motivados por ustedes!

A mi sobrino, esa sonrisa y energía que me embelesa

¡Familia! Son mi complemento, apoyo, motor y luz en mi vida. Gracias por creer en mí

## AGRADECIMIENTOS

*A la energía etérea que me guía, fortalece, sorprende y da esperanza.*

*A México ☺, por darme la oportunidad de estudiar aquí, abrirme las puertas a otro mundo, cultura, historia, pensamientos, paisajes, lugares, gastronomía, intereses, CIENCIA y muchas cosas más. Aunque seamos del mismo idioma, realmente es DIFERENTE, y me encanta!...*

*Al Dr. Ernesto Favela, por aceptarme en ser parte de su grupo, por apoyarme en mis intereses, por su paciencia, por sus sabios concejos, por escucharme y por su confianza. Realmente es un gran investigador y le admiro mucho porque es una persona polifacética.*

*Al Dr. Gerardo Saucedo, por su asesoría y disponibilidad.*

*A los doctores Gustavo Viniegra, Octavio Loera, Sergio Huerta y la Mtra Lorena Pedraza, porque aportaron un granito de arena a mi formación profesional y personal.*

*A la Dra. Arely Prado, por compartirme sus admirables experiencias de vida.*

*A la Dra. Ascención, a Luis y Raziel, por su paciencia y asesoría con el HPLC.*

*Al grupo de “los polioles”, por el método de la gota y compartirme sus experiencias.*

*Al Mtro. Yuri Castro por colaborar conmigo con el análisis IR.*

*A Néstor, por enseñarme y orientarme con el método de análisis de biosurfactantes.*

*A TODOS mis compañeros de la PP4, por su conocimiento y alegría.*

*A Aby por recibirme, asesorarme y apoyarme mucho con la pequeña ciudad de México, ¡te debo mil favores!*

*A Miguel, por comprenderme, por acompañarme en aquellas traspasadas tan ¡dramáticas! y por darme fuerza en mis momentos de nostalgia de familitis y colombianitis.*

*A los nómadas, por brindarme su amistad y gratos momentos.*

*A las encantadoras amistades que este país me ha dejado y han confortado mi vivir estos años.*

*A mis amigos de vida, que están a muchos kilómetros de distancia, incluso al otro lado del charco y más allá de lo que se conoce como vida☺. ¡Los adoro tontos!*

## RESUMEN

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas producidas por microorganismos que presentan las mismas aplicaciones que los surfactantes químicos sintéticos; sin embargo, son menos tóxicos y nocivos al medio ambiente. Los lipopéptidos (LP) son uno de los tipos de biosurfactantes (BS) más eficientes, producidos principalmente por especies del género *Bacillus*; sin embargo, no son producidos a gran escala por su alto costo de producción, purificación y baja productividad.

Generalmente, los BS son producidos en fermentación en medio líquido con baja productividad, debido a la formación de espuma, producción de exopolisacáridos y baja transferencia de oxígeno que afectan el proceso. La FMS no presenta estos problemas. Es por ello que se utilizó el cultivo sólido para producir LP de surfactina por *B. subtilis* con el fin de mejorar su productividad y producción.

Inicialmente se compararon dos medios de cultivo, uno para producción de biomasa (caldo nutritivo) y otro para producción de LP (medio reportado por Yeh *et al.* (2016)) bajo diferentes concentraciones. Se seleccionó el medio Yeh *et al.* (2016) 3 veces concentrado porque fue el que presentó mayor producción de los LP. Luego, con el medio seleccionado se evaluó el efecto de la presencia de  $MnSO_4$  y de la fuente de nitrógeno ( $NH_4NO_3$  y  $NaNO_3$ ). El  $MnSO_4$  junto con el  $NH_4NO_3$  en el medio favorecieron la producción de LP.

Posteriormente, se evaluó la concentración de los nutrientes  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  para mejorar la producción y productividad de los LP. No se superó la producción de los LP

pero se logró aumentar la productividad en un 50%. Se realizó una comparación de los valores obtenidos en este trabajo con los de la literatura resultando superiores a los reportados en varios estudios de producción de surfactina.

Finalmente, se realizó un análisis del BS que se produjo en este trabajo por métodos espectrométricos y se encontró que, como se esperaba, es de carácter lipopeptídico y es un conjunto de isoformas de la surfactina.

## ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules produced by microorganisms. They present the same applications that chemical surfactants. Although, they are less toxic and harmful for environment. Lipopeptides (LP) are one of the most efficient biosurfactants (BS). LP are produced mainly by *Bacillus* species. However, they are not produced on a large scale because their production and purification is expensive and they present low productivity.

Generally, BS are produced in submerged state fermentation with low productivity because of foaming, production of exopolysaccharides and low transfer oxygen affect the process. Solid state fermentation solves these problems. For this, solid state fermentation was used to produce LP from the surfactin by *B. subtilis* in order to improve the production and productivity.

Firstly, two culture media were compared, one to production of biomass (nutrient broth) and other to production of LP (media reported by Yeh *et al.* (2016)). Both culture media were used in different concentrations. Media reported by Yeh *et al.* (2016) three times concentrated was selected because it was the most production of LP. Then, the presence of  $MnSO_4$  and nitrogen source ( $NH_4NO_3$  y  $NaNO_3$ ) was evaluated in that media. The  $MnSO_4$  with the  $NH_4NO_3$  in the media improved the production of LP.

Later, the concentrations of the nutrients such as  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  were evaluated in order to improve the production and the productivity of LP. The production did not improve but the productivity increased by 50%. A comparison was discovered

between the results in this study and the reports in were documented in literature. This work showed better values than other reports about production of surfactin.

Finally, an analysis of BS produced in this study by spectrometric methods was created.

BS was a lipopeptide of surfactin as expected.

## INDICE DE CONTENIDO

Introducción.....	1
1. Revisión bibliográfica .....	4
1.1 Generalidades de los biosurfactantes.....	4
1.2 Ventajas de los biosurfactantes sobre los surfactantes químicos sintéticos .....	8
1.3 Clasificación de los biosurfactantes .....	8
1.4 Aplicaciones potenciales en la industria de los biosurfactantes.....	10
1.5 Generalidades de los lipopéptidos .....	11
1.6 Métodos analíticos para la evaluación de lipopéptidos .....	13
1.7 Ventajas de la fermentación en medio sólido .....	15
1.8 <i>Bacillus subtilis</i> : productor de lipopéptidos .....	19
1.8.1 Producción de lipopéptidos .....	20
1.8.2 Biosíntesis de lipopéptidos.....	25
2. Justificación.....	27
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos .....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos .....	30

5. Materiales y métodos .....	31
5.1 Microorganismo .....	31
5.2 Conservación de la cepa .....	31
5.2.1 A corto plazo .....	31
5.2.2 A mediano plazo.....	31
5.3 Medios de cultivo .....	31
5.3.1 Producción de inóculo .....	31
5.3.2 Fermentación en medio sólido .....	32
5.4 Preparación de la fermentación en medio sólido .....	34
5.4.1 En matraces de 250 mL .....	35
5.4.2 En frascos ámbar de 30 mL .....	35
5.5 Cinética de producción de los lipopéptidos en fermentación en medio sólido .	35
5.6 Recuperación de los lipopéptidos .....	36
6. Métodos analíticos .....	36
6.1 Producción de CO <sub>2</sub> .....	36
6.2 Cuantificación de los lipopéptidos.....	37
6.2.1 Actividad surfactante .....	37
6.2.2 Actividad emulsificante.....	38
6.3 Análisis infrarrojo .....	39

6.4	Análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) .....	39
6.5	Glucosa residual .....	39
6.6	pH .....	40
6.7	Humedad .....	40
6.8	Análisis estadístico .....	40
7.	Estrategia experimental.....	41
8.	Resultados y discusión.....	42
8.1	Efecto de medios de cultivo a diferentes concentraciones en medio sólido en el crecimiento de <i>B.subtilis</i> y la producción de los lipopéptidos.....	42
8.2	Efecto de componentes en el medio de cultivo sólido en la producción de los lipopéptidos.....	52
8.3	Análisis de la composición del biosurfactante.....	64
8.3.1	Análisis infrarrojo.....	65
8.3.2	Análisis de espectrometría de masas.....	66
8.4	Comparación de este trabajo con reportes de la literatura .....	68
9.	Conclusiones.....	70
10.	Perspectivas.....	71
10.	Referencias .....	72
11.	Anexos .....	90

Anexo 1. Estimación del error de la pendiente de la curva estándar de surfactina con el método de actividad emulsificante .....	90
Anexo 2. Curva estándar de surfactina con el método de actividad surfactante....	91
Anexo 3.Espectrometría de la surfactina reportada.....	92
Anexo3.a. Espectro infrarrojo de surfactina reportado .....	92
Anexo 3.b. Espectro de masas de surfactina reportado.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la familia de la surfactina y sus isoformas (Inès & Dhouha, 2015) .....	19
Figura 2. Curva estándar para estimar los LP en <i>mg Eq SFgmsf</i> .....	38
Figura 3. Estrategia experimental.....	41
Figura 4. Tasa de producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).....	43
Figura 5. Producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).....	44
Figura 6. $\mu_{CO_2}$ con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	44
Figura 7. FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo a las 21 h. a) Concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	45
Figura 8. Tasa de producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2006) durante 42 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos) .....	46

Figura 9. Producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2006) durante 42 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).....	47
Figura 10. FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2016) durante 42 h. a) $\mu_{CO_2}$ y b) Tiempo de la fase lag. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	48
Figura 11. FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2006) a las 42 h. a) concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado .....	49
Figura 12. Métodos de análisis de los LP producidos en FMS bajo diferentes concentraciones de medios. a) Área de desplazamiento del crudo. b) Concentración de los LP. El color azul corresponde al caldo nutritivo, el verde al medio Yeh et al. (2006). Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado .....	51
Figura 13. Correlación del método de actividad emulsificante vs actividad surfactante .....	51
Figura 14. Tasa de producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h. (A: NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , B: NaNO <sub>3</sub> , C: NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - MnSO <sub>4</sub> , D: NaNO <sub>3</sub> - MnSO <sub>4</sub> ). Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos). .....	53
Figura 15. Producción de CO <sub>2</sub> durante la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h. (A: NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , B: NaNO <sub>3</sub> , C: NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - MnSO <sub>4</sub> , D: NaNO <sub>3</sub> - MnSO <sub>4</sub> ). Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).....	53

Figura 16. Parámetros de la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h (A: $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B: $\text{NaNO}_3$ , C: $\text{NH}_4\text{NO}_3 - \text{MnSO}_4$ , D: $\text{NaNO}_3 - \text{MnSO}_4$ ). a). $\mu\text{CO}_2$ . b). Tiempo de la fase lag. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado .....	54
Figura 17 FMS bajo diferentes medios de cultivo a las 66 h (A: $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B: $\text{NaNO}_3$ , C: $\text{NH}_4\text{NO}_3 - \text{MnSO}_4$ , D: $\text{NaNO}_3 - \text{MnSO}_4$ ). a) concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado .....	55
Figura 18. Concentración de los LP bajo diferentes medios de cultivo a las 66 h (A: $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B: $\text{NaNO}_3$ , C: $\text{NH}_4\text{NO}_3 - \text{MnSO}_4$ , D: $\text{NaNO}_3 - \text{MnSO}_4$ ). Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ , prueba Tukey).....	56
Figura 19. Concentración de los LP en medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno durante 74.5 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	57
Figura 20. Medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno. a) Concentración de glucosa residual en el tiempo. b) Humedad en el tiempo. c). pH en el tiempo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	58
Figura 21. Concentración de los LP bajo diferentes concentraciones de nutrientes del medio de cultivo a las 48 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ , prueba Tukey) .....	60

Figura 23. FMS bajo diferentes concentraciones de nutrientes del medio de cultivo a las 48 h. a) Concentración de glucosa residual. b). Humedad. c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.....	62
Figura 24. Concentración de los LP y la glucosa residual bajo el medio 14 de la optimización durante 96 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.....	63
Figura 25. FMS con el medio 14 de la optimización durante 96 h. Humedad y pH en el tiempo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado .....	64
Figura 26. Espectro infrarrojo del BS extraído .....	66
Figura 27. Espectro de masas del LP producido.....	67
Figura 28. Curva estándar de surfactina con el método de actividad surfactante .....	91
Figura 29. Espectro infrarrojo de surfactina purificada producida por <i>Bacillus subtilis</i> cultivado en glicerol. La muestra se preparó en KBr de 400 a 4000 $\text{cm}^{-1}$ (de Faria et al., 2011) .....	92
Figura 30. Espectro de masas de surfactina purificada producida por <i>Bacillus subtilis</i> cultivada en glicerol (de Faria et al., 2011).....	92

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y aplicaciones de algunos surfactantes químicos .....	6
Tabla 2. Características y aplicaciones de algunos BS .....	7
Tabla 3. Clasificación de los biosurfactantes según su peso molecular .....	9
Tabla 4. Clasificación de los BS según su estructura química y origen microbiano (Shekhar et al., 2014; Shafiei et al., 2014; Soberón & Maier., 2011; Kosaric et al., 1987) .....	9
Tabla 5. Principales aplicaciones industriales de los BS (Rosenberg & Ron, 2013; Shafiei et al., 2014) .....	10
Tabla 6. Técnicas de extracción de LP .....	14
Tabla 7. Métodos analíticos de LP .....	14
Tabla 8. Producción de LP en diferentes medios y métodos de cultivo .....	18
Tabla 9. Clasificación científica de <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
Tabla 10. Concentración y productividad de algunos LP en FML bajo diferentes medios .....	22
Tabla 11. Concentración y productividad de algunos LP en FMS bajo diferentes medios .....	22
Tabla 12. Composición del medio caldo nutritivo a diferentes concentraciones .....	32
Tabla 13. Composición del medio Yeh et al (2006) a diferentes concentraciones ....	33
Tabla 14. Medios con presencia o ausencia de $MnSO_4$ y diferente fuente de nitrógeno .....	33
Tabla 15. Rango experimental y niveles de las variables independientes .....	34

Tabla 16. Matriz del diseño factorial completo para la FMS.....	34
Tabla 17. Análisis estadístico del efecto de los nutrientes .....	61
Tabla 18. Asignamiento de las isoformas de surfactina .....	68
Tabla 19. Estimación del error de la pendiente sin intercepto (% Error pend: porcentaje de error de la pendiente sin intercepto respecto a la con intercepto .....	91

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BS	Biosurfactante
C	Átomo de carbono
CMC	Concentración micelar crítica
Concent	Concentración
EE.UU.	Estados Unidos
Eq	Equivalente
FM	Fermentación en medio
FML	Fermentación en medio líquido
FMS	Fermentación en medio sólido
FT-IR	Espectrometría infrarrojo por transformada de Fourier
gmsf	Gramo de materia seca final
gsi	Gramo de soporte inerte
Kt	Kilo tonelada
L	Líquido
LP	Lipopéptidos
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz- Tiempo de vuelo
mhum	Materia húmeda
ms	Materia seca
n.d.	Sin fecha (no date)
NRPSs	Péptido sintetetasas no ribosomales
Ref	Referencia
S	Sólido
SF	Surfactina
Sig	Significancia
USD	Dólares estadounidenses
x	Concentración comercial del medio de cultivo
$\frac{Y_P}{\bar{x}}$	Rendimiento de la surfactina sobre la biomasa

## Introducción

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que modifican la interacción química entre dos superficies; ya sean líquidos, o entre un líquido y un gas o un líquido y un sólido (CIAT, 1980; Satpute *et al.*, 2010). Según su origen, los surfactantes pueden ser químicos o biológicos.

Los surfactantes químicos provienen de fuentes petroquímicas u oleoquímicas y los surfactantes biológicos (biosurfactantes) son producidos por microorganismos. Los surfactantes químicos se han desarrollado para aplicaciones industriales a gran escala, principalmente en productos de limpieza como detergentes y limpiadores de superficie. La mayoría son tóxicos y de difícil biodegradación (Makkar & Cameotra, 2002). Por el contrario, los biosurfactantes se pueden generar a partir de materias primas renovables y son menos perjudiciales para el medio ambiente (Makkar & Cameotra, 2002).

Por sus propiedades emulsificantes y tensoactivas, los biosurfactantes (BS), presentan aplicaciones en sectores industriales como el petrolero, minero, ambiental, alimentario, agrícola, cosmético, farmacéutico, y terapéutico, por mencionar algunos. Entre los BS más eficientes se encuentran los lipopéptidos (LP), ya que son capaces de disminuir la tensión superficial del agua pura y el aire de  $72$  a  $27 \frac{mN}{m}$  a concentraciones tan bajas como  $0.005\%$  ( $\frac{p}{v}$ ) (Desai & Banat, 1997). Son producidos por especies del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y por actinomicetos (*Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Brevibacterium*). Las especies de *Bacillus* son conocidas por producir

LP cíclicos, incluyendo surfactina, iturina, fengicina, lichenisina, micosubtilina y bacilomicina como las principales clases de BS (Plaza *et al.*, 2011; Slivinski *et al.*, 2012). Los LP bacterianos son metabolitos secundarios, que en general son producidos por péptido sintetasas no ribosomales (NRPSs) (Inès & Dhouha, 2015). Las cepas de *Bacillus subtilis* son aerobias, presentan alta tasa de crecimiento y, a diferencia de otras especies, pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (entre 15 a 70°C) y pH (de 2 a 9.3) (Buitrago *et al.*, 2011), reducen el nitrato y asimilan el almidón.

Los LP presentan actividad sobre las membranas celulares; también actividad hemolítica, contra bacterias, virus, micoplasmas y tumores. Estas especies pueden actuar como inmunomoduladores o inhibidores de enzimas; por ello, existe interés en su uso para aplicaciones terapéuticas, farmacológicas y médicas (Slivinski *et al.*, 2012). Sin embargo, los LP no son obtenidos a gran escala debido a su alto costo de producción, purificación y baja productividad.

La producción de LP se ha reportado principalmente en medio líquido; sin embargo, este tipo de procesos presentan baja productividad debido a la formación de espuma, producción de exopolisacáridos y baja transferencia de oxígeno que afecta la concentración del BS (Thomas *et al.*, 2013). Por otro lado, la fermentación en medio sólido (FMS) no presenta dichos problemas y algunos reportes indican mayor productividad en la producción de metabolitos, combustibles y antibióticos (Chen, 2013).

Por consiguiente, el propósito de esta investigación ha sido desarrollar un sistema de producción de LP por *Bacillus subtilis* en FMS utilizando un medio de cultivo simple para facilitar la purificación, obtener una mayor productividad y concentración a las reportadas en la literatura.

## 1. Revisión bibliográfica

### 1.1 Generalidades de los biosurfactantes

Los surfactantes son compuestos químicos constituidos por dos motivos moleculares: una parte hidrofílica y una lipofílica. La parte hidrofílica es el componente polar que presenta afinidad hacia medios polares como el agua, mientras que la lipofílica (o hidrofóbica) es el componente apolar que presenta afinidad por medios apolares como las grasas y los aceites (Kosswig, 2000). Esta característica anfipática les confiere la capacidad de reducir la tensión superficial de los líquidos (Sailatha *et al.*, 2016); la tensión interfacial entre sistemas líquido-líquido, líquido-gas y líquido-sólido y minimizar la formación de microemulsiones (Shafiei *et al.*, 2014).

Los surfactantes tienen propiedades emulsificantes, espumantes, detergentes y dispersantes (Satpute *et al.*, 2010). A continuación se define cada una de sus propiedades. Los emulsificantes pueden dispersar un líquido en otro (como gotitas microscópicas) que conduce a la mezcla moderadamente homogénea de dos líquidos inmiscibles. Un espumante es una molécula que se concentra en la interfase gas-líquido conduciendo la formación de burbujas a través del líquido y en la interfase la formación de espuma. Un detergente es una sustancia que tiene la propiedad química de disolver suciedad o impurezas de un objeto sin causar corrosión. Un dispersante es un material que reduce la atracción cohesiva entre partículas similares; manteniendo las partículas insolubles en suspensión previniendo las agregaciones entre sí (Satpute *et al.*, 2010; Ortega, 2013).

La concentración micelar crítica (CMC) se utiliza comúnmente para medir la eficiencia de los surfactantes o espumantes. La CMC se define como la concentración de un surfactante a partir de la cual se producen micelas (Moreno, 2005). La formación de micelas de surfactante reduce la tensión superficial e interfacial, de esta forma aumenta la solubilidad y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrófobos (Whang *et al.*, 2008).

Los surfactantes presentan gran variedad de aplicaciones industriales. El consumo mundial de surfactantes ha visto un crecimiento considerable en las últimas décadas. Mientras que en 1998, el volumen de surfactantes fue de 7500 kt; en el 2013, se duplicó hasta 15000 kt. Se espera que para el 2020 el volumen sea por más de 24000 kt. Este dinamismo se debe principalmente a la generación de nuevos productos y al descubrimiento de nuevas aplicaciones (Markets and Markets, n.d.).

Los surfactantes según su origen pueden ser químicos o biológicos. Los surfactantes sintetizados químicamente provienen de fuentes petroquímicas u oleoquímicas. En la Tabla 1 se presentan algunos surfactantes químicos con su respectiva descripción química de la familia a la que pertenecen y sus aplicaciones.

Los surfactantes biológicos o biosurfactantes (BS), son producidos por microorganismos como bacterias y hongos (incluyendo las levaduras). Los BS son compuestos activos de superficie; constituidos por un dominio hidrofóbico como hidrocarburos saturados o insaturados o ácidos grasos y un dominio hidrofílico ya sea un ácido, cationes de péptidos, o aniones, mono-, di- o polisacáridos (Rosenberg & Ron, 2013; Banat *et al.*, 2010). Los BS aumentan el área de superficie y la

biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos, mediante el aumento de su solubilidad aparente o por la desorción de los mismos desde las superficies; regulando la unión y separación de los microorganismos hacia y desde las superficies (Rosenberg & Ron, 2013). Estas moléculas son producidas en la superficie de las células microbianas (Shafiei *et al.*, 2014) durante su crecimiento (Siñeriz *et al.*, 2001). En la Tabla 2 se presentan algunos BS con sus respectivas aplicaciones.

*Tabla 1. Características y aplicaciones de algunos surfactantes químicos*

<b>Surfactante</b>	<b>Descripción química de la familia</b>	<b>Tipo</b>	<b>Aplicación</b>
Tween 20 (Polisorbato 20)	Monolaurato de sorbitán polioxietileno (éster)	No iónico	Farmacéutica, emulsificar aceites, solubilizante, humectante, insecticidas y pesticidas, detergentes industriales
Tween 80 (Polisorbato 80)	Monooleato Sorbitán Polioxietileno (éster)	No iónico	Emoliente, agente humectante, detergente, acondicionador en champús
Tritón X-100	Isooctil fenil polietoxi etanol	No iónico	Desnaturalizar membranas celulares sin desnaturalizar proteína, detergente
Tritón B-1956	Ftálico glicerol alquil resina	No iónico	Humectante, dispersión y adhesión de los pesticidas, fungicidas, reguladores del crecimiento, y nutrientes en los cítricos.
Tergitol-7	sulfato de sodio derivado del 3,9 dietil - tridecanol	Aniónico	Inhibe la flora secundaria indeseable, favorece recuperación de coliformes
Pluronic F38, P66, F68	Condensados de óxido de etileno, con una base hidrofóbica formada por condensación de óxido de propileno con propilenglicol	No iónico	Componente de medios de crioconservación de células de la planta
Cloruro de cetilpiridinio	Igual que el nombre	Catiónico	Es un antiséptico, ingrediente en ciertos pesticidas

Cada tipo de BS es producido por un reducido número de microorganismos. Para los BS, el tipo, la calidad, la cantidad y su aplicación, están influenciados por la especie del microorganismo (Reis *et al.*, 2013), las condiciones de cultivo y de crecimiento. Las cepas silvestres productoras de BS, cultivadas por procesos optimizados en medios

adecuados alcanzaron concentraciones de hasta  $422 \frac{g}{L}$  de soforolípidos,  $112 \frac{g}{L}$  de ramnolípidos,  $106 \frac{g}{L}$  de manosileritritol y  $3.6 \frac{g}{L}$  de surfactina (Kügler *et al.*, 2015). Se observa que la producción de LP es de 50 a 100 veces menor de producción en comparación de los demás BS.

Tabla 2. Características y aplicaciones de algunos BS

BS	Aplicación	Concent (g/L)	Referencias
Ramnolípidos	Biorremediación, agente biocontrol, agente antifúngico	45.00	Mukherjee <i>et al.</i> , 2006; Reis <i>et al.</i> , 2013
Soforolípidos	Bioemulsificante, recuperación de petróleo mejorada por microorganismos (MEOR), desasimilación de alcano, propiedades contra el cáncer. En industria de cosméticos, farmacéutica, nanotecnología	422.00	de Oliveira <i>et al.</i> , 2014; Reis <i>et al.</i> , 2013
Trehalolípidos	Biorremediación, agente antimicrobiano	4.00	Rosenberg & Ron, 2013
Manosileritritol	Antagonista de neurorreceptores, agente antimicrobiano, aplicación biomédica (Tratamiento de células tumorales humanas)	95.00	Mukherjee <i>et al.</i> , 2006; Reis <i>et al.</i> , 2013
Surfactina	Agente antimicrobiano, aplicación biomédica (tratamiento de células tumorales humanas)	6.45	Yeh <i>et al.</i> , 2006
Viscosina	Propiedades contra el cáncer	-	Inès & Dhouha, 2015
Iturina	Actividad antifúngica	5.05	Zohora <i>et al.</i> , 2013
Cellobiolípidos	Compuesto antifúngico	30.00	Geys <i>et al.</i> , 2014
Lípido proteína carbohidrato	Bioemulsificante	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Proteína PA	Bioemulsificante	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Ácidos grasos	Bioemulsificante	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Liposán	Bioemulsificante	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Vesículas y fimbrias	Biorremediación	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Fosfolípidos	Biorremediación	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Alasan	Biodegradación de compuestos poliaromáticos	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011
Emulsan	MEOR	-	Saharan <i>et al.</i> , 2011

(Concent: Concentración)

## **1.2 Ventajas de los biosurfactantes sobre los surfactantes químicos sintéticos**

El aumento de la conciencia ambiental y la necesidad de una industria sostenible han estimulado la producción de BS como posibles reemplazos (Marchant *et al.*, 2012). Las ventajas que presentan sobre los químicos son: que se pueden generar a partir de materias primas renovables, son menos tóxicos y se biodegradan fácilmente; por lo que son menos perjudiciales para el medio ambiente (Marchant *et al.*, 2012). Los BS tienen una baja CMC, es decir que emplean menos BS para disminuir la tensión superficial (Desai y Banat, 1997); aumentan el poder espumante, presentan alta selectividad y actividad específica en una amplia gama de condiciones de temperatura, pH y salinidad; como consecuencia se convierten en componentes atractivos para muchos productos industriales (Marchant *et al.*, 2012). Sin embargo, presentan algunas desventajas; en particular, la regulación de la síntesis del BS la cual es poco comprendida, su producción costosa a gran escala y su difícil recuperación y purificación (Yañez & Wong., 2013).

## **1.3 Clasificación de los biosurfactantes**

Los BS se clasifican con base en su peso molecular (Rosenberg & Ron, 2013), su estructura química y su origen microbiano (Shafiei *et al.*, 2014). En la Tabla 3 se observa la clasificación según su peso molecular.

Tabla 3. Clasificación de los biosurfactantes según su peso molecular

Peso Molecular	Grupo de BS	Ejemplos		
		Clase de BS	peso (g/mol)	Referencia
Bajo	Glucolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos y fosfolípidos	Ramnolípidos	504.6	NCBI, n.d. a
		Soforolípidos	706.8	NCBI, n.d. b
		Surfactina	1036.3	NCBI, n.d. c
		Viscosina	1126.4	NCBI, n.d. d
Alto	Polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de los anteriores	Proteína PA	14300	Kosaric & Sukan, 1993
		Biodispersan	51400	Rosenberg <i>et al.</i> , 1988
		Emulsan	9800000	Rosenberg & Ron, 2013

En la Tabla 4, se presentan los diferentes grupos de BS con sus respectivas clases y microorganismos productores.

Tabla 4. Clasificación de los BS según su estructura química y origen microbiano (Shekhar *et al.*, 2014; Shafiei *et al.*, 2014; Soberón & Maier., 2011; Kosaric *et al.*, 1987)

Estructura química	Clase de BS	Microorganismo productor
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
	Soforolípidos	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>C. antartica</i> , <i>C. botistae</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>C. riodocensis</i> , <i>C. bogoriensis</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. lypolytica</i>
	Cellobiolípidos	<i>Torulopsis apicola</i> , <i>T. petrophilum</i> , <i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>
	Trehalosa dicorynemycoaltos	<i>R. erythropolis</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>
	Manosileritritol	<i>C. antartica</i> , <i>Kurtzmanomyces sp.</i> , <i>Pseudozyma siamensis</i>
	Trehalosa Dimycolatos	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i>
Lipopéptidos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. velezensis</i>
	Gramicidina S	<i>Brevibacterium brevis</i>
	Polimixina	<i>Brevibacterium polymyxa</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>
Fosfolípidos (o Ácidos grasos)	Ácidos grasos	<i>Candida lepus</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Mycococcus sp.</i> , <i>Clavibacter michiganensis subsp. Insidiosus</i>
	Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Torulopsis maynoliae</i>
Poliméricos	Emulsan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>

Estructura química	Clase de BS	Microorganismo productor
Poliméricos	Proteína lípido manano	<i>Candida tropicalis</i>
	Liposán	<i>Candida lipolytica</i>
	Lípido proteína carbohidrato	<i>Pseudomonas fluorescens, Debaryomyces polymorphis</i>
	Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Particulados	Vesículas y fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas marginilis, Pseudomonas Maltophilia</i>
	Células enteras	Variedad de bacterias

#### 1.4 Aplicaciones potenciales en la industria de los biosurfactantes

Por sus propiedades emulsificantes y tensoactivas los BS tienen aplicaciones en diversos sectores industriales. Algunas de ellas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales aplicaciones industriales de los BS (Rosenberg & Ron, 2013; Shafiei et al., 2014)

Sector industrial	Uso del BS
Petrolero	Recuperación mejorada del petróleo, mejora el drenaje de aceite en pozo, estimula la liberación de petróleo atrapado, humectación de superficies sólidas, reducción de la viscosidad del aceite, disminución de la tensión interfacial.
Minero	Agentes secuestrantes, espumantes y flotantes de metales
Ambiental	Biorremediación de suelos contaminados con petróleo y agua, emulsificación de hidrocarburos, disminución de la tensión interfacial, agente dispersante y espumoso; proceso de lavado de suelo, tratamiento de lodos de aguas residuales en residuos aceitosos; degradar colorantes textiles, limpieza de tanques de aceite y la recuperación mejorada de aceite (Cortés et al., 2013), remoción de metales pesados
Farmacéutico y terapéutico	Acción antimicrobiana contra bacterias, hongos, algas y virus, agentes adhesivos; moléculas inmunomoduladoras; vacunas, adhesión bacteriana, terapia génica
Agrícola	Formulaciones de herbicidas y pesticidas, Mecanismos de biocontrol de parásitos, plagas, resistencia sistémica inducida e hipovirulencia
Microbiológico	Movilidad celular, comunicación celular, adhesión de nutrientes, competencia célula-célula
Alimentario	Emulsificante, solubilizante, desemulsificante. Suspensión, agente humectante espumoso; espesante, agente lubricante, agente protector que interactúa con lípidos, proteínas y carbohidratos; en el procesamiento de frutas y vegetales agentes de limpieza y sanitizantes en la remoción de pesticidas; En la pastelería, panadería y producción de helados como agentes solubilizantes de sabor, control de la consistencia y retardo del endurecimiento; en el cocinado de grasas y aceites previenen salpicaduras debido al sobrecalentamiento (Cortés et al., 2013)

Sector industrial	Uso del BS
Bioprocesamiento	Elaboración secundaria. Biocatálisis en sistemas acuosos de dos fases y microemulsiones, biotransformaciones, recuperación de productos intracelulares, mayor producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación
Cosmético	Productos de salud y belleza. Emulsificantes, agentes espumosos, solubilizantes, agentes humectantes, productos de limpieza, agente antimicrobiano, mediadores de acción enzimática

Entre las empresas que utilizan y producen BS se encuentran, AGAE Technology, Jeneil Biotech, Sigma-Aldrich y Santa Cruz Biotech de Estados Unidos, Soliance de Francia, Ecover del Reino Unido y Saraya Co. Ltd de Japón<sup>1</sup>.

Este trabajo se enfocará en la producción de BS que pertenecen al grupo de los lipopéptidos (LP) producidos por *Bacillus subtilis*.

### 1.5 Generalidades de los lipopéptidos

Los LP son producidos por bacterias, hongos y levaduras. Especies del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y actinomicetos (*Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Brevibacterium*) son ejemplos de microorganismos productores de LP. Se componen de péptidos unidos a ácidos grasos, con el resto peptídico a menudo cíclico y/o neutro o tener una carga negativa. Cada uno se presenta en varias isoformas que difieren en la longitud del ácido graso, sustitución de aminoácidos en el grupo peptídico y la unión entre las dos partes (Inès & Dhouha, 2015). La producción de estas isoformas depende de la fuente de carbono y otros nutrientes disponibles (Mejía, 2008).

---

<sup>1</sup> Tomado de <http://es.slideshare.net/ErickSnchez1/biosurfactantes-bionegocios>

Los BS lipopeptídicos se producen de forma natural como mezcla de varias macromoléculas que pertenecen a la misma familia o clase, por ejemplo *B. subtilis* JKK328 y *B. subtilis* S499 pueden producir tres tipos de homólogos (surfactina, iturina y fengicina), *B. subtilis* BBK-1 coproduce surfactina, pliplastatina y bacilomicina L, *B. subtilis* JKK238 coproduce iturina, fengicina y surfactina y *B. licheniformis* F2.2 coproduce pliplastatina y surfactina. En general, los parámetros nutricionales pueden influir en el tipo del lipopéptido producido (Inès & Dhouha, 2015).

Los LP se caracterizan por diversas propiedades funcionales como la emulsificación, la dispersión, la formación de espuma, la reducción de la viscosidad, la solubilización, agentes de movilización y la capacidad de formación de poros que permite su uso en muchos dominios (Inès & Dhouha, 2015), como lo es su actividad sobre las membranas celulares, hemolítica, también contra bacterias, virus, micoplasmas y tumores o actuar como inmunomoduladores o inhibidores de enzimas; por ello, hay interés en su uso para aplicaciones terapéuticas, farmacológicas y médicas (Slivinski *et al.*, 2012).

El uso de los BS se ha limitado por su alto costo de producción y purificación. El costo puede ser reducido por el uso de sustratos económicos o de desecho. La optimización de las condiciones de cultivo e implementación de procesos de purificación efectiva y rentable; y el uso de cepas sobreproductoras, mutantes o recombinantes, son estrategias para aumentar los rendimientos (Mondragón, 2011).

La surfactina se vende comercialmente en presentaciones de 10 a 50 mg por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.) y Santa Cruz Biotecnología (CA, EE.UU.) producida por

*Bacillus subtilis* en cultivo líquido (Slivinski *et al.*, 2012). El precio de venta aproximado actualmente para la presentación de 10 y 50 mg es de 251 y 950 dólares estadounidenses (USD) respectivamente (Sigma-Aldrich, número de catálogo: S3523)<sup>2</sup>. Otros LP en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.) como la anfotericina B de *Streptomyces sp* de 5 g tiene un costo de venta de 1821 USD (número de catálogo: A4888)<sup>3</sup>, la fengicina (plipastatina) de 5 mg 649 USD (número de catálogo: SMB00292)<sup>4</sup> y la iturina de 5 mg 560 USD (número de catálogo: I1774)<sup>5</sup>. En comparación, el costo de los surfactantes químicos es de alrededor de  $0.24 \frac{\text{USD}}{\text{mL}}$  o  $\frac{\text{USD}}{\text{g}}$  (Sigma-Aldrich, ver “surfactant”)<sup>6</sup>.

## 1.6 Métodos analíticos para la evaluación de lipopéptidos

Las técnicas de extracción de LP crudos a partir de un medio acuoso sin biomasa más comunes son: la precipitación ácida con HCl concentrado, la extracción con solventes orgánicos, la precipitación con sulfato de amonio y el fraccionamiento de espuma. En la Tabla 6 se muestra algunas características de las técnicas mencionadas (Inès & Dhouha, 2015; Mukherjee *et al.*, 2006;).

---

<sup>2</sup> Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3523?lang=es&region=MX>

<sup>3</sup> Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4888?lang=es&region=MX>

<sup>4</sup> Tomado de [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/smb00292?lang=es&region=MX](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/smb00292?lang=es&region=MX)

<sup>5</sup> Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i1774?lang=es&region=MX>

<sup>6</sup> Tomado de

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=surfactant&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=es&region=MX&focus=product>

Tabla 6. Técnicas de extracción de LP

Proceso de Recuperación	Propiedad aprovechada del LP	Configuración necesaria para el proceso	Ventaja	Desventaja
Fracionamiento de espuma	Formar y crear particiones en la espuma	Biorreactores que faciliten la recuperación de espuma durante la fermentación	Alta pureza	No reportada
Extracción con disolvente orgánico	Soluble en disolventes orgánicos por presencia de extremo hidrófobo	No se requiere configuración	Eficiente recuperación y purificación parcial	Alta selectividad de solubilidad debido a la hidrofobicidad y la naturaleza del solvente, toxicidad y alto costo
Precipitación con ácido	Insolubles a valores de pH bajos	No se requiere configuración	Bajo costo, eficiente recuperación	No reportada
Precipitación con sulfato de amonio	Rico en proteína	No se requiere configuración	Eficiente aislamientos de cierto BS poliméricos	Debe ser seguido por diálisis para eliminar pequeños contaminantes y sales

El análisis de LP es complejo debido a que en un cultivo se presenta isoformas de una misma familia o diferentes clases de LP (Inès & Dhouha, 2015). En la Tabla 7 se muestran algunos métodos cuantitativos como cualitativos que se han utilizado.

Tabla 7. Métodos analíticos de LP

Método analítico	Metodología/ Instrumento	Variable respuesta	Referencia
HPLC	Flujo: 0.5-1.5 $\frac{mL}{min}$ , temperatura: 30°C, detector: U.V a 205 nm, volumen de inyección: 20 $\mu$ L. Columna C18 de fase reversa; fase móvil para surfactina 3.8 mM ácido trifluoroacético/acetonitrilo (1:4 $\frac{v}{v}$ ); para iturina A acetonitrilo/10 mM acetato de amonio (4/3 $\frac{v}{v}$ )	Sumatoria del área de los diferentes picos basados en curvas estándar	Slivinski <i>et al.</i> , 2012; Ohno <i>et al.</i> , 1995
Tensión superficial ( $\gamma$ )	Tensiómetro Du-Nouy a 25°C. la CMC corresponde al punto donde hay un cambio de pendiente abrupto de la tensión superficial contra la concentración del BS	Medida de tensión superficial y CMC	Slivinski <i>et al.</i> , 2012; Satpute <i>et al.</i> , 2010

Método analítico	Metodología/ Instrumento	Variable respuesta	Referencia
Índice de emulsificación ( $E_{24}$ )	Mezclar un volumen de hidrocarburo a un volumen igual de solución lipopeptídica en un tubo de ensayo y llevado a vórtex a alta velocidad por 2 min y medir a las 24 h	Porcentaje de la altura de la capa emulsionada por la altura total de la columna de líquido	Zhu <i>et al.</i> , 2013; de Faria <i>et al.</i> , 2011
Análisis de espectro infrarrojo	Espectrómetro FT-IR en un rango de longitudes de onda entre 500-4000 $\text{cm}^{-1}$	Transmitancia (%). Identificar la composición de una muestra	Das <i>et al.</i> , 2007; Sousa <i>et al.</i> , 2014; de Faria <i>et al.</i> , 2011
Análisis de espectrometría de masas por ESI-FTMS	Espectrómetro de masas	Abundancia relativa. Elucidar la estructura de un compuesto	de Faria <i>et al.</i> , 2011
Actividad hemolítica	El microorganismo es cultivado en un medio suplementado con sangre e incubado por 48 h.	Zona limpia alrededor de una UFC	Satpute <i>et al.</i> , 2010;
Caída de la gota	En un pozo de una microplaca se adiciona un volumen de hidrocarburo y posteriormente la muestra a evaluar	Colapso de la gota sobre el hidrocarburo	Satpute <i>et al.</i> , 2010
Actividad surfactante	En una caja Petri se adiciona agua destilada, luego un volumen de hidrocarburo y finalmente el mismo volumen de la muestra a evaluar	Diámetro o área de desplazamiento del hidrocarburo	Morikawa <i>et al.</i> , 2000; Satpute <i>et al.</i> , 2010
Actividad emulsificante	Se realiza una mezcla de hidrocarburo, buffer y la muestra a evaluar, luego se somete a vórtex y se mide la absorbancia entre 400-600 nm. Se considera una unidad emulsificante a la absorbancia multiplicada por el factor de dilución.	Absorbancia-unidad emulsificante	Ortega, 2013; Rosenberg <i>et al.</i> , 1979; Kim <i>et al.</i> , 1997; Satpute <i>et al.</i> , 2010

### 1.7 Ventajas de la fermentación en medio sólido

La fermentación es la conversión biológica anaeróbica de moléculas orgánicas (carbohidratos, alcoholes, hidrocarburos) en otras moléculas orgánicas (etanol, ácidos orgánicos, acético, láctico, etc.). Es común usar el término fermentación para referirse a cualquier tipo de procesos (aerobios/anaerobios) en los que participan microorganismos.

La fermentación en estado sólido (FMS) involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas húmedas en situaciones en las que los espacios entre las partículas contienen una fase gaseosa continua y un mínimo de agua visible. Aunque puede haber gotas de agua entre las partículas y existan delgadas películas de agua sobre las partículas, la fase acuosa entre partículas es discontinua y la mayoría del espacio interpartícula está ocupado por la fase gaseosa. La mayoría del agua presente en el sistema está absorbido dentro de las partículas húmedas (Mitchell *et al.*, 2006).

La FMS puede llevarse a cabo con soportes inertes a los cuales se adiciona el medio de cultivo o con sustratos sólidos que contienen todos los nutrientes para el crecimiento microbiano (Chen, 2013). El primero es poroso y como su nombre lo indica, es inerte y difícil de ser descompuesto por los microorganismos, algunos ejemplos de soportes inertes son la espuma de poliuretano, resinas macroporosas, perlita y vermiculita. Estos funcionan como soporte en el proceso de fermentación así los microorganismos pueden obtener los nutrientes del medio de cultivo que fluye y se distribuye en el espacio del medio poroso. El segundo tipo de sustrato hace referencia a cultivos de salvado de trigo, harina de soja, residuos agrícolas y forestales como paja, bagazo y aserrín. Funciona como una estructura física para el crecimiento de microbios además de proporcionar una fuente de carbono y de nitrógeno y factores de crecimiento para los microorganismos (Chen, 2013).

En la producción de BS, la FMS se propone como una alternativa sobre la FML que presenta algunos de los siguientes problemas; al utilizar aireación y agitación forzada, se genera espuma, afectando el proceso y generando bajas concentraciones de

producto; existe baja transferencia de masa especialmente en la alta demanda de oxígeno que el proceso requiere y hay un aumento de la viscosidad del medio debido a la formación de exopolisacáridos (Thomas *et al.*, 2013). Dichos problemas se ven reflejados en el aumento de costos de producción. Por otra parte, la FMS presenta mayor productividad en comparación con la FML en productos como vinagre, salsa de soya, especias, hongos comestibles, enzimas microbianas como amilasas, glucosidasas, celulasas y otros metabolitos microbianos como nucleótidos, lípidos, vitaminas, amino ácidos (Chen, 2013); también en la producción de combustibles y antibióticos. Por ejemplo, se reportó que la producción de quitosano fue 20 veces mayor con FMS que con FML (Kanimozhi *et al.*, 2014). La producción de una proteinasa extracelular en FMS 1.5-3.5 veces más alta que en FML (Osmolovsky *et al.*, 2013) y la productividad de la  $\beta$ -fructofuranosidasa extracelular producida en FMS fue más alta que en FML (Balasubramaniam *et al.*, 2001).

La FMS implica desafíos, como la selección de un tipo de biorreactor que permita la eliminación de calor, el uso de sustratos con propiedades físico-químicas y nutricionales adecuadas, métodos para el control del proceso de cultivo y la recuperación de los BS desde el sólido fermentado. Si se logra resolver estos problemas, la FMS puede utilizarse para la producción de BS a gran escala.

El reto de la producción de BS a gran escala está en resolver problemas como los rendimientos de producción, costos, y los procesos para la recuperación y purificación (lo que representa alrededor de 60% de los costos); sobre todo para el uso de BS en las aplicaciones terapéuticas.

Tabla 8. Producción de LP en diferentes medios y métodos de cultivo

Cepa	Medio	FM	LP	Concentra	Ref
<i>B.subtilis</i> ATCC 21322	Semisintético	L	Surfactina	$1.5 \frac{mg}{mL}$	Huang <i>et al.</i> , 2015
<i>B.pumilus</i> UFPEDA 448	Okara + bagazo de caña de azúcar	S	Surfactina	$6.5 \frac{mg}{g\ ms}$	Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>Brevibacterium luteolum</i>	Aceite mineral	L	No identificado	Contenido no establecido ( $E_{24}$ de 79.3% con queroseno)	Vilela <i>et al.</i> , 2014
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	Melazas pretratadas	S	Ester ácido metil octadecanoico y una parte peptídica con 4 aminoácidos	Contenido no establecido ( $E_{24}$ de 86% con queroseno)	Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> TSB.MJ10	Benzoato de sodio	L	No identificado	Contenido no establecido ( $E_{24}$ de 35% con queroseno)	de Sousa & Bhosle, 2012
<i>B. subtilis</i> S3	Salvado de arroz y harina de trigo	S	Iturina	$20.8 \frac{mg}{g\ ms}$	Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>B. subtilis</i> B6-1	Residuos de soya y batata	S	Fengicina	No establecido	Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus ehimensis</i> MA2012	Gelatina de quitina	L	Isoforma de Polipeptina C	No establecido (125 ppm disminuyó la $\gamma_{agua}$ de 72.2 a $36.4 \frac{mN}{m}$ )	Naing <i>et al.</i> , 2015
<i>Kitasatospora cystarginea</i> NRRL-B16505	Semisintético	L	Cistargamida	No establecido	Gill <i>et al.</i> , 2014

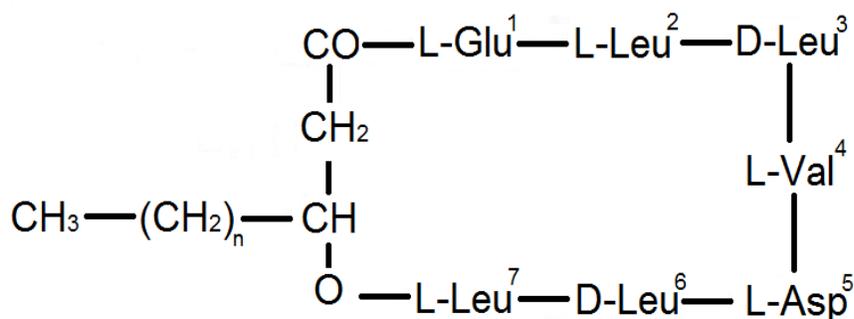
(FM: fermentación en medio, L: líquido, S: sólido, Concentra: concentración, Ref: referencia, ms: materia seca)

En la Tabla 8 se muestra algunos resultados de producción de LP por diferentes cepas, medios y métodos de cultivo. Los LP pueden ser producidos en sustratos hidrofílicos

como carbohidratos e hidrofóbicos como hidrocarburos y aceites vegetales (Inès & Dhouha, 2015).

### 1.8 *Bacillus subtilis*: productor de lipopéptidos

Diferentes especies de *Bacillus* son conocidas por producir LP cíclicos, incluyendo surfactina, iturina, fengicina, lichenisina, micosubtilina y bacilomicina como las principales clases de BS (Plaza *et al.*, 2011; Slivinski *et al.*, 2012). La surfactina es uno de los más poderosos BS, puede reducir la tensión superficial del agua pura y el aire de 72- 27  $\frac{mN}{m}$  a concentraciones tan bajas como 0.005% ( $\frac{p}{v}$ ) (Desai & Banat, 1997). En la Figura 1 se muestra la estructura de la familia de la surfactina y sus isoformas, en la cual se observa que los aminoácidos que corresponden a las posiciones 3, 5 y 6 son los únicos que no varían.



Variantes:

Esperina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-COOH
Lichenisina	L-XL <sub>1</sub> -L-XL <sub>2</sub> -D-Leu-L-XL <sub>4</sub> -L-Asp-D-Leu-L-XL <sub>7</sub>
Pumilacidina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP <sub>7</sub>
Surfactina	L-Glu-L-XS <sub>2</sub> -D-Leu-L-XS <sub>4</sub> -L-Asp-D-Leu-L-XS <sub>7</sub>

**XL<sub>1</sub>= Gln o Glu; XL<sub>2</sub>= Leu o Ile; XL<sub>4</sub> y XL<sub>7</sub>= Val o Ile; XP<sub>7</sub>= Val o Ile; XS<sub>2</sub>= Val, Leu o Ile; XS<sub>4</sub>= Ala, Val, Leu o Ile; XS<sub>7</sub>= Val, Leu o Ile**

Figura 1. Estructura de la familia de la surfactina y sus isoformas (Inès & Dhouha, 2015)

*Bacillus subtilis* es una bacteria bacilo saprofita, gram positiva, autóctona del suelo, formadora de esporas (Melloni *et al.*, 1982). Esta bacteria crece en forma de célula individual o en pequeñas cadenas. Su clasificación se muestra en la Tabla 9.

*Bacillus subtilis* presenta capacidad de moverse con flagelos peritricos, es aerobia facultativa (Koneman & Allen, 2008), presenta altas tasas de crecimiento; adicionalmente a diferencia de las otras especies se desarrolla en un amplio rango de temperaturas (15 a 70°C) y pH (2 a 9.3) (Buitrago *et al.*, 2011), reduce los nitratos y asimila el almidón. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 35°C y crece a valores de actividad de agua de 0.93 a 0.95.

Tabla 9. Clasificación científica de *Bacillus subtilis*

<b>Clasificación científica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Clase</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Orden</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Familia</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Especie</b>	<i>B. subtilis</i>

### 1.8.1 Producción de lipopéptidos

Los LP son metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios a diferencia de los compuestos intermedios y cofactores que intervienen en la síntesis de estructura celular y transducción de energía, no son esenciales para el crecimiento y el metabolismo reproductivo, es decir no presentan funciones metabólicas esenciales (Vining, 1990). No obstante, son importantes para el microorganismo que los produce.

Los metabolitos secundarios son sintetizados esencialmente a partir de una variedad de metabolitos primarios (Herbert, 1989).

Los metabolitos secundarios normalmente no se producen durante la fase de crecimiento rápido (trofofase), sino en una fase posterior (idiofase) cuando el crecimiento se limita por el agotamiento de uno o más nutrientes claves. Esos pueden ser la fuente de carbono, de nitrógeno o de fósforo (Barrios, 2012). El tipo de nutriente que limita el crecimiento es importante en la optimización de la producción de muchos metabolitos secundarios. Davis *et al.* (1999) reportaron el efecto de las limitaciones de carbono y nitrógeno en la producción de surfactina mediante el uso de un medio definido. En dicho reporte se alcanzó el más alto rendimiento  $\frac{Y_P}{X}$  en condiciones pobres de oxígeno y con nitrato limitado.

La producción de LP se ha experimentado en FMS y en FML a escala de matraz y de fermentador, variando parámetros ambientales, optimizando componentes del medio o elementos traza y utilizando en ocasiones cepas mutantes. En la Tabla 10 y 11 se presentan algunos resultados de producción de LP principalmente por *B.subtilis* en diferentes medios de FML y FMS respectivamente.

Tabla 10. Concentración y productividad de algunos LP en FML bajo diferentes medios

Cepa	Medio	LP	Concentración	Productividad	Referencia
<i>B.subtilis</i> C9	Semisintético	No identificado	No establecido (40 $\mu M$ disminuyó la $\gamma$ agua de 72 a 29 $\frac{mN}{m}$ )		Kim <i>et al.</i> , 1997
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Semisintético (Suero de leche)	Surfactina	0.29 $\frac{mg}{mL}$	4(10 <sup>-3</sup> ) $\frac{mg}{mLh}$	Cagri-Mehmetoglu <i>et al.</i> , 2012
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Sintético	Surfactina	0.68 $\frac{mg}{mL}$	0.05 $\frac{mg}{mLh}$	Jokari <i>et al.</i> , 2013
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Sintético	Surfactina	3.6 $\frac{mg}{mL}$	0.07 $\frac{mg}{mLh}$	Yeh <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Sintético	Surfactina	6.45 $\frac{mg}{mL}$	0.1 $\frac{mg}{mLh}$	Yeh <i>et al.</i> , 2006
<i>B.subtilis</i> RB14	Semisintético	Iturina	4.0 $\frac{mg}{mL}$	0.02 $\frac{mg}{mLh}$	Rahman <i>et al.</i> , 2006
<i>B.subtilis</i> F29-3	Semisintético	Fengicina	3.5 $\frac{mg}{mL}$		Wei <i>et al.</i> , 2010

(FM: fermentación en medio)

Tabla 11. Concentración y productividad de algunos LP en FMS bajo diferentes medios

Cepa	Medio	LP	Concentración	Productividad	Referencia
<i>B. subtilis</i> S3	Salvado de arroz y harina de trigo	Iturina	20.8 $\frac{mg}{g ms}$		Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>B. subtilis</i> B6-1	Residuos de soya y batata	Fengicina	No establecido		Slivinski <i>et al.</i> , 2012
<i>B. subtilis</i> DM-03	Cascaras de papa	No identificado	67 $\frac{mg}{g ms}$	1.4 $\frac{mg}{g ms h}$	Das <i>et al.</i> , 2007
<i>B. amyloliquefaciens</i> XZ-173	Harina de soja	No identificado	40 $\frac{mg}{g ms}$	1.7 $\frac{mg}{g ms h}$	Zhu <i>et al.</i> , 2013 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> XZ-173	Paja de arroz + harina de soja	Surfactina	15 $\frac{mg}{g ms}$	0.3 $\frac{mg}{g ms h}$	Zhu <i>et al.</i> , 2013 a
<i>B. subtilis</i> MI113	Okara	Surfactina	2 $\frac{mg}{g mhum}$	0.1 $\frac{mg}{g mhum h}$	Ohno <i>et al.</i> , 1995
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	Okara + bagazo de caña de azúcar	Surfactina	6.5 $\frac{mg}{g ms}$		Slivinski <i>et al.</i> , 2012

(FM: fermentación en medio, ms: materia seca, mhum: materia húmeda)

Las condiciones de cultivo, como el pH inicial del medio de cultivo, la temperatura de incubación, la concentración del oxígeno disuelto y el grado de aireación influyen en la producción del BS porque afectan el crecimiento celular. *B. subtilis* produce surfactina a temperaturas de 25°C a 37°C (Chen *et al.*, 2015). Algunas investigaciones han mostrado que la temperatura afecta el tipo de familia del LP generado; por ejemplo para *B. subtilis* RB14 una temperatura óptima de producción de iturina fue de 25°C, sin embargo, a 37°C, la misma cepa produce surfactina (Inès & Dhouha, 2015).

El pH del medio también afecta la producción de surfactina en *B. subtilis*. Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) evaluaron el efecto del pH entre 6.5 a 9.0 y encontraron que a pH inicial 6.8 el rendimiento fue mayor. Yeh *et al.* (2006) reportaron que a pH ácidos la surfactina se precipita. El tamaño y edad del inóculo está correlacionado con la producción del BS ya que afecta el período de fase lag, la tasa específica de crecimiento, la biomasa y la esporulación (Sen & Swaminathan, 2004; Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011).

El suministro de oxígeno y la eficiencia de transferencia de masa son importantes en la cinética de producción de surfactina. Yeh *et al.* (2006) indicaron que el aumento del oxígeno disuelto a velocidades de agitación más altas tuvo un efecto positivo en la producción de surfactina. Sin embargo, una alta agitación (más de 250 rpm) redujo la producción de surfactina por acumulación de espuma; que disminuyó la transferencia de oxígeno y el rendimiento de surfactina. En otro estudio, en reactores agitados (3 L) se optimizó el flujo de aire, con  $1.5 \frac{L}{min}$  aumentó la concentración de surfactina en la

espuma de 1.8 a 3.5  $\frac{g}{L}$ , pero a flujos más altos de 3  $\frac{L}{min}$ , ocurrió un arrastre de líquido y la concentración de la surfactina disminuyó (Shaligram *et al.*, 2010). Sheppard y Cooper citados en Chen *et al.* (2015), identificaron que la transferencia de oxígeno es uno de los parámetros críticos para la optimización y escalado del proceso.

En cuanto a las condiciones nutricionales, se ha demostrado que el uso de un medio definido con fuentes de carbono como manitol, sacarosa, glucosa y melaza favorece la producción de surfactina (Chen *et al.*, 2015). Las fuentes de nitrógeno inorgánicas como nitrato de amonio, nitrato de sodio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, bromuro de amonio, carbonato de amonio y sulfato de amonio han demostrado ser las más adecuadas para la producción de surfactina (Chen *et al.*, 2015).

Además a la fuente de nitrógeno y carbono, el suplemento de cationes divalentes influye en la producción de LP. Lin *et al* reportaron la estimulación de la producción de iturina por la adición de  $Fe^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Inès & Dhouha, 2015). Sheppard y Cooper. (1991) en la producción de surfactina reportaron una íntima relación en la disponibilidad de  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  y el uso de nitrógeno. El  $Mn^{2+}$  potencia la actividad de la glutamato sintasa, la cual aumenta la absorción y transformación de nitrógeno, proporcionando más aminoácidos libres para la síntesis de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 (Huang *et al.*, 2015). Cooper *et al.* (1981) intentaron mejorar el rendimiento de la fermentación mediante la adición de los elementos traza como  $FeSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $ZrOCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $NiSO_4$  y  $CoSO_4$ , de estos,  $FeSO_4$  y  $MnSO_4$  tuvieron un efecto positivo significativo en producción de surfactina o biomasa,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaNO_3$  y  $ZrOCl_2$  no tuvieron ningún

efecto; las sales,  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $NiSO_4$  y  $CoSO_4$  inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*. Algunos iones metálicos son cofactores de enzimas involucradas en la sobreproducción de surfactina; en otras palabras, las propiedades del LP se modifican en presencia de cationes inorgánicos (Saharan *et al.*, 2011).

Se ha evaluado la adición de hidrocarburos o ácidos grasos y aminoácidos libres al medio de cultivo. Ghribi & Ellouze-Chaabouni. (2011) evaluaron el efecto de suplementar el medio de cultivo con diferentes fuentes lipofílicas en la producción de LP. Los suplementos fueron; el queroseno, el aceite de oliva, el aceite de maíz, el aceite de girasol, la parafina, el diésel, el heptano y el benceno. Se encontró que en la producción de LP el queroseno fue el que más incremento y el benceno inhibió el bioproceso. Asimismo, estos mismos autores encontraron que la adición de aminoácidos no tuvo un efecto notable en la producción de surfactina.

### *1.8.2 Biosíntesis de lipopéptidos*

Generalmente, los LP resultan de la condensación de partes peptídicas con lipídicas sintetizadas independientemente. Los péptidos son sintetizados en una forma independiente de ribosomas con megaenzimas llamadas péptido sintetetasas no ribosomales (NRPSs). Los LP de *B. subtilis* pueden ser ciclopéptidos (iturina) o macrolactonas (fengicina y surfactina) caracterizados por la presencia de L y D aminoácidos y colas hidrofóbicas variables. Esta producción no requiere solo de inducción transcripcional y traduccional sino también modificaciones postraduccionales y de ensamblaje (Inès & Dhouha, 2015).

Las NRPSs son enzimas multi-modulares que reconocen, activan, modifican y unen los aminoácidos intermediarios al péptido producido. Los péptidos no ribosomales presentan una diversidad estructural alta junto con importantes actividades biológicas. Usualmente las sintetetasas están organizadas en módulos subdivididos en dominios. Cada módulo permite la incorporación de un aminoácido específico en el resto peptídico. Cada dominio tiene una función particular que lidera a la incorporación del aminoácido (Inès & Dhouha, 2015).

La biosíntesis de la parte lipídica es llevada a cabo por numerosos módulos consecutivos que permiten el acople, la activación y la unión del ácido graso al resto peptídico. Después de la biosíntesis del lipopéptido, puede ser sometido a modificaciones como glicosilación o halogenación realizada por enzimas específicas asociadas a las sintetetasas (Inès & Dhouha, 2015).

## 2. Justificación

Diversas especies de *Bacillus* son conocidas por producir lipopéptidos (LP) cíclicos, incluyendo surfactina, iturina, fengicina, lichenisina, micosubtilina y bacilomicina como las principales clases de BS (Plaza *et al.*, 2011; Slivinski *et al.*, 2012). Los LP son atractivos para aplicaciones farmacológicas y médicas. Sin embargo, aún no son producidos a gran escala debido a su alto costo de producción, purificación y baja productividad.

La mayoría de estudios sobre producción de BS se han realizado en fermentación en medio líquido (FML) pero este presenta problemas debido a que las condiciones de aireación y agitación requeridas para la producción de LP generan espuma que afecta el proceso y reduce la concentración de producto. Adicionalmente, la producción de exopolisacáridos provoca un aumento de la viscosidad del medio (Thomas *et al.*, 2013); lo que provoca una baja transferencia de oxígeno. La FMS no presenta dichos problemas.

La FMS ha presentado mayor productividad en comparación con la FML en productos alimenticios como vinagre, salsa de soya, especias, hongos comestibles, enzimas microbianas como amilasas, glucosidasas, celulasas y otros metabolitos microbianos como nucleótidos, lípidos, vitaminas, amino ácidos, etc. (Chen, 2013); también en producción de combustibles y antibióticos. Por ejemplo, se reportó que la producción de quitosano fue mayor 20 veces en FMS que en FML (Kanimozhi *et al.*, 2014). La producción de una proteinasa extracelular fue en FMS 1.5-3.5 veces más alta que en FML (Osmolovsky *et al.*, 2013) y la productividad de la  $\beta$ -fructofuranosidasa

extracelular producida en FMS fue más alta que en FML (Balasubramaniam *et al.*, 2001).

Por consiguiente, para resolver alguno de los problemas que se presentan en FML y debido a que los escasos reportes de producción de LP en FMS han utilizado soportes no inertes, residuos agrícolas o medios complejos. En este trabajo se evaluará la producción de LP por FMS usando un medio definido líquido adsorbido en un soporte inerte utilizando como modelo de estudio la producción de surfactina que es uno de los BS más eficientes.

### **3. Hipótesis**

La producción de lipopéptidos en fermentación en medio sólido permite obtener procesos más productivos que los reportados en la literatura en medio líquido.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar un bioproceso con alta productividad de lipopéptidos de la familia de la surfactina por *Bacillus subtilis* en cultivo en medio sólido

### 4.2 Objetivos específicos

- Diseñar y evaluar el modelo experimental de crecimiento y producción de lipopéptidos por *Bacillus subtilis*
- Evaluar y comparar algunos métodos de análisis de biosurfactantes
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de medios de cultivo en el crecimiento celular y la producción de lipopéptidos
- Determinar el efecto de las condiciones nutricionales sobre la producción de lipopéptidos
- Determinar la composición de los lipopéptidos

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Microorganismo**

Se utilizó una cepa de la colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares del CINVESTAV (México) con número CDBB 555 correspondiente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 reportada como productora de surfactina.

### **5.2 Conservación de la cepa**

#### *5.2.1 A corto plazo*

Se propagó la cepa por estría en tubos inclinados con agar nutritivo (Bioxon). Después de la inoculación, se incubó a 30 °C durante 24 h, posteriormente se conservó a 4°C por un periodo no mayor a 2 semanas.

#### *5.2.2 A mediano plazo*

La cepa se conservó en tubos crioprotectores (Yeast & Mould - Protect) a -20°C.

### **5.3 Medios de cultivo**

#### *5.3.1 Producción de inóculo*

A partir de un tubo inclinado con la cepa e incubado al menos 24 h antes, se inocularon 2 tubos de ensayo con 3 mL de caldo nutritivo (Bioxon) con tapón de algodón. La inoculación se realizó con asa microbiológica. Se incubaron los tubos a 30°C por 24 h a 200 rpm (medio semilla 1). Posteriormente, se vació el contenido de cada tubo en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de caldo nutritivo (Bioxon) respectivamente. Se incubaron a 30°C y 200 rpm por 24 h (medio semilla 2). Al final de este tiempo, los

cultivos fueron usados para inocular los medios de cultivo utilizados para estudios de FMS.

### 5.3.2 Fermentación en medio sólido

La FMS se llevó a cabo utilizando como soporte inerte la agrolita con medio líquido adsorbido. En una primera etapa se utilizó caldo nutritivo (BIOXON) como medio de producción de biomasa a 4 concentraciones (0.5x, 1x, 2x y 4x, donde x corresponde a la concentración comercial del medio (Tabla 12); en todos los casos el pH inicial fue 7.0. Cada cultivo se realizó por duplicado y la FMS se llevó a cabo en matraces de 250 mL.

Tabla 12. Composición del medio caldo nutritivo a diferentes concentraciones

Concentración medio	0.5x	1x	2x	4x
Componente	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$
Peptona de gelatina	2.5	5.0	10.0	20.0
Extracto de carne	1.5	3.0	6.0	12.0

Posteriormente, se seleccionó el medio reportado por Yeh *et al.* (2006) para los estudios de producción de los LP y se evaluaron diferentes concentraciones (Tabla 13). El pH de los medios se ajustó a 7.0. Cada medio se realizó por duplicado y la FMS se realizó en matraces de 250 mL.

Con base en los resultados obtenidos con los medios reportados en la Tabla 13 se diseñaron 4 medios modificando la fuente de nitrógeno y la concentración de  $MnSO_4$  (Tabla 14). El pH de los medios se ajustó a 7.0, se mantuvo la misma relación molar  $\frac{C}{N}=4.4$ . Cada medio se preparó por duplicado y la FMS se realizó en matraces de 250 mL.

Tabla 13. Composición del medio Yeh et al (2006) a diferentes concentraciones

Concentración medio	0.375x	0.75x	1x	1.5x	3x
Componente	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$
Glucosa	15	30	40.00	60	120
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.5	3	4.00	6	12
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6	3.19	4.26	6.39	12.78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.53	3.06	4.08	6.12	12.25
CaCl <sub>2</sub> (x10 <sup>3</sup> )	0.39	0.77	1.03	1.54	3.09
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.07	0.15	0.20	0.30	0.59
Na-EDTA (x10 <sup>3</sup> )	0.44	0.87	1.17	1.75	3.50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.21	0.42	0.56	0.83	1.67

Tabla 14. Medios con presencia o ausencia de MnSO<sub>4</sub> y diferente fuente de nitrógeno

Medio	A	B	C	D
Componente	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$
Glucosa	120	120	120	120
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12		12	
NaNO <sub>3</sub>		12.75		12.75
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.78	12.78	12.78	12.78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.25	12.25	12.25	12.25
CaCl <sub>2</sub> (x10 <sup>3</sup> )	3.09	3.09	3.09	3.09
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.59	0.59	0.59	0.59
Na-EDTA (x10 <sup>3</sup> )	3.50	3.50	3.50	3.50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.67	1.67	1.67	1.67
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (x10 <sup>2</sup> )			8.45	8.45

Finalmente, se realizó un diseño completamente al azar 2<sup>4</sup> para determinar el efecto de Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>. En la Tabla 15 se presenta el rango experimental y niveles de las variables independientes, donde “-“ y “+” es la menor y mayor concentración que se usó de cada nutriente respectivamente. En la Tabla 16 se presenta la matriz del diseño factorial completo para la FMS, es decir las combinaciones de concentraciones de nutrientes que se evaluaron basándose en las indicaciones de la

Tabla 15. La FMS se realizó en frascos ámbar de 30 mL durante 48 h por duplicado de cada medio, Tabla 16.

Tabla 15. Rango experimental y niveles de las variables independientes

	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$	$\frac{g}{L}$
<b>Variable</b>	-	<b>0</b>	<b>+</b>	<b><math>\Delta</math> intervalo</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.59	1.18	1.77	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.16	12.25	16.33	4.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.56	1.67	2.78	1.1
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (x10 <sup>2</sup> )	0.84	8.45	16.06	7.6

Tabla 16. Matriz del diseño factorial completo para la FMS

<b>Medio</b>	<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	+
3	-	-	+	-
4	-	-	+	+
5	-	+	-	-
6	-	+	-	+
7	-	+	+	-
8	-	+	+	+
9	+	-	-	-
10	+	-	-	+
11	+	-	+	-
12	+	-	+	+
13	+	+	-	-
14	+	+	-	+
15	+	+	+	-
16	+	+	+	+

#### 5.4 Preparación de la fermentación en medio sólido

La FMS se llevó a cabo en dos tipos de biorreactores: matraces Erlenmeyer de 250 mL y frascos ámbar de 30 mL.

#### 5.4.1 En matraces de 250 mL

A los medios de cultivo respectivos, se les añadió el inóculo correspondiente al 10% del volumen de medio final. Cada matraz Erlenmeyer de 250 mL al inicio de la fermentación contenía 6 g de agrolita y 14 mL de medio de cultivo. Los matraces se conectaron a un metabolímetro (Saucedo *et al.*, 2016) e incubaron a 30°C con un flujo de aire de 20 a 30  $\frac{mL}{min}$  matraz. La humedad inicial del medio sólido fue de 60%. La fermentación se detuvo cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa alcanzó un valor de 0.01% después de haber alcanzado un máximo.

#### 5.4.2 En frascos ámbar de 30 mL

A los medios de cultivo se les adicionó inóculo correspondiente al 10% del volumen de medio final. Se agitó cada medio y se adicionaron 2.35 mL a frascos ámbar de 30 mL que contenían 1 g de agrolita seca. Se homogenizaron y se incubaron a 30°C. La humedad inicial del medio sólido fue de 60%.

### 5.5 Cinética de producción de los lipopéptidos en fermentación en medio sólido

Los estudios cinéticos de producción de LP se realizaron en frascos ámbar de 30 mL como se indicó en la sección 5.4.2.

Los medios utilizados fueron los que corresponden a los medios C y D de la Tabla 14 y el medio optimizado que corresponde al medio 14 de Tabla 16. Se tomaron muestras aproximadamente cada 12 h. Para los medios C y D la FMS se realizó durante 74 h y se tomaron muestras por duplicado y para el medio optimizado durante 96 h se tomaron muestras por triplicado.

## 5.6 Recuperación de los lipopéptidos

Para obtener el extracto extracelular, se tomó 1 g de materia húmeda (agrolita + caldo de cultivo+ biomasa + BS) y se adicionaron 10 mL de agua destilada, se agitó con vórtex 2 minutos, se tomaron 8 mL del extracto resultante (extracto crudo) evitando la agrolita y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min.

El extracto crudo se sometió a precipitación ácida para concentrar el BS mediante la adición de HCl 6 M hasta obtener un pH final de 2.0 y se dejó a 4°C durante 12 h obteniéndose un precipitado, el cual se sedimentó a 3000 rpm durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y finalmente, se adicionaron 2 mL de agua alcalina con NaOH pH 11.

## 6. Métodos analíticos

### 6.1 Producción de CO<sub>2</sub>

La producción de CO<sub>2</sub> se midió por medio de un metabolímetro acoplado a una computadora personal (Saucedo *et al.*, 2016) para estimar la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) y el tiempo de la fase lag.

Se realizaron los cálculos con los datos experimentales obtenidos por el metabolímetro y la ayuda de una hoja de cálculo. Se graficaron los valores observados de la integral de CO<sub>2</sub> vs tiempo y la curva obtenida se ajustó a un modelo logístico (Favela *et al.*, 2001) en el cual se puede determinar  $\mu_{CO_2}$  ajustando una curva de crecimiento usando la herramienta "Solver" del programa Excel (Microsoft).

Una vez obtenida la gráfica de la integral de CO<sub>2</sub> vs tiempo, se calculó la pendiente de la fase exponencial y la intersección con el eje horizontal. Para obtener el valor de la fase lag, se dividió el valor de la intersección entre el valor de la pendiente.

## **6.2 Cuantificación de los lipopéptidos**

Se utilizaron dos métodos para medir los LP, los cuales fueron actividad surfactante y actividad emulsificante.

### *6.2.1 Actividad surfactante*

Se basó en el método de la gota (actividad de desplazamiento del crudo) reportado por Morikawa *et al.* (2000) y Abdel-Mawgoud *et al.* (2008). Se añadieron 10 mL de agua destilada a una caja de Petri plástica (55 x 14.2 mm) seguido por la adición de 20 µL de petróleo (crudo Maya<sup>7</sup>) con xileno 1:4  $\frac{p}{p}$  a la superficie del agua y posteriormente 20 µL del extracto crudo concentrado a la superficie del hidrocarburo. Las muestras fueron adicionadas con un ángulo de 45 ° que se forma entre la punta de la micropipeta y la superficie del hidrocarburo. Se midió el área de desplazamiento del hidrocarburo que generaba la muestra. Cada muestra se analizó por triplicado. Para la determinación del área, se trazó y midió la longitud de 4 líneas equitativas sobre la zona limpia del crudo, con las cuales se realizó un promedio del diámetro y se estimó el área.

---

<sup>7</sup> Tomado de <http://www.pemex.com/comercializacion/productos/Paginas/petroleo/crudo-maya.aspx>

### 6.2.2 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante (AE) se determinó del extracto crudo. A 400  $\mu\text{L}$  de muestra se agregaron 2.6 mL de Tris-HCl (20 mM, pH 7) con  $\text{MgSO}_4$  (10 mM), enseguida se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de mezcla n-hexadecano: 2-metilnaftaleno 1:1 (v: v) (Ortega, 2013; Rosenberg *et al.*, 1979; Kim *et al.*, 1997; Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011). Se agitó un vórtex vigoroso por 2 min y se leyó la densidad óptica a los 5 min a 600 nm. Una absorbancia de 0.1 unidades a 600 nm multiplicada por el factor de dilución fue considerada como una unidad emulsificante por mL ( $\frac{UE}{\text{mL}}$ ).

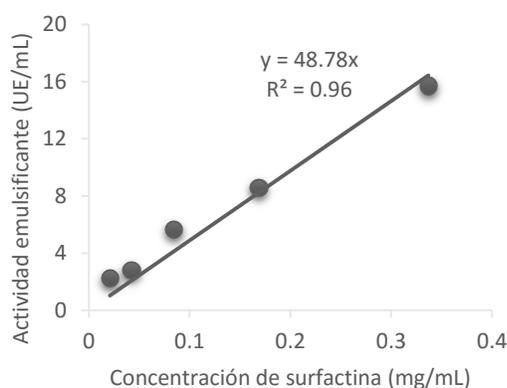


Figura 2. Curva estándar para estimar los LP en  $\frac{\text{mg Eq SF}}{\text{gmsf}}$

Para considerar la actividad de los LP equivalentes a surfactina se realizó una curva estándar (Figura 2) con concentraciones de surfactina conocidas y se relacionó con los gramos de materia seca final (gmsf). Para ello se encontró la relación de la actividad emulsificante expresada como  $\frac{UE}{\text{mL}}$  con la concentración de surfactina expresada como  $\frac{\text{mg SF}}{\text{mL}}$ . Se encontró la relación de  $48.78 \frac{UE}{\text{mg SF}}$ . De aquí en adelante se mencionará como la curva estándar para estimar la concentración de LP expresada como equivalentes

de surfactina (Eq SF). En el anexo 1, se muestra el análisis del error de la pendiente estimada.

### **6.3 Análisis infrarrojo**

El espectro FT-IR de 10 mg de la muestra (producto en polvo seco) se registró en un espectrómetro FT-IR- PerkinElmer a longitudes de onda de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  usando como soporte KBr.

### **6.4 Análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)**

La muestra (producto en polvo seco) fue resuspendida en acetonitrilo al 50% con 0.1% de ácido trifluoroacético a una concentración de  $1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ . Se agito exhaustivamente para lograr solubilizar, luego la preparación se centrifugo a 10000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomaron  $2 \mu\text{L}$  en un tubo Eppendorf y se agregaron  $2 \mu\text{L}$  de la solución matriz (ácido  $\alpha$ -ciano -4-hidroxicinámico). Se agitó y se aplicó  $1 \mu\text{l}$  de la mezcla a la placa del MALDI. Se analizó en un equipo Autoflex III Maldi Tof Tof (Bruker Daltonics). Se usó modo Reflectron en un rango de valores  $\frac{m}{z}$  de 500 a 3500.

### **6.5 Glucosa residual**

La determinación de glucosa se llevó a cabo mediante el kit enzimático SPINREACT. Se utilizó el estándar original del kit el cual se diluyo 1:10 quedando a una concentración final de  $0.1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ .

En un tubo de ensayo se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra a evaluar, luego se agregaron 900  $\mu\text{l}$  del reactivo. Se agitó en vórtex y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro

(Shimadzu UV 1800) a 505 nm. Las muestras si era necesario se diluyeron para llevarlas a una concentración de glucosa menor a  $5 \frac{mg}{mL}$  por sugerencias del kit.

### **6.6 pH**

El extracto crudo se utilizó para el análisis de pH mediante el uso de un potenciómetro.

### **6.7 Humedad**

La humedad se midió con 1 g de muestra fermentada en una termobalanza (Ohaus®) a 105°C hasta peso constante (Alrededor de 15 min).

### **6.8 Análisis estadístico**

El software IBM SPSS Statistics 20 se utilizó para el análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey con  $\alpha$  igual a 0.05.

## 7. Estrategia experimental

La estrategia experimental consistió en tres etapas (Figura 3): En una primera etapa se realizó el análisis del efecto de medios de cultivo en medio sólido a diferentes concentraciones en el crecimiento de *B.subtilis* y la producción de LP. Los medios de cultivo fueron uno reportado para producción de biomasa (caldo nutritivo) y otro para producción de surfactina (Medio reportado por Yeh *et al.* (2006)). Se seleccionó el medio a la concentración que mayor producción de LP generara.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de componentes en el medio de cultivo en la producción de LP. Los componentes fueron el tipo fuente de nitrógeno y  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  y  $Fe^{2+}$  a diferentes concentraciones.

Finalmente, en una tercera etapa se analizó la composición del BS por espectrometría infrarroja y masas.

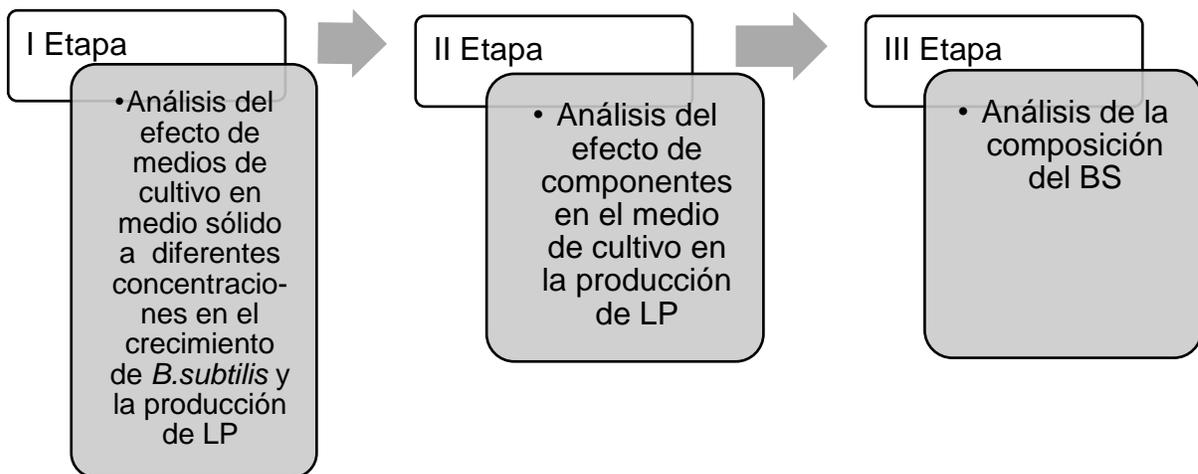


Figura 3. Estrategia experimental

## 8. Resultados y discusión

Las especies de *Bacillus* producen lipopéptidos (LP) de estructuras muy diversas, entre las cuales se encuentran la variedad de las moléculas de la familia de la surfactina. A continuación se van a mostrar los resultados de la producción de LP en cultivo sólido utilizando como modelo de producción la surfactina.

### 8.1 Efecto de medios de cultivo a diferentes concentraciones en medio sólido en el crecimiento de *B.subtilis* y la producción de los lipopéptidos

En una primera etapa se utilizaron dos medios de cultivo con diferente concentración de nutrientes para determinar el efecto en el crecimiento de *B.subtilis* medido indirectamente a través de la producción de CO<sub>2</sub> y para generar muestras biológicas para montar los métodos de análisis para los LP producidos por la cepa de estudio. Los medios utilizados fueron caldo nutritivo (BIOXON) específico para crecimiento y el medio reportado por Yeh *et al.* (2006) para producción de surfactina (Tabla 12 y 13).

Los estudios de Abdel-Mawgoud *et al.* (2008), Yeh *et al.* (2006) y Kim *et al.* (1997) mostraron que la producción de LP está asociada con el crecimiento celular. Es por ello que se analizó indirectamente el crecimiento de *B.subtilis* por medio de la producción de CO<sub>2</sub> en medios de cultivos sólidos con diferentes concentraciones de nutrientes.

En la Figura 4 se presenta la tasa de producción de CO<sub>2</sub> utilizando diferentes concentraciones de caldo nutritivo. La tasa máxima fue de  $2.43 \pm 0.08 \frac{mg\ CO_2}{gmsi\ h}$  la cual se alcanzó con el medio más concentrado a las 11 h; sin embargo, tardó más tiempo

en lograrlo en comparación con los demás medios. La mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> fue 8,6 y 2 veces mayor que el alcanzado en los medios 0.5x, x y 2x respectivamente.

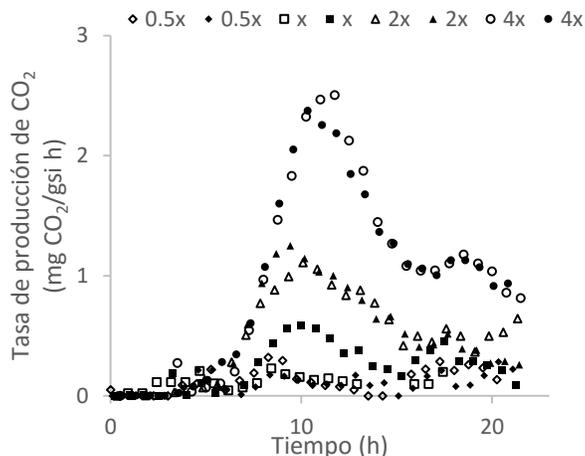


Figura 4. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos)

En la Figura 5 se presenta la producción de CO<sub>2</sub> con las concentraciones de medio que se utilizaron. La producción de CO<sub>2</sub> fue mayor en el medio con más alta concentración de nutrientes, el valor más alto fue de  $20.66 \pm 0.56 \frac{mg\ CO_2}{gmsi\ h}$ . La producción máxima de CO<sub>2</sub> en el medio 4x fue 9, 6 y 2 veces mayor que el alcanzado en los medios 0.5x, 1x y 2x respectivamente.

En la Figura 4 y 5 se observan la reproducibilidad en las réplicas y que a pesar de las concentraciones tan altas de medio que se usaron no se inhibió el proceso de producción de CO<sub>2</sub>. La respiración indicó que se limitó el crecimiento (y el metabolismo) alrededor de las 11 h y en las concentraciones más bajas un poco antes. Esto se manifiesta como un cambio de pendiente (Figura 4) que implica una variación del estado fisiológico.

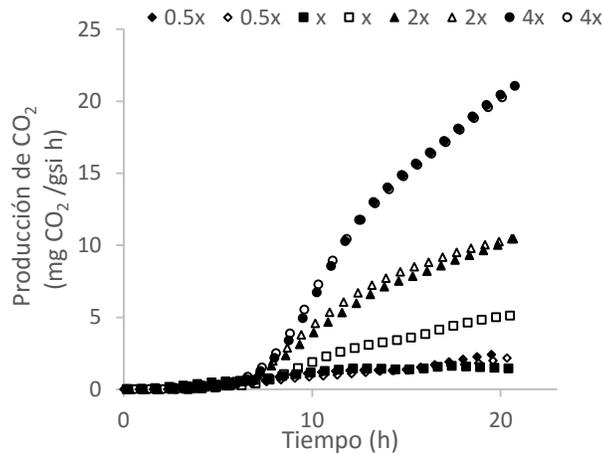


Figura 5. Producción de  $\text{CO}_2$  durante la FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos)

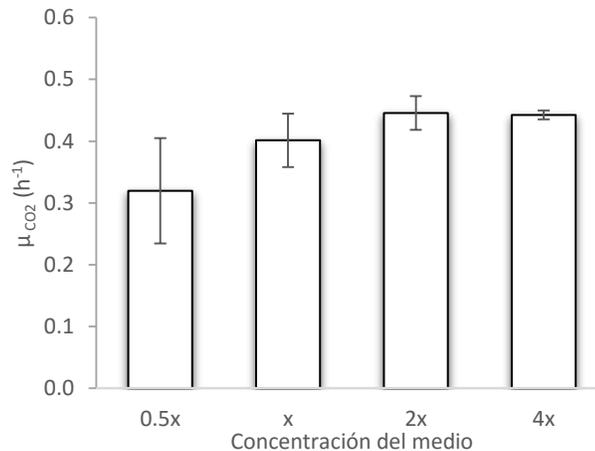


Figura 6.  $\mu_{\text{CO}_2}$  con diferentes concentraciones de caldo nutritivo durante 21 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

En la Figura 6 se presentan la  $\mu_{\text{CO}_2}$  correspondiente a las diferentes concentraciones de caldo nutritivo obtenidas con el modelo logístico. La  $\mu_{\text{CO}_2}$  se encontró entre  $0.32$  y  $0.45 \text{ h}^{-1}$ . Se observa que al incrementar la concentración del medio de  $0.5x$  a  $2x$  la  $\mu_{\text{CO}_2}$  aumenta. A partir de la concentración  $2x$  en adelante la  $\mu_{\text{CO}_2}$  es constante. La  $\mu_{\text{CO}_2}$  aumentó por la mayor concentración de nutrientes (proteínas, vitaminas, compuestos nitrogenados y carbohidratos). La estimación de la fase lag en este caso no se logró

determinar debido a que la producción de CO<sub>2</sub> inició antes de conectar al sistema de captura de datos.

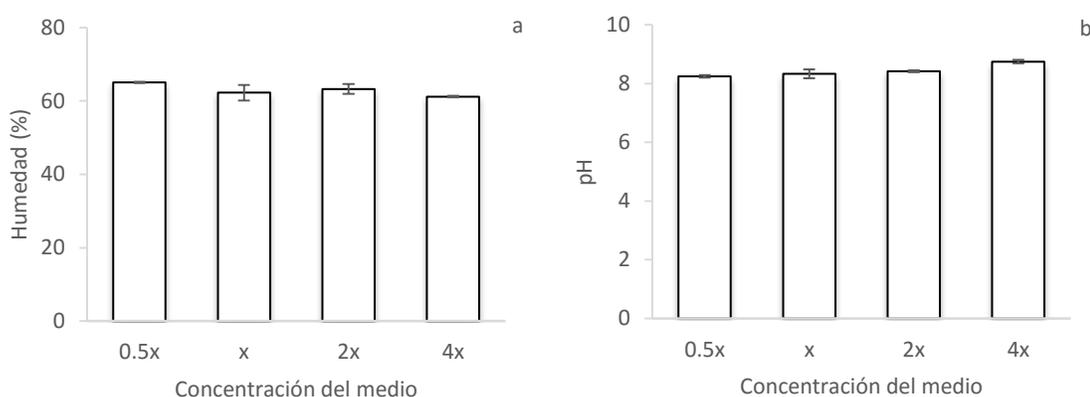


Figura 7. FMS con diferentes concentraciones de caldo nutritivo a las 21 h. a) Concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

También se midió la humedad y pH al finalizar la FMS (Figura 7). La humedad final fue muy similar a la inicial (entre 60-65%) y el pH final fue de 8.2 a 8.7. En todos los casos hubo un ligero aumento en el pH.

Posteriormente, se evaluó un medio reportado en la literatura para producción de surfactina a diferentes concentraciones; para su elección se realizó una revisión bibliográfica sobre medios reportados para producción de surfactina; ya sea en medio líquido o sólido. Se fueron descartando los medios que habían generado las más bajas concentraciones de surfactina ( $<2.5 \frac{mg}{mL}$ ) y los que contenían componentes complejos ya que se deseaba que fuera un medio sencillo para facilitar el proceso de extracción y purificación de los LP. De esta forma se eligió el medio reportado por Yeh *et al.* (2006), a partir del cual se obtuvo una concentración de surfactina de  $6.45 \frac{mg}{mL}$ ; siendo este el valor de producción más alto reportado hasta la fecha en cultivo líquido.

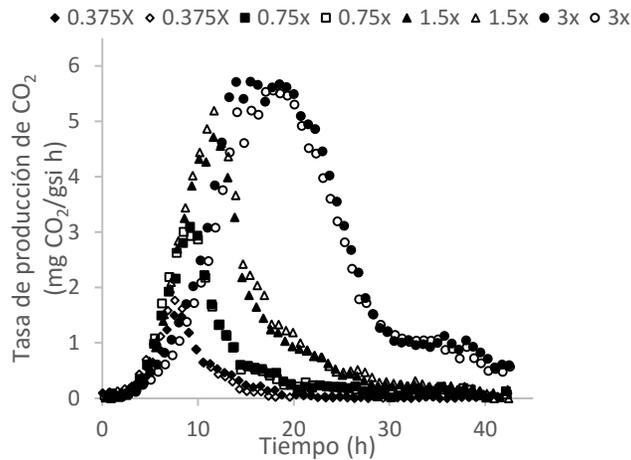


Figura 8. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh *et al.* (2006) durante 42 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos)

En la Tabla 13 (sección de materiales y métodos) se presentan las diferentes concentraciones del medio Yeh *et al.* (2006) que se evaluaron: 0.375x, 0.75x, 1.5x y 3x. En la Figura 8 y 9 se observa el efecto de la concentración del medio sobre la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS. El cultivo correspondiente al medio 3x tardó más tiempo en alcanzar la tasa máxima de producción en comparación con los demás medios, además no presentó una disminución rápida de la tasa de producción una vez alcanzado el valor máximo como los demás medios, sino que se mantuvo constante a partir de las 14 hasta las 20 h de la FMS. El valor máximo de la tasa de producción fue por el medio más concentrado de  $5.63 \pm 0.11 \frac{mg CO_2}{gmsi h}$ , este fue 3.5, 2 y 1.2 veces mayor que el alcanzado en los medios 0.375x, 0.75x y 1.5x respectivamente. La máxima producción de CO<sub>2</sub> fue de  $95.65 \pm 6.60 \frac{mg CO_2}{gmsi h}$ , este fue 8.8, 4 y 2 veces mayor que el alcanzado en los medios 0.375x, 0.75x y 1.5x respectivamente (Figura 9).

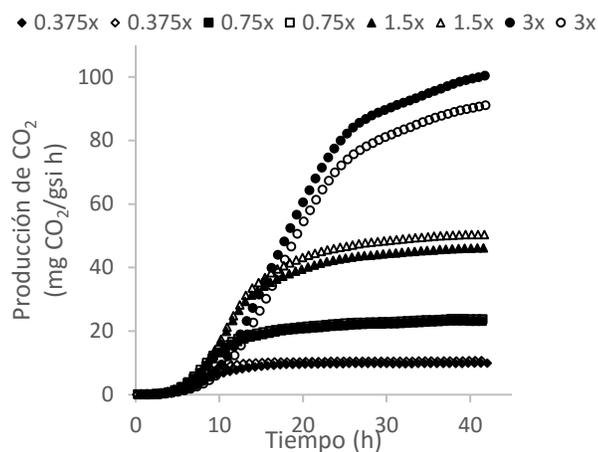


Figura 9. Producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2006) durante 42 h. Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos)

En la Figura 8 y 9 se observa reproducibilidad en las réplicas y que a pesar de las concentraciones altas de medio que se usaron en general no se inhibió el proceso de producción de CO<sub>2</sub>. La respiración indicó que se limitó el crecimiento alrededor de las 20, 11, 9 y 7 h para el medio 3x, 1.5x, 0.75x y 0.375x respectivamente. Esto se manifiesta como un cambio de pendiente (Figura 8) que implica una variación del estado fisiológico.

En la Figura 10.a se presentan la  $\mu_{CO_2}$  correspondiente a las diferentes concentraciones del medio Yeh et al. (2006). Los valores de  $\mu_{CO_2}$  se encontraron entre 0.28 y 0.61 h<sup>-1</sup>. El valor máximo de  $\mu_{CO_2}$  correspondió al medio 0.375x que fue 1.2, 1.5 y 2.3 veces mayor que en el medio 0.75x, 1.5x y 3x respectivamente. Se observa la disminución de la  $\mu_{CO_2}$  a medida que aumenta la concentración del medio; posiblemente, debido a la complejidad nutricional ya que es un medio mineral.

En la Figura 10.b se muestran los valores del tiempo lag. A pesar de las diferentes concentraciones de medio, dichos valores no presentaron diferencias grandes. La

máxima diferencia que se presentó es de alrededor de 0.46 h (27.6 minutos) al comparar el medio de menor y mayor concentración.

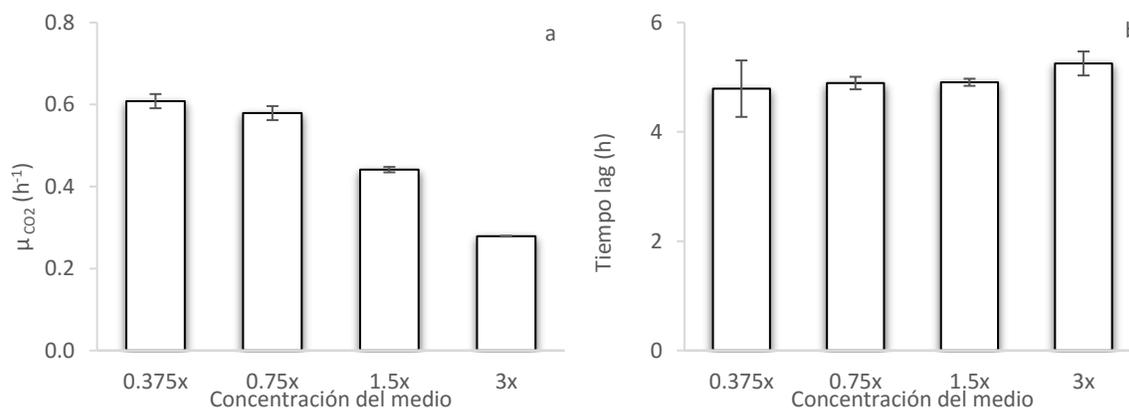


Figura 10. FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh *et al.* (2016) durante 42 h. a)  $\mu_{CO_2}$  y b) Tiempo de la fase lag. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

También se midió la glucosa, humedad y pH al finalizar la FMS. En la Figura 11 se muestran los datos obtenidos. La glucosa se consumió casi en su totalidad. La humedad final se encontró entre 60 y 65% y el pH final fue de 7.7 a 7.9.

Al comparar todos los resultados obtenidos con los medios más concentrados de caldo nutritivo y de medio Yeh *et al.* (2016), se encontró que en el medio Yeh *et al.* (2016), la producción máxima de  $CO_2$  y la tasa máxima de producción de  $CO_2$  fue 4.6 y 2.3 veces mayor respectivamente que en el caldo nutritivo.

Comparando los valores de las  $\mu_{CO_2}$ ; el medio Yeh *et al.* (2016) presentó el valor de  $\mu_{CO_2}$  más alto de  $0.61 h^{-1}$  el cual es 1.4 veces mayor que el valor máximo obtenido en el caldo nutritivo. Considerando que Saucedo *et al.* (1994) reportaron que si se determinaba la  $\mu_{CO_2}$  durante la fase exponencial de crecimiento este era equivalente a la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ). Se encontró que el medio Yeh *et al.* (2006) fue

el que más favoreció este bioproceso de crecimiento y que a pesar de las concentraciones de sus nutrientes la fase lag no cambió.

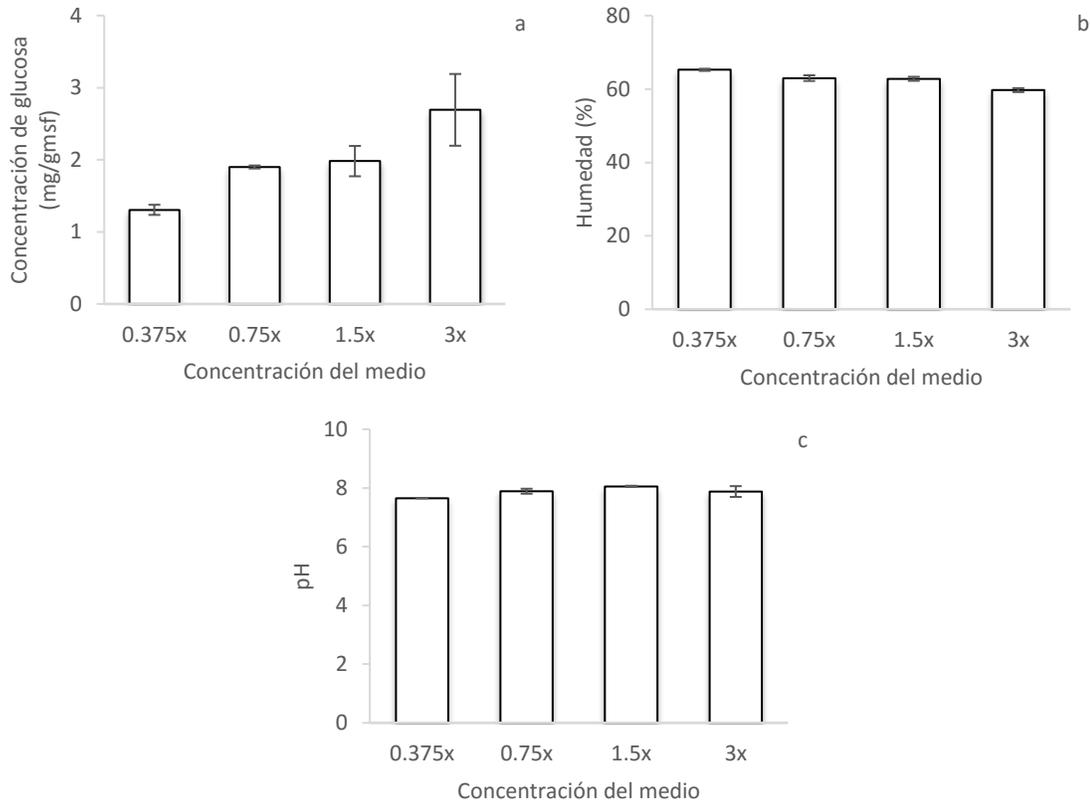


Figura 11. FMS con diferentes concentraciones de medio Yeh et al. (2006) a las 42 h. a) concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

Para estimar la producción de los LP, a partir de las muestras sólidas húmedas obtenidas en las diferentes fermentaciones se evaluaron y compararon dos métodos, el de actividad surfactante y el de actividad emulsificante descrita en la sección 6.2, con el fin de verificar si sus resultados se correlacionan y seleccionar el método más práctico y reproducible.

En la Figura 12.a se presentan los resultados de actividad surfactante cuantificada con base a las áreas de desplazamiento de petróleo crudo en la cual, la magnitud del área

es proporcional a la concentración de BS (Morikawa *et al.*, 2000). En el anexo 2 se muestra una curva estándar de surfactina vs área, donde se demuestra que bajo los rangos de concentraciones evaluadas permanece la linealidad (0 a  $3.34 \frac{mg}{mL}$ ).

Para estimar la concentración de los LP se midió la actividad emulsificante expresada en unidad emulsificante (UE) ya que la funcionalidad, es decir, la capacidad emulsificante, espumante, detergente o dispersante del BS depende de su concentración en el medio en el que se encuentre (Ortega, 2013). En la Figura 2 se muestra la curva estándar para estimar la concentración de los LP en  $\frac{mg \text{ Eq SF}}{gmsf}$ . En la Figura 12.b se presenta la concentración final de LP en los diferentes medios evaluados (Tabla 12 y 13).

En la Figura 12.a y 12.b se observa que la estimación de los LP con ambos métodos (actividad surfactante y actividad emulsificante) presentó los valores mayores con el medio Yeh *et al.* (2006) bajo las concentraciones 1.5x y 3x. Los resultados de la concentración 1.5x presentaron un coeficiente de variación mayor a 50% por lo que no fue un valor confiable. Con el caldo nutritivo se observó que por el método de actividad emulsificante (Figura 12.b) no hay grandes diferencias en las diferentes concentraciones de este medio a excepción del 2x. En cuanto al área de desplazamiento (Figura 12.a) de igual forma no hay diferencias apreciables excepto por el 1x, el cual presenta un coeficiente de variación mayor al 100%. Por lo tanto, se decidió continuar los estudios posteriores con la concentración 3x del medio Yeh *et al.* (2006).

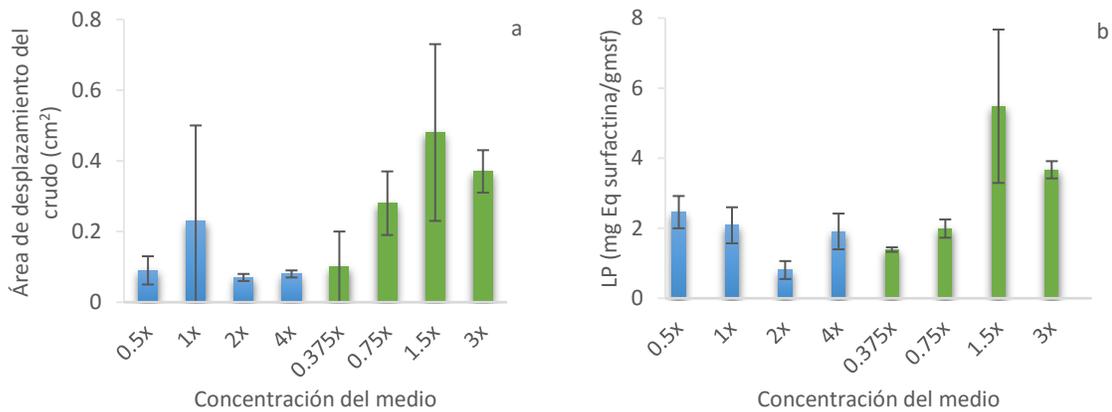


Figura 12. Métodos de análisis de los LP producidos en FMS bajo diferentes concentraciones de medios. a) Área de desplazamiento del crudo. b) Concentración de los LP. El color azul corresponde al caldo nutritivo, el verde al medio Yeh et al. (2006). Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

Antes de seleccionar la metodología para los siguientes análisis de los LP, se realizó un análisis de relación de los dos métodos utilizando todas las réplicas de las fermentaciones, el cual arrojó el 67% de correlación (Figura 13) con pendiente positiva, que refleja el incremento proporcional de ambos métodos.

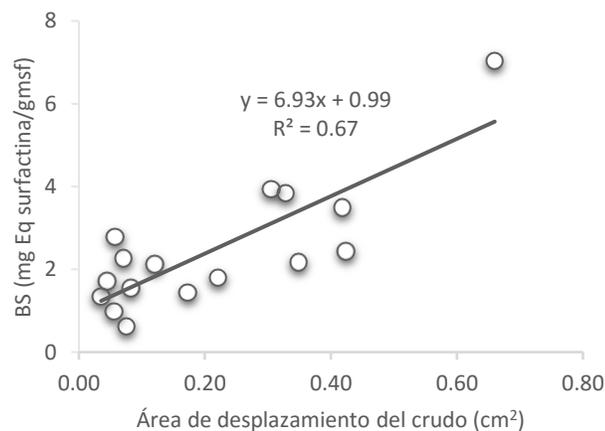


Figura 13. Correlación del método de actividad emulsificante vs actividad surfactante

Continuando con la selección del método de análisis, la actividad surfactante presentó coeficientes de variación más altos en comparación con la actividad emulsificante, justificándose quizás por el proceso de precipitación ácida al que se sometieron los

extractos crudos a evaluar, la falta de un blanco en el método y en ocasiones la forma variable en que cae la gota de la muestra. Por consiguiente, para determinar la producción de LP se seleccionó el método de análisis de actividad emulsificante.

## **8.2 Efecto de componentes en el medio de cultivo sólido en la producción de los lipopéptidos**

Con el fin de incrementar la producción de los LP se determinó el efecto de algunos componentes del medio de cultivo; para ello, se partió de la composición del medio Yeh *et al.* (2006) a concentración 3x (Tabla 13) y se diseñaron cuatro medios de cultivo teniendo en cuenta la importancia de la presencia del  $MnSO_4$  que Wei *et al.* (2002), Abushady *et al.* (2005) y Gudiña *et al.* (2015) publicaron y el cambio de fuente de nitrógeno de  $NH_4NO_3$  a  $NaNO_3$  que Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) sugirieron. Los medios evaluados se describen en la Tabla 14 (sección de métodos y materiales), en la cual se observa que los medios A y C presentan como fuente de nitrógeno  $NH_4NO_3$  y los B y D  $NaNO_3$ ; y que el  $MnSO_4$  solo está presente en los medios C y D.

Se estimaron los parámetros cinéticos de *B.subtilis* a partir de los datos de producción de  $CO_2$  obtenidos con los diferentes medios de cultivo. En la Figura 14 y 15 se presentan la tasa de producción de  $CO_2$  y producción de  $CO_2$  respectivamente de los diferentes medios. La tasa máxima de producción de  $CO_2$  y producción de  $CO_2$  se alcanzaron con el medio C seguido del medio A. El medio A fue el que alcanzó la tasa máxima en el menor tiempo seguido del medio C. Los medios B y D presentaron casi el mismo comportamiento. Se observó reproducibilidad en las réplicas.

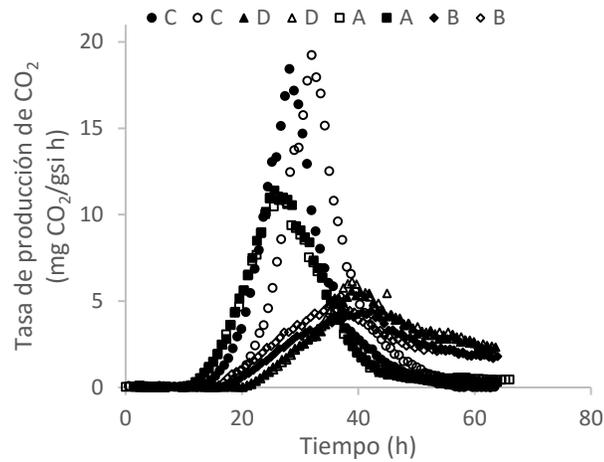


Figura 14. Tasa de producción de  $\text{CO}_2$  durante la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h. (A:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B:  $\text{NaNO}_3$ , C:  $\text{NH}_4\text{NO}_3 - \text{MnSO}_4$ , D:  $\text{NaNO}_3 - \text{MnSO}_4$ ). Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).

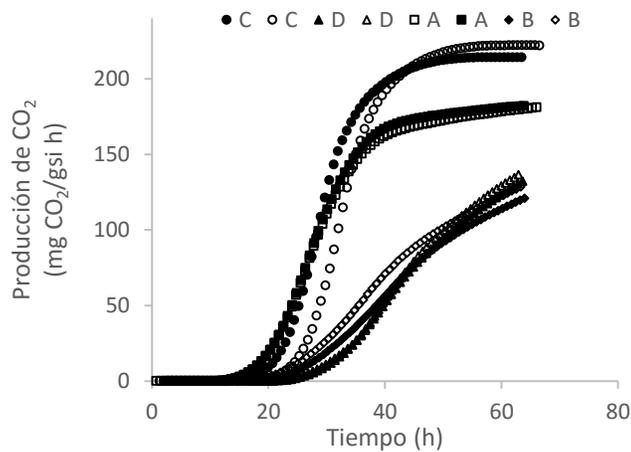


Figura 15. Producción de  $\text{CO}_2$  durante la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h. (A:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B:  $\text{NaNO}_3$ , C:  $\text{NH}_4\text{NO}_3 - \text{MnSO}_4$ , D:  $\text{NaNO}_3 - \text{MnSO}_4$ ). Para cada medio se hicieron duplicados (símbolos llenos y vacíos).

Con base en la Figura 14 y 15 se infirió que la fuente de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  favoreció la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$ , y con la presencia de  $\text{MnSO}_4$  este incremento fue mayor. En cuanto a la fuente de  $\text{NaNO}_3$  no se apreció una diferencia respecto a la presencia o ausencia del  $\text{MnSO}_4$ . La respiración indicó que se limitó el crecimiento alrededor de las 30 y 26 h para el medio C y A respectivamente,

y a las 39 h para el medio B y D. Esto se manifiesta como un cambio de pendiente (Figura 14) que implica una variación del estado fisiológico.

En la Figura 16.a se muestran los valores de  $\mu_{CO_2}$  que se obtuvieron con los 4 medios. Se observa que los valores más altos de  $\mu_{CO_2}$  se presentaron con los medios que contienen  $NH_4NO_3$ . La presencia del  $MnSO_4$  disminuyó el valor de  $\mu_{CO_2}$  1.1 y 1.25 veces en el medio con  $NH_4NO_3$  y  $NaNO_3$  respectivamente.

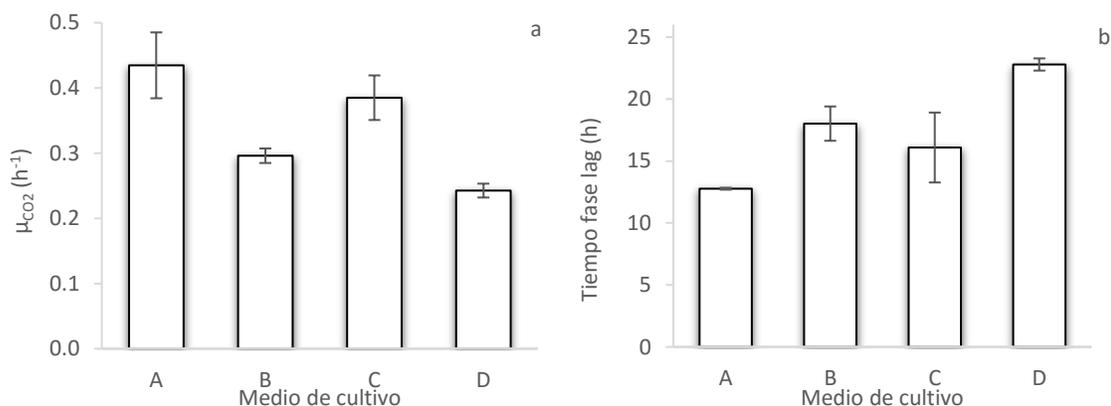


Figura 16. Parámetros de la FMS con diferentes medios de cultivo durante 66 h (A:  $NH_4NO_3$ , B:  $NaNO_3$ , C:  $NH_4NO_3 - MnSO_4$ , D:  $NaNO_3 - MnSO_4$ ). a).  $\mu_{CO_2}$ . b). Tiempo de la fase lag. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

En la Figura 16.b se muestran los valores estimados del tiempo de fase lag. El medio que menor y mayor tiempo requirió fue el medio A y D respectivamente. Es decir que el  $NH_4NO_3$  fue de más rápida asimilación para *B. subtilis* que el  $NaNO_3$ . La presencia del  $MnSO_4$  aumentó el tiempo lag 1.26 veces independientemente de la fuente de nitrógeno que estuviera presente en el medio de cultivo. Por lo tanto, el  $NH_4NO_3$  y el  $MnSO_4$  tienen un efecto positivo en el crecimiento celular y generan un mayor

consumo de glucosa (98.6%) para los medios A y C (glucosa inicial=  $282 \frac{mg}{gmsf}$ ). Los medios con B y D presentan un consumo de glucosa del 75% (Figura 17.a).

También se midió la humedad y el pH al finalizar la FMS. En la Figura 17 se muestran los datos obtenidos. La humedad se encontró entre 55 y 57% y el pH aumentó de 7 a valores entre 7.2 a 8.7.

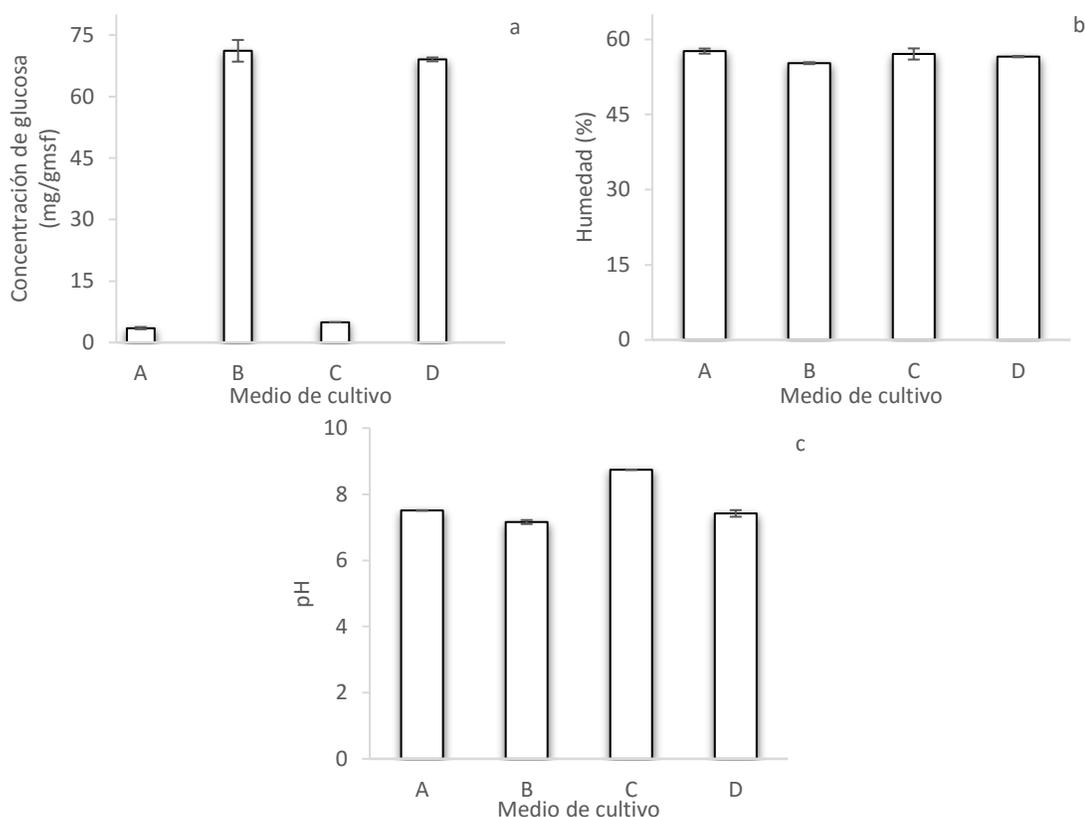


Figura 17 FMS bajo diferentes medios de cultivo a las 66 h (A:  $NH_4NO_3$ , B:  $NaNO_3$ , C:  $NH_4NO_3 - MnSO_4$ , D:  $NaNO_3 - MnSO_4$ ). a) concentración de glucosa residual. b) Humedad y c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

En la Figura 2 se muestra la curva estándar para estimar la concentración de los LP en  $\frac{mg Eq SF}{gmsf}$ . En la Figura 18 se observa la concentración de los LP en los 4 medios de cultivo al final de la FMS. Se realizó un análisis estadístico y se encontró que la

presencia de  $MnSO_4$  y el tipo de fuente de nitrógeno fueron significativos con un nivel de significancia de 0.05. Se observa que el medio C fue el que mayor producción de los LP presentó, siendo 2.2, 3.2 y 2 veces mayor que el medio A, B y D respectivamente. Es decir, la adición de  $MnSO_4$  al medio de cultivo favoreció significativamente la producción de los LP. Con relación al tipo de fuente de nitrógeno, se obtuvo la concentración más alta de los LP con  $NH_4NO_3$ .

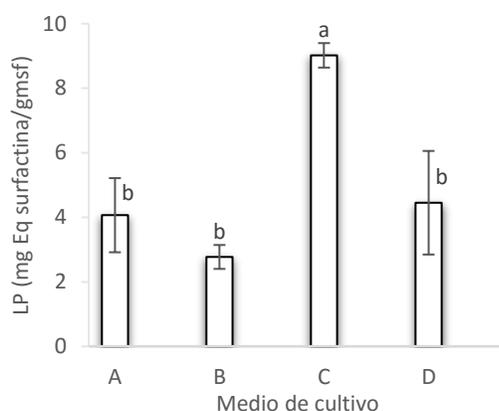


Figura 18. Concentración de los LP bajo diferentes medios de cultivo a las 66 h (A:  $NH_4NO_3$ , B:  $NaNO_3$ , C:  $NH_4NO_3 - MnSO_4$ , D:  $NaNO_3 - MnSO_4$ ). Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ , prueba Tukey)

Con base en los anteriores resultados, se realizó una cinética de aproximadamente 74 h utilizando los medios C y D, con el fin de observar el efecto del tipo de fuente de nitrógeno sobre la producción de los LP en el tiempo.

En la Figura 19 se observa que la mayor concentración de los LP ( $3.5 \pm 0.9 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$ ) se presentó alrededor de las 62 h con el medio con  $NH_4NO_3$  y con el medio con  $NaNO_3$  la mayor concentración de los LP ( $2.5 \pm 0.7 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$ ) se obtuvo a las 74 h. La producción de los LP con ambos medios no presentó diferencia las primeras 26 h; posteriormente, ésta fue mayor con el medio con  $NH_4NO_3$ . Al comparar la relación de cuantas veces

fue mayor la producción del medio C con respecto al medio D a las 66 h (Figura 18 y 19), se encontró que fue  $1.8 \pm 0.2$  veces mayor. La cinética de producción de los LP con el medio C (Figura 19) alrededor de las 66 h fue menor al valor de  $9.0 \pm 0.4 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$  que se mostró en la Figura 18. Esto se explica a que hubo problemas experimentales posiblemente con la preparación del inóculo y porque las fermentaciones se llevaron a cabo con tipos de biorreactores diferentes es decir que presentaron flujos de aire distintos lo cual afecta la producción de LP (Yeh *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015).

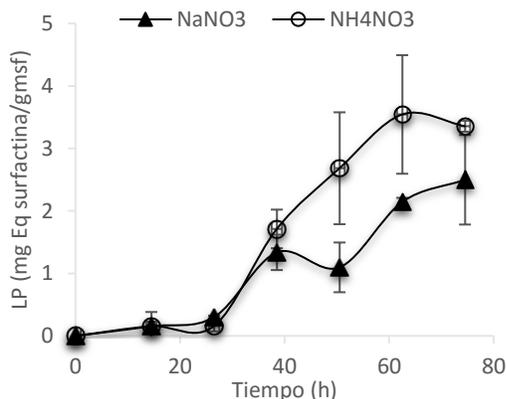


Figura 19. Concentración de los LP en medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno durante 74.5 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

El inicio de la síntesis de surfactina, alrededor de las 30 h (Figura 19) coincide con el cambio de metabolismo observado en la Figura 14 para el medio C, manifestado como un cambio de pendiente en la Figura 15. Es un comportamiento de un metabolito secundario típico, indicando que se limitó el crecimiento por falta de un nutriente y se inició el metabolismo secundario.

En la Figura 20.a, se muestra la concentración de glucosa residual en función del tiempo para los medios con  $NaNO_3$  y  $NH_4NO_3$ . Se observa que inicialmente el consumo de la fuente de carbono es similar hasta aproximadamente las 26 h. Posteriormente,

el medio con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  presentó un consumo acelerado y alrededor de las 38 h ya está agotada la glucosa, a diferencia del  $\text{NaNO}_3$  que presentó un consumo lento y solo hasta el final de la FMS se agota. Con base en estos resultados se puede inferir que la presencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  favorece el crecimiento celular y la producción de los LP (Yeh *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 1997). Por consiguiente en los estudios posteriores se usará esta fuente de nitrógeno.

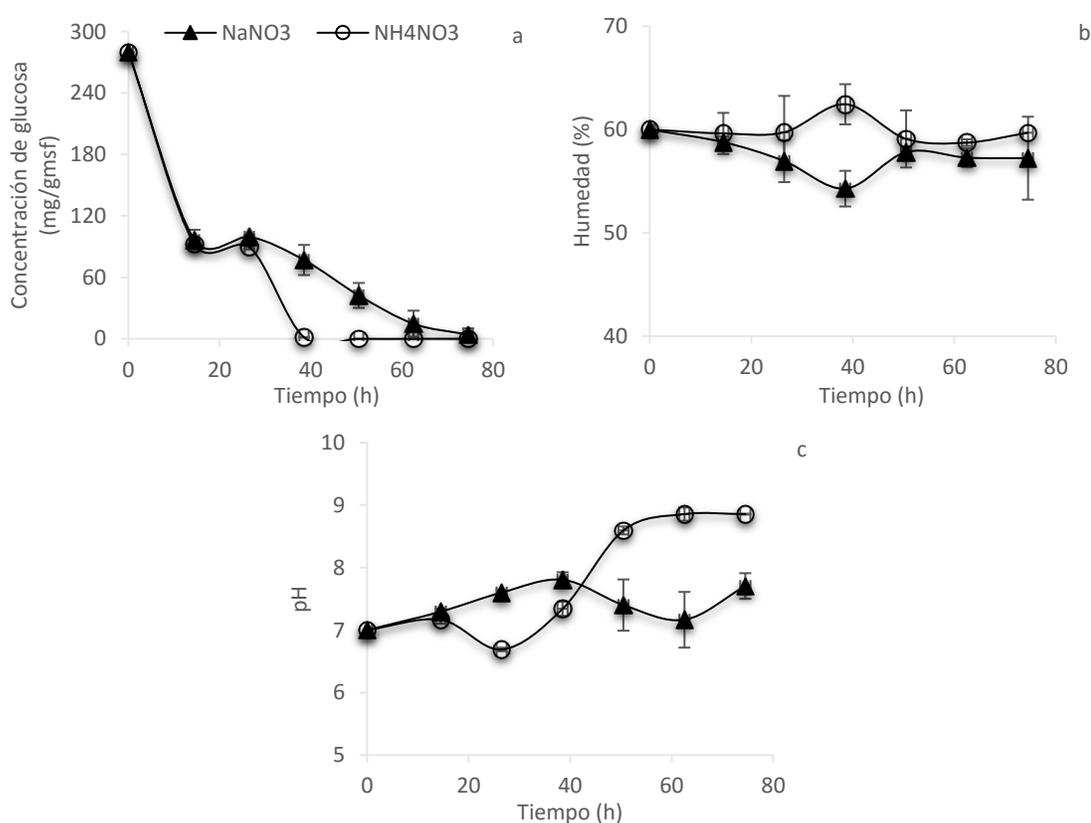


Figura 20. Medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno. a) Concentración de glucosa residual en el tiempo. b) Humedad en el tiempo. c). pH en el tiempo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

En la Figura 20.b se presenta el contenido de humedad en función del tiempo. En el medio con  $\text{NaNO}_3$  se mantuvo la humedad entre 54.3 y 60% y en el medio con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  entre 58.7 y 62.4%.

En la Figura 20.c, se observa que el pH asociado al  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  después de las 14 h disminuyó de 7.2 a 6.7 y luego fue incrementándose hasta 8.8 donde se mantuvo constante después de las 50 h. El pH correspondiente a  $\text{NaNO}_3$  se mantuvo entre 7 y 8. Las variaciones del pH durante la fermentación se deben a la actividad metabólica del microorganismo. Las principales causas del descenso del pH son la secreción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, acético, láctico, etc.) y el consumo de sales de amonio. Por otra parte, la alcalinización del medio de cultivo, generalmente está asociado a la liberación de amoníaco como producto de la actividad proteolítica y la descomposición de los aminoácidos (Rodríguez, 2016).

Consecuentemente como en la cinética anterior se encontró que el medio C en comparación con el D alcanzó mayor actividad emulsificante equivalente a surfactina; se realizó una optimización nutricional a partir del medio de cultivo C. Para ello, se propuso variar la concentración de los nutrientes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , ya que estudios han demostrado que son importantes cofactores en sistemas de múltiples enzimas que están involucradas en la ruta biosintética de la surfactina (Chen *et al.*, 2015). El  $\text{K}^+$  estimula su secreción y el  $\text{Mg}^{2+}$  es un cofactor que activa la enzima Sfp de *B. subtilis* para su producción. La enzima Sfp convierte la apoforma de la surfactina sintetasa inactiva a la holoforma activa, la cual interviene en la producción de la surfactina (Seydlová *et al.*, 2008).

En la Tabla 15 y 16 se muestran las concentraciones de los nutrientes que se evaluaron y la matriz del diseño factorial completo para la FMS respectivamente. En la Figura 2 se muestra la curva estándar para estimar la concentración de los LP en

$\frac{mg Eq SF}{gmsf}$ . En la Figura 21 se presenta la concentración de LP obtenidos en los 16

medios. En el medio 14 se obtuvo la mayor producción de los LP ( $6.7 \pm 2.0 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$ ).

Se realizó un análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas en las 16 combinaciones de medio; encontrando, (Figura 21) que el grupo de los valores más altos estaban conformados por los medios 13, 2, 16, 12, 8 y 14. Sin embargo, el resultado del medio 14 no se relacionó con otros subconjuntos como si sucede con los demás medios.

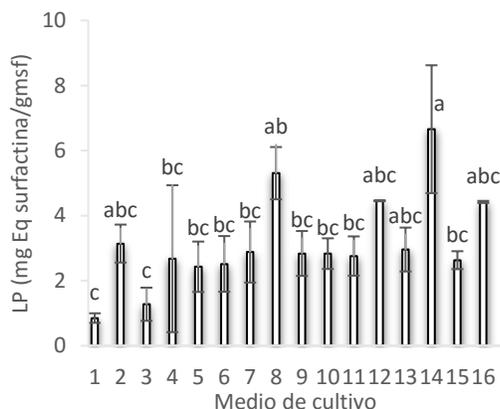


Figura 21. Concentración de los LP bajo diferentes concentraciones de nutrientes del medio de cultivo a las 48 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ , prueba Tukey)

También se realizó un análisis estadístico para ver si efectivamente la interacción de los cuatro nutrientes era significativos (Tabla 17). Se encontró que si eran significativos con  $\alpha = 0.05$ , como también la interacción triple Mg \* K \* Fe y simple de Mg, K y Mn. Aunque la evaluación de los 4 nutrientes tuvo un resultado positivo; falta evaluar el efecto de la adición de precursores de la síntesis de los LP; así como, optimizar las condiciones ambientales de la fermentación.

Tabla 17. Análisis estadístico del efecto de los nutrientes

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Mg <sup>s</sup>	8.967	1	8.967	10.224	0.006
K <sup>s</sup>	10.049	1	10.049	11.458	0.004
Fe	0.595	1	0.595	0.678	0.422
Mn <sup>s</sup>	22.372	1	22.372	25.507	0.000
Mg * K	0.246	1	0.246	0.280	0.604
Mg * Fe	2.226	1	2.226	2.538	0.131
Mg * Mn	0.121	1	0.121	0.138	0.715
K * Fe	0.086	1	0.086	0.097	0.759
K * Mn	0.857	1	0.857	0.978	0.338
Fe * Mn	0.192	1	0.192	0.219	0.646
Mg * K * Fe <sup>s</sup>	6.830	1	6.830	7.787	0.013
Mg * K * Mn	3.096	1	3.096	3.530	0.079
Mg * Fe * Mn	0.341	1	0.341	0.389	0.542
K * Fe * Mn	0.019	1	0.019	0.022	0.885
Mg * K * Fe * Mn <sup>s</sup>	5.847	1	5.847	6.666	0.020

(Superíndice <sup>s</sup> significa interacción significativa)

En la Figura 23.a, se observa que a las 48 h la glucosa fue prácticamente consumida (glucosa inicial=  $282 \frac{mg}{gmsf}$ ); excepto para los medios 1, 3 y 4 los cuales presentaron un consumo de alrededor del 77%. En la Figura 23.c, se encuentra que el pH tendió a subir hasta 8, excepto para los medios 1,3 y 4 que se encontraron por debajo de 7. Los medios 1,3 y 4 presentaron las más bajas producciones de los LP (Figura 23.b). En la Figura 23.b, se ve que la humedad se encuentra entre el 50 a 60%, excepto para la condición 1 que presentó 42%.

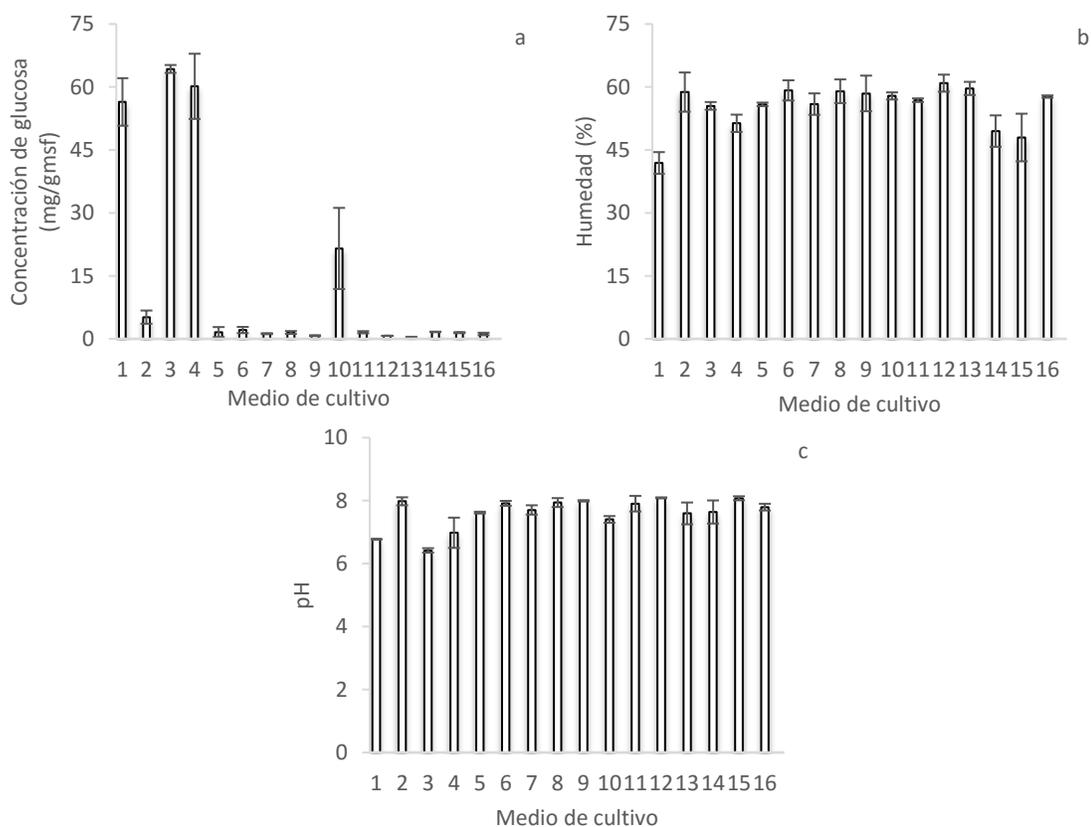


Figura 22. FMS bajo diferentes concentraciones de nutrientes del medio de cultivo a las 48 h. a) Concentración de glucosa residual. b). Humedad. c) pH. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado

Luego, se realizó una cinética de producción de los LP con el medio 14 durante 96 h. En la Figura 2 se muestra la curva estándar para estimar la concentración de los LP en  $\frac{mg Eq SF}{gmsf}$ . En la Figura 24 se presenta el comportamiento de los LP en el tiempo. Se observa que la mayor concentración se obtuvo a las 48 h con un valor de  $8.9 \pm 0.8 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$ . Es un valor similar a la producción de LP que se encontró con la FMS del medio C a las 66 h (Figura 18). Sin embargo, la FMS del medio 14 y el medio C se llevaron a cabo con tipos de biorreactores diferentes (flujos de aire diferente).

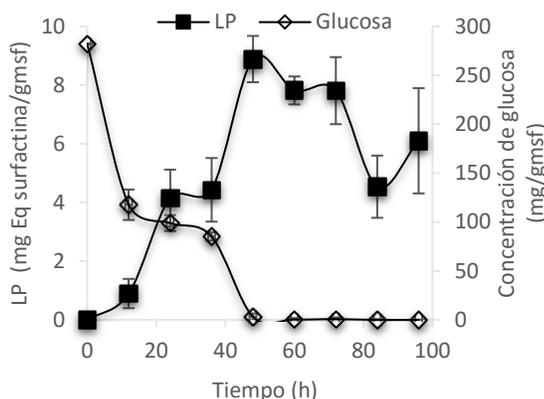


Figura 23. Concentración de los LP y la glucosa residual bajo el medio 14 de la optimización durante 96 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado

Al comparar el valor obtenido con el medio 14 en la optimización y en la cinética de los LP a las 48 h, cuyos valores son 6.7 y 8.9  $\frac{mg Eq SF}{gmsf}$  respectivamente, se encontró un valor promedio de  $7.8 \pm 1.6 \frac{mg Eq SF}{gmsf}$ , cuyo coeficiente de variación fue de 20%, es decir que fue un proceso reproducible.

Con base en estos resultados, se verificó que el medio 14 a las 48 h presenta la producción máxima de los LP. Al comparar la producción del medio 14 con el medio C (Tabla 14, Figura 18), se observa que la optimización de nutrientes en el medio no logró superar la concentración de producción de los LP obtenidos con el medio C. Sin embargo, si disminuyó el tiempo de producción. Con la optimización se redujo 18 h en alcanzar el valor máximo de producción. La productividad del medio 14 y el medio C fueron 0.2 y 0.1  $\frac{mg Eq SF}{gmsf h}$  respectivamente. Es de aclarar, que esta optimización se realizó con un escaso flujo de alimentación de aire, factor importante en la producción de LP (Yeh *et al.*, 2006).

En la Figura 24 se muestra la glucosa residual en el tiempo, en la cual se observa que después de las 48 h fue totalmente consumida, tiempo en el cual la producción del LP fue máximo. En la Figura 25 se presenta que la humedad se mantuvo entre 51 y 60% y el pH inicialmente tendió a aumentar, luego a las 24 h disminuyó y posteriormente aumentó hasta las 72 h donde se mantuvo constante a pH 8.7.

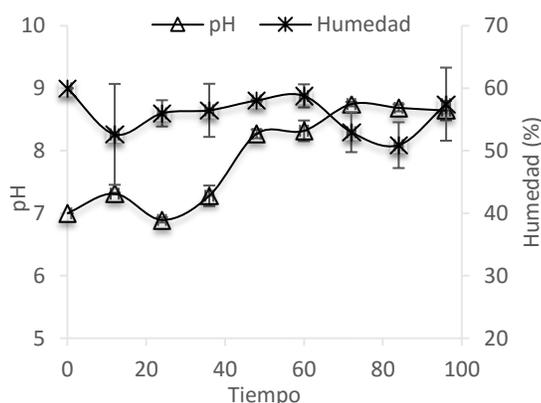


Figura 24. FMS con el medio 14 de la optimización durante 96 h. Humedad y pH en el tiempo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado

### 8.3 Análisis de la composición del biosurfactante

Para el proceso de identificación del BS, primero se evaluó la presencia de actividad tensoactiva en el extracto crudo obtenido de muestras de la FMS; para ello, se usaron los métodos de la actividad surfactante y emulsificante mencionados en la sección 6.2. Luego, se decidió aumentar la producción del BS a través de cambios nutricionales en el medio de cultivo; lo que nos permitió contar con las muestras con mayor actividad, finalmente, se realizaron análisis para determinar la composición del BS. Para ello, se realizó un análisis infrarrojo, que demostró la presencia de un compuesto lipopeptídico y; posteriormente, con espectrometría de masas se encontró específicamente que

clase de lipopéptido se estaba produciendo. A continuación se discute con detalle los resultados del análisis infrarrojo y de masas.

### 8.3.1 Análisis infrarrojo

Con el fin de verificar que la composición del BS que se produjo correspondía a un lipopéptido, se realizó un análisis por FTIR (espectrofotometría infrarrojo por transformada de Fourier) de las muestras obtenidas con el medio C parcialmente purificadas. En la Figura 26 se muestra el espectro IR que se obtuvo y se comparó con el espectro de la surfactina (Anexo 3.a). La absorción de la banda con un máximo de  $3263\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento (stretching) N-H que puede ser atribuido a residuos de péptidos. Otra banda con máximo de  $2921\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al estiramiento C-H (CH<sub>3</sub>) y (CH<sub>2</sub>), que puede estar asociado con la porción lipopeptídica de la molécula. A  $1736\text{ cm}^{-1}$  la banda puede estar relacionada a la absorción de grupos C=O de lactonización. A  $1631\text{ cm}^{-1}$ , un punto de estiramiento CO-N al grupo amida. A  $1526\text{ cm}^{-1}$  el modo de deformación de la banda N-H combinado con el estiramiento C-N. Las bandas  $1447\text{ cm}^{-1}$  y  $1368\text{ cm}^{-1}$  indican cadenas alifáticas (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>) (Das *et al.*, 2007; de Faria *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2013b). La banda alrededor de los  $1000\text{ cm}^{-1}$  representa las vibraciones del SiO<sub>2</sub> componente abundante (75% masa) en la composición química de la agrolita (Kaufhold *et al.*, 2014), esto se debió a la parcial purificación de la muestra.

Este análisis reveló que el BS presenta los principales grupos característicos de una molécula lipopeptídica, indicando la presencia de una cadena alifática como de una fracción peptídica. El LP analizado no pertenece a la familia de la fengicina porque no

presenta una absorción de banda aproximadamente a los  $2060\text{ cm}^{-1}$  característica de un anillo fenólico de tirosina (Wei *et al.*, 2010). También, el LP no corresponde a la familia Iturina ya que presenta una banda de carbonil lactona (Romero *et al.*, 2007). El LP posiblemente pertenece a la familia de la surfactina. Para comprobar ello, se realizó una espectrometría de masas.

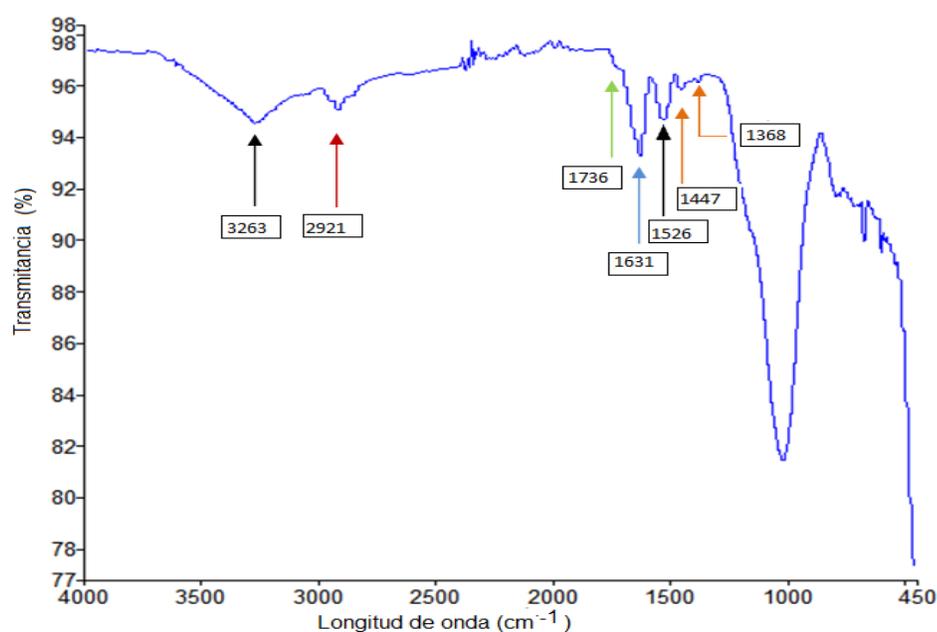


Figura 25. Espectro infrarrojo del BS extraído

### 8.3.2 Análisis de espectrometría de masas

En la Figura 27 se muestra el espectro de masas que se obtuvo de las muestras obtenidas con el medio C el cual se comparó con el espectro de la surfactina (Anexo 3.b). En el espectro de masas del LP se observó que el grupo de picos más altos está entre  $1020$  a  $1080\frac{m}{z}$  mostrando isoformas de surfactina protonadas. Las bajas intensidades observadas están relacionadas a la presencia de impurezas (Marín *et al.*, 2015). La varianza de  $\frac{m}{z}$  de  $\pm 0.8$  Da se consideró aceptable (Al-Ajlani *et al.*, 2007). El

espectro de masas mostró los picos abundantes en  $\frac{m}{z}$  de 1022, 1036, 1044, 1058, 1060 y 1074. Estos picos son propios de la surfactina (Li *et al.*, 2015; de Faria *et al.*, 2011). De Faria *et al.* (2011), asignaron que los picos  $[M+H]^+$  1022 y 1036  $\frac{m}{z}$  corresponden a las isoformas de surfactina de secuencia peptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu de C13 y C14 respectivamente en el ácido graso. Se observa que hay una diferencia de  $14 \frac{m}{z}$ , lo que indica un aumento de un átomo de carbono en el ácido graso. Esto se observa nuevamente en los picos  $[M+Na]^+$  1044, 1058 y  $[M+K]^+$  1060 y 1074 respectivamente, los cuales son isoformas de cadena lipídica de C13 y C14 y que sus  $\frac{m}{z}$  cambian dependiendo del ión aductor.

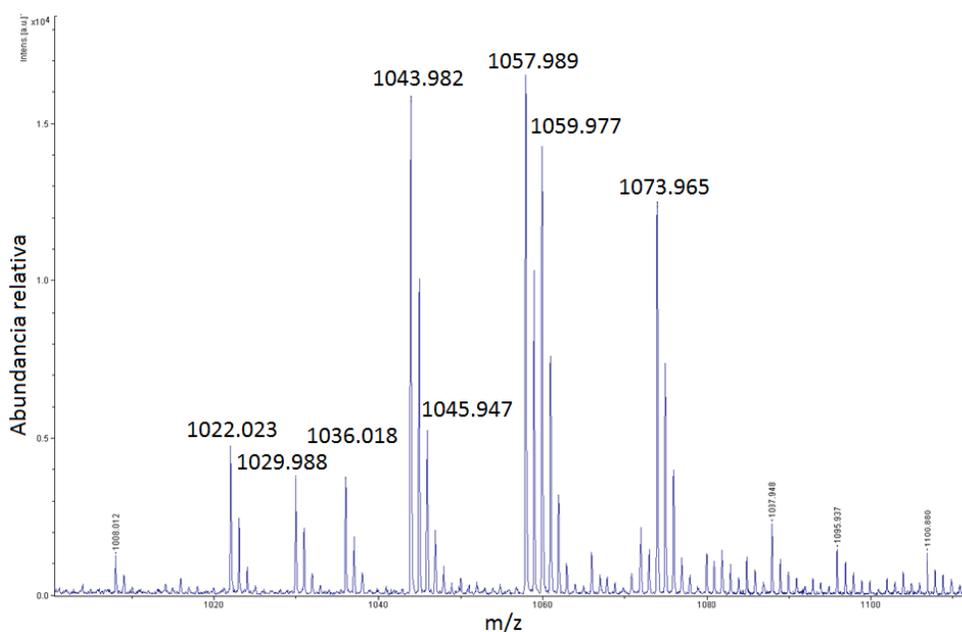


Figura 26. Espectro de masas del LP producido

En la Tabla 18 se describe otras posibles asignaciones de las estructuras de las isoformas que se generaron de surfactina según la relación  $\frac{m}{z}$ . Para determinar con exactitud que isoformas de surfactina se obtuvieron en este trabajo, se requiere de

otros métodos analíticos. Sin embargo, los resultados revelaron que el LP producido por *B. subtilis* fue principalmente surfactina de acuerdo a los datos de masa de LP reportados anteriormente.

Tabla 18. Asignamiento de las isoformas de surfactina

Masa ( $\frac{m}{z}$ )	Átomos de carbono del ácido graso	Secuencia del heptapéptido	Referencia
1022 [M+H] <sup>+</sup>	14	Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu	Chen <i>et al.</i> , 2008
1036 [M+H] <sup>+</sup>	15	Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu	Chen <i>et al.</i> , 2008
1030.6 [M+Na] <sup>+</sup>	14	Glu-Val-Leu-Leu-Asp-Leu-Val	Li <i>et al.</i> , 2015
1030.7 [M+Na] <sup>+</sup>	13	Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu	Yang <i>et al.</i> , 2015
1044.6 [M+Na] <sup>+</sup>	15	Glu-Val-Leu-Leu-Asp-Leu-Val	Yang <i>et al.</i> , 2015
1044.7 [M+Na] <sup>+</sup>	14	Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu	Yang <i>et al.</i> , 2015
1046 [M+Na] <sup>+</sup>	14	No reportada	Al-Ajlani <i>et al.</i> , 2007
1058 [M+Na] <sup>+</sup>	15	Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu	Yang <i>et al.</i> , 2015
1074 [M+K] <sup>+</sup>	15	No reportada	Savadogo <i>et al.</i> , 2011

#### 8.4 Comparación de este trabajo con reportes de la literatura

En este trabajo, todas las FMS se realizaron con agrolita como soporte inerte. Para extraer el LP se adicionó agua destilada; lo que diluyó y disminuyó la concentración del producto final. Es recomendable que para evitar diluir los LP y no perder las ventajas aprovechadas del cultivo sólido, se cambie de soporte para futuros experimentos, por ejemplo, la espuma de poliuretano que se puede prensar y de esa forma obtener el extracto.

Se comparó la producción y productividad de LP más altas obtenidas en este trabajo con valores reportados en la literatura para producción de LP por especies de *Bacillus*. En este trabajo se obtuvieron los valores de máxima concentración y productividad con el medio C de  $9 \frac{mg \text{ Eq SF}}{gmsf}$  y  $0.1 \frac{mg \text{ Eq SF}}{gmsf h}$ ; y con el medio 14 de  $8.9 \frac{mg \text{ Eq SF}}{gmsf}$  y  $0.2 \frac{mg \text{ Eq SF}}{gmsf h}$  respectivamente.

En la Tabla 11, en FMS se observa que para la producción de surfactina, este trabajo presentó valores superiores a los presentados por Ohno *et al.* (1995) y Slivinski *et al.* (2012) y representan el 66.7 % de los valores reportados por Zhu *et al.* (2013b).

Para comparar los resultados de este trabajo con reportes en FML, se consideró la humedad de las muestras para estimar la concentración comparable en medio líquido, y de esa forma se encontró que la máxima concentración y productividad con el medio C fue,  $6.76 \frac{\text{mg Eq SF}}{\text{mL}}$  y  $0.10 \frac{\text{mg Eq SF}}{\text{mL h}}$  y con el medio 14,  $6.71 \frac{\text{mg Eq SF}}{\text{mL}}$  y  $0.14 \frac{\text{mg Eq SF}}{\text{mL h}}$  respectivamente. Estos resultados son superiores a los de producción de surfactina en medio líquido (Tabla 10). Los valores obtenidos en este trabajo son superiores al reportado por Yeh *et al.* (2006) que hasta la fecha era el valor más alto para producción de surfactina.

Con base en la Tabla 11, se puede apreciar que no se está tan lejos de superar para concentración y productividad el valor más alto reportado en FMS para surfactina. Además, es probable que estudios de optimización de medio de cultivo y con un cambio de soporte inerte se aumente la producción de surfactina y se facilite su extracción del medio sólido.

## 9. Conclusiones

El uso de FMS para producción de lipopéptidos de surfactina condujo a una concentración ( $6.71 \frac{g}{L}$ ) y productividad ( $0.14 \frac{g}{Lh}$ ) mayor a los reportados en la literatura en cultivo líquido ( $6.45 \frac{g}{L}$  y  $0.1 \frac{g}{Lh}$ ). Sin embargo, es ligeramente menor ( $8.9 \frac{mg}{gms}$  y  $0.2 \frac{mg}{gms h}$ ) a la obtenida en FMS con residuos agroindustriales ( $15 \frac{mg}{gms}$  y  $0.3 \frac{mg}{gms h}$ ).

El análisis de los lipopéptidos por medio del método de la actividad emulsificante fue reproducible y práctico.

El uso de medios de cultivo para crecimiento (caldo nutritivo) y para producción de los LP (medio mineral) a concentraciones de glucosa de hasta  $282 \frac{mg}{gmsf}$  no tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento y permitió la producción de los LP; sin embargo, la mayor producción de los LP se obtuvo con el medio mineral.

La adición de la fuente de  $MnSO_4$  y  $NH_4NO_3$  en el medio mineral tuvo un efecto positivo importante sobre la producción de los LP por FMS. El aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Mn^{2+}$  incremento la productividad de los LP.

El espectro infrarrojo del BS reveló una molécula de carácter lipopeptídico y la espectrometría de masas mostró que eran isoformas de surfactina

## **10. Perspectivas**

Para continuar con este trabajo se recomienda optimizar las condiciones nutricionales y ambientales de la FMS para aumentar la producción y productividad de surfactina; así como, evaluar el efecto de la adición de precursores de la síntesis de los LP.

Se recomienda cambiar el soporte utilizado en la FMS para facilitar la recuperación y purificación de surfactina.

## 10. Referencias

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305–325. <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
- Abushady, A., Bashandy, A., Aziz, N., Ibrahim, H. (2005). Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. *International journal of agriculture & biology*, Vol. 7, No. 3, 337-344
- Al-Ajlani, M. M., Sheikh, M. A., Ahmad, Z., & Hasnain, S. (2007). Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, 6, 17. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-6-17>
- Balasubramaniam, A. K., Nagarajan, K. V., & Paramasamy, G. (2001). Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 36(12), 1241–1247. Retrieved from [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00166-2](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00166-2)
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427–444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175–185. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>

Buitrago, L., Caicedo, G. (2011). Protocolo para la producción de un organismo Biofertilizantes, tipo *Bacillus* c.a subtilis. Retrieved from <http://jbb-repositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/431/4/protocolo%20para%20la%20producci%C3%B3n%20de%20bacillus%20c.a%20subtilis.pdf>, consultado el 3 de febrero de 2015

Cagri-Mehmetoglu, A., Kusakli, S., & van de Venter, M. (2012). Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3643–3649. <http://doi.org/10.3168/jds.2012-5385>

Chen, H. (2013). Introduction. In *Modern Solid State Fermentation* (pp. 1–21). Springer Netherlands. Retrieved from [http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/chapter/10.1007/978-94-007-6043-1\\_1](http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/chapter/10.1007/978-94-007-6043-1_1), consultado el 2 de febrero de 2015

Chen, H.-L., & Juang, R.-S. (2008). Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 38(1), 39–46. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.06.003>

Chen, W.-C., Juang, R.-S., & Wei, Y.-H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>

CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1980). Que son los surfactantes. Los Surfactantes: Clases, Propiedades Y Uso Con Herbicidas (pp.7). Cali. Retrieved

from

[https://books.google.com.co/books?id=SsjC0WUKc\\_QC&pg=PA33&dq=Los+Surfactantes:+Clases,+Propiedades+Y+Uso+Con+Herbicidas&hl=es-419&sa=X&ei=GZwQVbHdl8ezggSElIDgBg&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=Los%20Surfactantes%3A%20Clases%2C%20Propiedades%20Y%20Uso%20Con%20Herbicidas&f=false](https://books.google.com.co/books?id=SsjC0WUKc_QC&pg=PA33&dq=Los+Surfactantes:+Clases,+Propiedades+Y+Uso+Con+Herbicidas&hl=es-419&sa=X&ei=GZwQVbHdl8ezggSElIDgBg&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=Los%20Surfactantes%3A%20Clases%2C%20Propiedades%20Y%20Uso%20Con%20Herbicidas&f=false), consultado el 10 de febrero de 2015

Cooper DG, MacDonald CR, Duff SFB, Kosaric N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol*, 42:408–12

Cortés, A., Troconis, I., & Jaramillo, M. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Retrieved from <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/viewFile/154/154>,

consultado el 12 de febrero de 2015

Cortés, S., & Barragán, B. (2013) Producción de biosurfactantes por microorganismos Halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, Vol. 6, No 1, p. 1-8. Recuperado de <http://servicios.encb.ipn.mx/revistaisa/Vol.%206%20No.%201/Cort%C3%A9s%20y%20Barrag%C3%A1n.pdf>

Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation

systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 42(8), 1191–1199.

<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.011>

Davis, D. A., Lynch, H. C., & Varley, J. (1999). The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3–5), 322–329. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00048-4](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00048-4)

de Faria, A. F., Teodoro-Martinez, D. S., de Oliveira Barbosa, G. N., Gontijo Vaz, B., Serrano Silva, Í., Garcia, J. S., Rogerio, M., Eberlin, M., Grossman, M., Alves, O., Regina Durrant, L. (2011). Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46(10), 1951–1957. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>

de Oliveira, M. R., Camilios-Neto, D., Baldo, C., Magri, A., & Celligoi, M. A. P. C. (2014). Biosynthesis And Production Of Sophorolipids. *International journal of scientific & technology research*, volume 3, issue 11. ISSN 2277-8616. Retrieved from <http://www.ijstr.org/final-print/nov2014/Biosynthesis-And-Production-Of-Sophorolipids.pdf>

de Sousa, T., & Bhosle, S. (2012). Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a

mangrove ecosystem. *Bioresource Technology*, 123, 256–262.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.056>

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

Favela, E., Noé, C., Augur, C., & Viniegra-González, G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, 36(6), 565–570. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00251-X](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00251-X)

Geys, R., Soetaert, W., & Van Bogaert, I. (2014). Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 30, p. 66–72.

Ghribi, D., & Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, e653654. <http://doi.org/10.4061/2011/653654>

Gill, K. A., Berrué, F., Arens, J. C., & Kerr, R. G. (2014). Isolation and structure elucidation of cystargamide, a lipopeptide from *Kitasatospora cystarginea*. *Journal of Natural Products*, 77(6), 1372–1376. <http://doi.org/10.1021/np500122s>

Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation*, 6, 59. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059>

Herbert, R. B. (1989). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Springer Science & Business Media, p 1-2

Huang, X., Liu, J., Wang, Y., Liu, J., & Lu, L. (2015). The positive effects of Mn<sup>2+</sup> on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 381–389.  
<http://doi.org/10.1080/13102818.2015.1006905>

Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100–112.  
<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>

Jokari, S., Rashedi, H., Amoabediny, G., Naghizadeh Dilmaghani, S., & Mazaheri Assadi, M. (2013). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in a Miniaturized Bioreactor. *International Journal of Environmental Research*, 7(4), 851–858

Kanimozhi, S., Ramya, D., & Menaga Gandhi, M. R. (2014). Production and Optimization of Chitosan from *Aspergillus niger* by Solid State and Submerged Fermentation and Evaluation of its Antibacterial and Antioxidant activity. *Drug Invention Today*, 6(2), 141–148

Kaufhold, S., Reese, A., Schwiebacher, W., Dohrmann, R., Grathoff, G. H., Warr, L. N., Halisch, M., Müller, C., Schwarz-Schampera, U., Ufer, K. (2014). Porosity and distribution of water in perlite from the island of Milos, Greece. *SpringerPlus*, 3(1), 598.  
<http://doi.org/10.1186/2193-1801-3-598>

Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Lee, C.-H., Suh, H.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 41–46

Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiologico: Texto Y Atlas En Color*. Ed. Médica Panamericana, p. 739

Kosaric, N., & Sukan, F. V. (1993). *Biosurfactants: Production: Properties: Applications*. CRC Press, p 72

Kosaric, N., Cairns, W., Gray, N. (Ed.). (1987). *Biosurfactants and Biotechnology*. Surfactant science series, volume 25. Estados Unidos: CRC Press, p 8-9. Retrieved from

[http://books.google.com.co/books?id=SWO6lC2ZGlgC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=SWO6lC2ZGlgC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false), consultado el 12 de febrero de 2015

Kosswig, K. (2000). Surfactants. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol 35. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI: 10.1002/14356007.a25\_747. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25\\_747/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25_747/abstract), consultado el 30 de junio de 2016

Kügler, J. H., Le Roes-Hill, M., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2015). Surfactants tailored by the class Actinobacteria. *Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation*, 6, 212. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00212>

Li, X., Yang, H., Zhang, D., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(1), 93–103. <http://doi.org/10.1007/s10295-014-1527-z>

Makkar, R., & Cameotra, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 428–434. doi:10.1007/s00253-001-0924-1

Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597–1605. <http://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>

Marin, C. P., Kaschuk, J. J., Frollini, E., & Nitschke, M. (2015). Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. *Industrial Crops and Products*, 66, 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.001>

Markets and markets. (n.d). Surfactants Market worth \$42,120.4 Million by 2020. Dallas, EE.UU. Retrieved from <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/surfactants.asp>, consultado el día 19 de enero del 2016

Mejía, L. (2008). Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* (Tesis de maestría). Instituto politécnico nacional- Centro de investigación en biotecnología aplicada CIBA. Tlaxcala. Retrieved from

<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8652/MaLourdesMejia-CIBA-IPN%20%20MAESTRIA%20TEC%20AVANZADA-2008.pdf?sequence=1>,

consultado el 23 de enero de 2015

Melloni, B. J., Dox, I., & Eisner, G. M. (1982). *Diccionario médico ilustrado de Melloni*. Reverte, P.74

Mitchell, D. A., Berovič, M., & Krieger, N. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. *Solid-State Fermentation Bioreactors* (pp. 1–12). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. Retrieved from [http://link.springer.com/10.1007/3-540-31286-2\\_1](http://link.springer.com/10.1007/3-540-31286-2_1), consultado el 9 de mayo de 2016

Mondragón, L. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional-Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura Unidad Profesional Ticomán. México, D. F. Retrieved from <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8140/TESIS%20LM M.pdf?sequence=1>, consultado el 12 de febrero de 2015

Moreno, R. (2005). *Reología de suspensiones cerámicas*. Editorial CSIC - CSIC Press, p. 303. Retrieved from: <https://books.google.com.mx/books?id=nWFqE1jyenEC&pg=PA303&dq=concentraci%C3%B3n+micelar+critica+surfactante&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi909r48svMAhVY->

[mMKHTUGA2kQ6AEINjAG#v=onepage&q=concentraci%C3%B3n%20micelar%20critica%20surfactante&f=false](http://mMKHTUGA2kQ6AEINjAG#v=onepage&q=concentraci%C3%B3n%20micelar%20critica%20surfactante&f=false), consultado el 15 de febrero de 2015

Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211–218. [http://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](http://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)

Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509–515. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.005

Naing, K. W., Lee, Y. S., Nguyen, X. H., Jeong, M. H., Anees, M., Oh, B. S., Cho, J.Y., Kim, K. Y. (2015). Isolation and characterization of an antimicrobial lipopeptide produced by *Paenibacillus ehimensis* MA2012: A novel lipopeptide produced by *Paenibacillus ehimensis*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), 857–868. <http://doi.org/10.1002/jobm.201400505>

NCBI- National Center for Biotechnology Information. (n.d. a). Rphdhd. PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162246#section=Top>, consultado el 4 de julio de 2016

NCBI- National Center for Biotechnology Information. (n.d. b). Sophorolipid. PubChem Compound Database. Retrieved from

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11856871>, consultado el 4 de julio de 2016

NCBI- National Center for Biotechnology Information. (n.d. c). Surfactin. PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65307>, consultado el 4 de julio de 2016

NCBI- National Center for Biotechnology Information. (n.d. d). Viscosin. PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72937#section=Top>, consultado el 4 de julio de 2016

Ohno, A., Ano, T., & Shoda, M. (1992). Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 14(12), 1165–1168. <http://doi.org/10.1007/BF01027022>

Ohno, A., Ano, T., & Shoda, M. (1995). Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(2), 209–214. <http://doi.org/10.1002/bit.260470212>

Ortega, N. (2013). Evaluación de la eficiencia de producción del biosurfactante de *Acinetobacter bouvetii* a partir de diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas (tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México. Retrieved from <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16181&docs=UAMI16181.pdf>, consultado el 22 de enero de 2016

Osmolovsky, A., Kreier, V., Baranova, N., Kurakov, A., & Egorov, N. (2013). Production of extracellular proteinases-protein C activators of blood plasma-by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 49(6), 581–586. Retrieved from <http://doi.org/10.1134/S0003683813060148>

Plaza, G. A., Płociniczak, M.P., Seget, Z.P., Jangid, K., Wilk, K.A. (2011). Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus* strains and production of biosurfactant. *Environment Protection Engineering*, Vol. 37, No. 3 (pp. 63–71). Retrieved from [http://epe.pwr.wroc.pl/2011/3\\_2011/07plaza.pdf](http://epe.pwr.wroc.pl/2011/3_2011/07plaza.pdf)

Rahman, M. S., Ano, T., & Shoda, M. (2006). Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 513–515. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.016>

Reis, R.S., Pacheco, G.J., Pereira, A.G. & Freire, D.M. (2013). Biosurfactants: Production and Applications, Chapter 2. Biodegradation - Life of Science. Retrieved from <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/45092.pdf>

Rodríguez, L. (2016). Extracción, purificación y transformación enzimática del ácido clorogénico de la pulpa de café (tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México. Retrieved from <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=17065&docs=UAMI17065.pdf>, consultado el 10 de julio de 2016

Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J., Arrebola, E., Cazorla, F., Kuipers, O., Paquot, M., Pérez, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *The American Phytopathological Society*, Vol. 20, No. 4, 2007, pp. 430–440. doi: 10.1094/MPMI-20-4-0430

Rosenberg E., Perry A., Gibson D. T., Gutnick D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:409-413

Rosenberg, D. E., & Ron, E. Z. (2013). Biosurfactants. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 281–294). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from [http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-31331-8\\_29](http://link.springer.com.ezproxy.unal.edu.co/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-31331-8_29)

Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Legmann, R., & Ron, E. Z. (1988). Purification and Chemical Properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 Biodispersan. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 323–326

Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(1), 1–14. Retrieved from <http://astonjournals.com/manuscripts/Accepted/GEBJ-29acc7-11-11.pdf>

Sailatha, T., Saranya, P., Swarnalatha, S., Velan, M., & Sekaran, G. (2016). Enzymatic destabilization of chemical surfactant in wastewater—a potent ultrafiltration foulant: kinetic studies. *Desalination and Water Treatment*, 57(32), 14833–14848. <http://doi.org/10.1080/19443994.2015.1067839>

Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127–144. <http://doi.org/10.3109/07388550903427280>

Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G., Torres-Mancera, M., Figueroa-Montero, A., Rosales Zamora, G. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y flujo de los gases de salida en procesos biológicos. México, 336733. C12Q1/02 (2006-01), 22 enero 2016. Appl. MX/a/2013/004638, 25 abril 2013. Retrieved from <http://siga.impi.gob.mx/content/common/busquedaSimple.jsf>, 8 de Julio de 2016

Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D., & Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29(1), 13–24. [http://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80054-5](http://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80054-5)

Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A. S., & Jacques, P. (2011). Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser

Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 299–306. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.022>

Sen, R., & Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 141–148. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.006>

Seydlová, G., & Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3(2), 123–133. <http://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5>

Shafiei, Z., Abdul Hamid, A., Fooladi, T. and Yusoff, W. (2014). Surface Active Components: Review. *Current Research Journal of Biological Sciences* 6(2): 89-95, 2014. ISSN: 2041-076X, e-ISSN: 2041-0778

Shekhar, S., Sundaramanickam, A., & Balasubramanian, T. (2014). Biosurfactant producing microbes and its potential applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 0(ja), 00–00. doi:10.1080/10643389.2014.955631

Sheppard, J. D., & Cooper, D. G. (1991). The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 72–76. <http://doi.org/10.1007/BF00180639>

Siñeriz, F., Hommel, R. K., & Kleber, H. P. (2001). Production of biosurfactants. Encyclopedia of Life Support Systems. Eolss Publishers, Oxford. Retrieved from <http://www.eolss.net/sample-chapters/c17/E6-58-05-06.pdf>

Slivinski, C. T., Mallmann, E., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47(12), 1848–1855. doi:10.1016/j.procbio.2012.06.014

Soberón, G., & Maier, R. (2011). Biosurfactants: A General Overview. Microbiology Monographs 20. DOI 10.1007/978-3-642-14490-5\_1, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., Gonçalves, L.R.B., Sant'ana, H. B. (2014). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil/ biosurfactant/water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 613–623. <http://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002766>

Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013). Review Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81 146– 161

Vilela, W. F. D., Fonseca, S. G., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., & Nitschke, M. (2014). Production and Properties of a Surface-Active Lipopeptide Produced by a

New Marine Brevibacterium luteolum Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(6), 2245–2256. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-1208-4>

Vining, L. C. (1990). Functions of Secondary Metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44(1), 395–427. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002143>

Wei, Y., & Chu, I. (2002). Mn<sup>2+</sup> improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 24: 479–482

Wei, Y.-H., Wang, L.-C., Chen, W.-C., & Chen, S.-Y. (2010). Production and Characterization of Fengycin by Indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 Originating from a Potato Farm. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4526–4538. <http://doi.org/10.3390/ijms11114526>

Whang, L.-M., Liu, P.-W. G., Ma, C.-C., & Cheng, S.-S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 155–163. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>

Yañez, G., & Wong, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Retrieved from

[http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2013\\_3/biosurfactantes.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2013_3/biosurfactantes.pdf), consultado el 15 de febrero de 2015

Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and

surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2529–2542.

<http://doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>

Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2005). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1329–1334. <http://doi.org/10.1021/bp050040c>

Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41(8), 1799–1805. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>

Zhu, Z., Zhang, F., Wei, Z., Ran, W., & Shen, Q. (2013 a). The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 127, 96–102. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.017>

Zhu, Z., Zhang, J., Wu, Y., Ran, W., & Shen, Q. (2013 b). Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(11), 2105–2114. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1375-4>

Zohora, U. S., Rahman, M. S., Khan, A. W., Okanami, M., & Ano, T. (2013). Improvement of production of lipopeptide antibiotic iturin A using fish protein. *Journal of Environmental Sciences*, 25, S2–S7. [http://doi.org/10.1016/S1001-0742\(14\)60616-](http://doi.org/10.1016/S1001-0742(14)60616-1)

[1](#)

## 11. Anexos

### **Anexo 1. Estimación del error de la pendiente de la curva estándar de surfactina con el método de actividad emulsificante**

En busca de presentar una curva estándar con valores cercanos a la AE mostrada por algunas muestras evaluadas, se eliminó el valor más alto de la Figura 2 y se determinó el error de la pendiente el cual mostró un cambio de signo. Por ello, se decidió ajustar la curva estándar a una intercepción al eje x igual a cero (Figura 2).

Se estimó el error de la pendiente el cual fue  $8.06 \frac{UE}{mg SF}$  y correspondió al 31.43% de error del error de la pendiente calculada sin intercepto respecto al error obtenido con una ecuación con intercepto. También, se encontró que la pendiente calculada sin intercepto respecto a la determinada con intercepto presentó un error del 12.68%, (Tabla 19). Es decir que se está sobreestimando los valores de concentración en dicho porcentaje. Sin embargo, no es un valor considerablemente grande.

Tabla 19. Estimación del error de la pendiente sin intercepto (% Error pend: porcentaje de error de la pendiente sin intercepto respecto a la con intercepto)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.99
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.99
R <sup>2</sup> ajustado	0.74
Error típico	1.13
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA							
		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión		1	361.11	361.11	283.50	0.00	
Residuos		4	5.10	1.27			
Total		5	366.21				
<i>Error</i>		Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
---	Intercepción	0	--	--	--	--	--
<b>8.06</b>	pendiente	<b>48.86</b>	2.90	16.84	0.00	<b>40.80</b>	<b>56.91</b>
<b>% Error</b>							
<b>31.43</b>							
<b>% Error</b>							
<b>pend</b>							
<b>12.68</b>							

## Anexo 2. Curva estándar de surfactina con el método de actividad surfactante

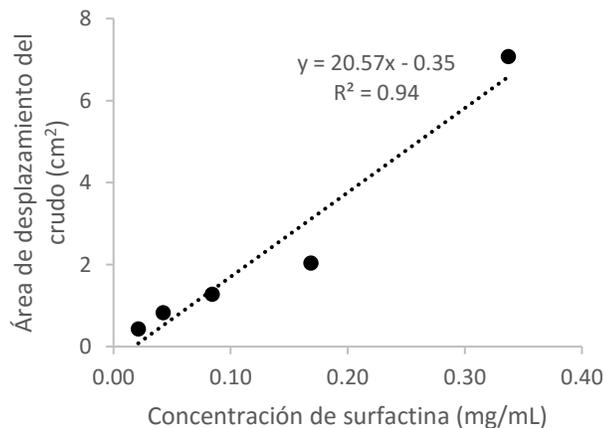


Figura 27. Curva estándar de surfactina con el método de actividad surfactante

### Anexo 3. Espectrometría de la surfactina reportada

#### Anexo 3.a. Espectro infrarrojo de surfactina reportado

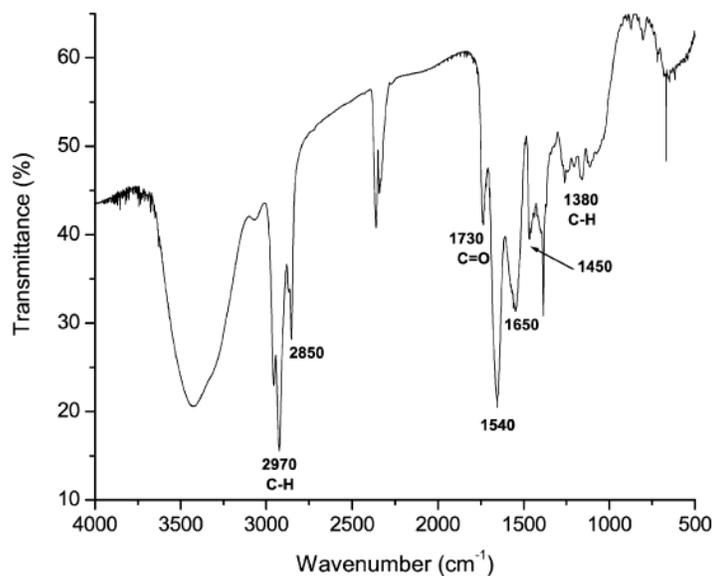


Figura 28. Espectro infrarrojo de surfactina purificada producida por *Bacillus subtilis* cultivado en glicerol. La muestra se preparó en KBr de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> (de Faria et al., 2011)

#### Anexo 3.b. Espectro de masas de surfactina reportado

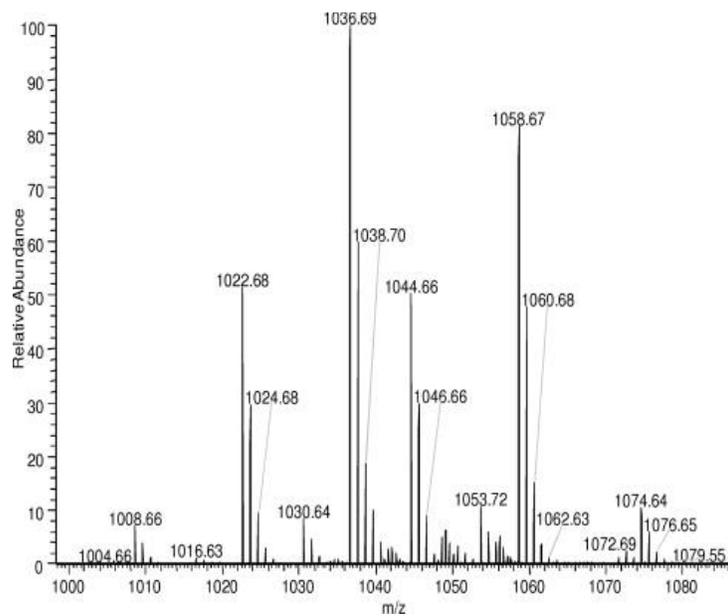


Figura 29. Espectro de masas de surfactina purificada producida por *Bacillus subtilis* cultivada en glicerol (de Faria et al., 2011)