



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**“Contribución al estudio del bioemulsificante de
Acinetobacter bouvetii UAM25 para su producción y
aplicación en hidrocarburos”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

M. en B. Nestor David Ortega de la Rosa

DIRECTOR: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

ASESORES: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. Miquel Gimeno Seco

Ciudad de México, a 20 de diciembre de 2018.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del Conacyt en el nivel de Competencia Nacional y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el No. de referencia 001466.

Ciudad de México. a 20 de diciembre de 2018

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

“Contribución al estudio del bioemulsificante de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 para su producción y aplicación en hidrocarburos”

que presentó:

Nestor David Ortega de la Rosa

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutierrez Rojas. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Miquel Gimeno Seco. Universidad Nacional Autónoma de México

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Vocal: Dr. Miquel Gimeno Seco

Vocal: Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

**Guidxilayú hri stilu ni, hriquiñesi
ucaalúlu' ti gánda icaaluni'**

**El mundo es tuyo, pero tienes que
ganártelo.**

Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma Metropolitana** por ser mi hogar, mi casa abierta al tiempo.

Al **Dr. Mariano Gutiérrez Rojas** por su amistad y cariño. Por la oportunidad, el apoyo y la confianza para formar parte de su grupo de investigación y especialmente, por su guía para vivir la ciencia con pasión.

A los **Drs. Sergio Huerta Ochoa** y **Miquel Gimeno Seco** por contribuir al desarrollo de este estudio con su invaluable asesoría, experiencia y conocimientos brindados.

A la **Dra. Gloria Maribel Trejo Aguilar** por su asesoría y conocimientos compartidos en la caracterización del aceite usado de cocina.

A los **Drs. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez** y **Carlos Omar Castillo Araiza** por la revisión de este documento.

Al **Dr. Jaime Vernon** por sus conocimientos compartidos.

A las **Dras. Arely Prado** y **Angelica Román** por la revisión del manuscrito del artículo científico publicado.

A la **Dra. Carmina Montiel** y **Alejandra Romero** por su hospitalidad en la Facultad de Química de la UNAM

A **mi familia** por estar siempre conmigo, en especial a mis padres y mi hermana por su amor y cariño.

A **Eli Alejandra Motolinia** por tu amistad, amor y apoyo incondicional.

A **Nohemi García** y **Ana Juárez** por su amistad y cariño inquebrantable.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo, consejos y observaciones para mejorar este estudio, particularmente a **Paulina Gómez, José Luis Vázquez** y **Víctor Sánchez**.

Al **Conacyt** por el apoyo económico.

Índice General

1	Introducción-----	1
2	Revisión bibliográfica-----	3
2.1	Biosurfactantes como agentes emulsificantes de hidrocarburos -----	3
2.2	Emulsificantes del género <i>Acinetobacter</i> . bioemulsanes -----	4
2.3	Características químicas de los bioemulsificantes -----	5
2.3.1	Composición química y estructura molecular-----	5
2.3.2	Peso molecular-----	5
2.3.3	Tensión superficial y tensión interfacial -----	5
2.3.4	Actividad emulsificante-----	6
2.4	Estabilidad de bioemulsificantes-----	6
2.5	Fuentes de carbono para la producción de bioemulsificantes-----	7
2.5.1	Mecanismos de incorporación de las fuentes de carbono-----	8
2.5.2	Rutas metabólicas involucradas en el consumo de las fuentes de carbono -	8
2.5.3	Rutas metabólicas involucradas en la producción de bioemulsificantes -----	9
2.6	Biorreactor airlift -----	11
2.6.1	Parámetros cinéticos de producción y de crecimiento-----	12
2.6.2	Modelos de crecimiento-----	12
3	Antecedentes-----	14
4	Justificación-----	16
5	Hipótesis-----	17
6	Objetivos -----	17
6.1	Objetivo general -----	17
6.2	Objetivos particulares -----	17
7	Estrategia experimental-----	18
7.1	Primera etapa -----	18
7.2	Segunda etapa-----	18

7.3	Tercera etapa -----	18
8	Materiales y métodos-----	19
8.1	Material biológico y medios de cultivo-----	19
8.1.1	Microorganismo-----	19
8.1.2	Medios de cultivo -----	19
8.1.3	Activación de <i>A. bouvetii</i> -----	19
8.2	Fuentes de carbono-----	19
8.3	Producción de los bioemulsificantes-----	20
8.3.1	Cinéticas de producción en botellas serológicas -----	20
8.3.2	Cinéticas de producción en biorreactor airlift -----	20
8.3.3	Actividad emulsificante-----	20
8.3.4	Crecimiento bacteriano -----	20
8.3.5	Parámetro cinético de producción-----	21
8.3.6	Modelo de crecimiento y parámetros cinéticos de crecimiento-----	21
8.3.7	Consumo de aceite usado de cocina -----	21
8.3.8	Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno-----	22
8.4	Caracterización de los bioemulsificantes -----	22
8.4.1	Purificación de los bioemulsificantes -----	22
8.4.2	Carbohidratos totales-----	23
8.4.3	Proteína soluble-----	23
8.4.4	Tensión superficial -----	23
8.4.5	Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) -----	23
8.4.6	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier -----	24
8.4.7	¹ H análisis de RMN -----	24
8.4.8	Análisis elemental -----	24
8.5	Estabilidad de los bioemulsificantes -----	24
8.6	Análisis estadístico-----	24

9	Resultados y discusión -----	26
9.1	Cinéticas de producción de los bioemulsificantes -----	26
9.1.1	Cinéticas de producción de los bioemulsificantes en botellas serológicas --	26
9.1.2	Cinéticas de producción de los bioemulsificantes en biorreactores airlift----	28
9.1.3	Potencial de <i>Acinetobacter bouvetii</i> UAM25 como productora de bioemulsificantes -----	30
9.2	Caracterización de los bioemulsificantes -----	32
9.3	Estabilidad de los bioemulsificantes -----	38
9.4	Efecto de la fuente de carbono sobre la composición química de los bioemulsificantes producidos y su estabilidad.-----	40
10	Conclusiones -----	42
11	Perspectivas -----	43
12	Referencias bibliográficas -----	44
13	Anexo -----	55
13.1	Espectros de los ésteres metílicos presentes en el aceite usado de cocina -----	55
13.2	Espectros de los bioemulsificantes de <i>Acinetobacter bouvetii</i> UAM25-----	56
13.3	Artículo científico -----	56

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de incorporación de las fuentes de carbono.-----	8
Figura 2. Rutas metabólicas involucradas en el consumo de las fuentes de carbono ensayadas en este trabajo. -----	9
Figura 3. Ruta dependiente de Wzx/Wzy propuesta para la síntesis de Emulsan [49]. ---	10
Figura 4. Esquema típico de un biorreactor airlift (a). Biorreactores airlift utilizados en este estudio (b). -----	11
Figura 5. Cinéticas de producción de los bioemulsificantes (●, ■, ◆) y de crecimiento de <i>A. bouvetii</i> UAM25 (○, □, ◇) en botellas serológicas con tres diferentes fuentes de carbono: Etanol (a), una mezcla de glicerol-hexadecano (b) y aceite usado de cocina (c). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas independientes y las barras indican la desviación estándar.-----	27
Figura 6. Cinéticas de producción de los bioemulsificantes (●, ■, ◆) y de crecimiento de <i>A. bouvetii</i> UAM25 (○, □, ◇) en biorreactores airlift con tres diferentes fuentes de carbono: Etanol (a), una mezcla de glicerol-hexadecano (b) y aceite usado de cocina (c). Cada punto representa el valor promedio de dos réplicas independientes y las barras indican la desviación estándar.-----	29
Figura 7. Variación de ésteres metílicos residuales (a) y su distribución porcentual (b) durante la cinética de producción del BE a partir de AUC. Oleato de metilo (■), linoleato de metilo (■), palmitato de metilo (■) y estearato de metilo (□). Valor promedio de 2 repeticiones. -----	31
Figura 8. Espectro de FTIR (a) y espectro de ¹ H NMR (b) del BE _E .-----	36
Figura 9. Efecto de la salinidad (a, g de NaCl L ⁻¹), pH (b) y temperatura (c, °C) sobre la actividad emulsificante relativa (EA _R) de BE de <i>A. bouvetii</i> UAM25. El asterisco indica diferencias significativas (α = 0.05, método de Dunnett). BE _E , BE producido con etanol; BE _{GH} , BE producido con la mezcla de glicerol-hexadecano; BE _W , BE producido con aceite usado de cocina. Los resultados son el promedio ± la desviación estándar de dos mediciones independientes. -----	39

Índice de tablas

Tabla 1. Modelos de crecimiento y sus formas modificadas [57].-----	13
Tabla 2. Parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento estimados en botellas serológicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba Tukey).-----	28
Tabla 3. Parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento estimados en BAL. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba Tukey). -----	30
Tabla 4. Composición química, actividad emulsificante y producción de bioemulsificantes por <i>A. bouvetii</i> UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los BEs ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey) y el asterisco indica diferencias significativas entre SLC y BE purificado ($\alpha = 0.05$, prueba t).-----	33
Tabla 5. Peso molecular de los bioemulsificantes producidos por <i>A. bouvetii</i> UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey).-----	34
Tabla 6. Composición elemental (expresada como distribución porcentual masiva) de los bioemulsificantes producidos por <i>A. bouvetii</i> UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey).-----	37

Resumen

Las especies del género *Acinetobacter* se identifican como productoras de moléculas anfifílicas conocidas como bioemulsificantes. Se estudió la producción, caracterización y estabilidad de los bioemulsificantes producidos por *Acinetobacter bouvetii* UAM25. *A. bouvetii* UAM25 creció con tres diferentes fuentes de carbono y energía: etanol, una mezcla de glicerol-hexadecano (Relación molar 7:1) y aceite usado de cocina en un biorreactor airlift, demostrando que la producción de los bioemulsificantes estuvo asociada al crecimiento. Los tres bioemulsificantes purificados fueron lipo-heteropolisacáridos de alto peso molecular ($4,866 \pm 533$ y 462 ± 101 kDa). La mejor fuente de carbono y energía para la producción de bioemulsificantes fue el aceite usado de cocina. El bioemulsificante producido con aceite usado de cocina generó la mayor actividad emulsificante (76.2 ± 3.5 UE mg^{-1}), en comparación con el producido con etanol (46.6 ± 7.1 UE mg^{-1}) y con la mezcla de glicerol-hexadecano (49.5 ± 4.2 UE mg^{-1}). Los tres bioemulsificantes en este estudio mostraron estructuras macromoleculares similares, independientemente de la naturaleza (hidrofóbica o hidrofílica) de la fuente de carbono y energía. Los bioemulsificantes no disminuyeron la tensión superficial, pero la capacidad emulsificante de todos ellos se mantuvo bajo condiciones extremas de salinidad (0 - 50 g NaCl L^{-1}), pH (3 - 10) y temperatura (25 - 121 °C), indicativo de su notable estabilidad. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión de la relación entre: producción, composición química y estabilidad de los bioemulsificantes para sus posibles aplicaciones en biotecnología, como la biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: Bioemulsificante; *Acinetobacter bouvetii*; Lipo-heteropolisacárido; Biorreactor airlift

Abstract

Acinetobacter species are identified as amphiphilic and emulsifying molecules known as bioemulsifiers. Production, characterization and stability of bioemulsifiers produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 were studied. *A. bouvetii* UAM25 grew in three different carbon and energy sources: ethanol, a glycerol-hexadecane mixture (Molar ratio 7:1) and waste cooking oil in an airlift bioreactor, showing that bioemulsifier production was, for all cases, growth-associated. The three purified bioemulsifiers were lipo-heteropolysaccharides of high molecular weight ($4,866 \pm 533$ and 462 ± 101 kDa). The best carbon source and energy for bioemulsifier production was wasted cooking oil, with a highest emulsifying capacity, here reported as emulsifying units (EU) (76.2 ± 3.5 EU mg^{-1}) as compared with bioemulsifiers produced with ethanol (46.6 ± 7.1 EU mg^{-1}) and with the glycerol-hexadecane mixture (49.5 ± 4.2 EU mg^{-1}). The three bioemulsifiers in our study displayed similar macromolecular structures, regardless of the nature (hydrophobic or hydrophilic) of the carbon and energy source. Bioemulsifiers did not decrease surface tension, but the emulsifying capacity of all of them was retained under extreme variation in salinity (0 - 50 g NaCl L^{-1}), pH (3 - 10) and temperature (25 - 121 °C), indicative of remarkable stability. These findings contribute to the understanding of the relationship between: production, chemical composition and stability of bioemulsifiers for their potential applications in biotechnology, such as bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil and water.

Keywords: Bioemulsifier; *Acinetobacter bouvetii*; Lipo-heteropolysaccharide; Airlift bioreactor.

Abreviaturas/ Unidades

λ	Duración de la fase lag, h
μ	Tasa máxima específica de crecimiento, h ⁻¹
σ_s	Tensión superficial, mN m ⁻¹
AE	Actividad emulsificante, UE mL ⁻¹
AE_{max}	Actividad emulsificante máxima, UE mL ⁻¹
AUC	Aceite usado de cocina
BAL	Biorreactor airlift
BE	Bioemulsificante
BE _E	Bioemulsificante producido con etanol
BE _{GH}	Bioemulsificante producido con una mezcla de glicerol-hexadecano
BE _W	Bioemulsificante producido con aceite usado de cocina
BS	Biosurfactante
FC	Fuente de carbono
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Furrier
k_{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno, h ⁻¹
MM	Medio mineral
PM	Peso molecular, kDa
q_p	Tasa volumétrica de producción, UE (mL h) ⁻¹
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SLC	Sobrenadante libre de células
UE	Unidades de emulsificación
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFC_{max}	Crecimiento máximo, UFC mL ⁻¹
Ug	Velocidad superficial de gas, cm s ⁻¹

Contribución al estudio del bioemulsificante de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 para su producción y aplicación en hidrocarburos

1 INTRODUCCIÓN

El interés en la producción de biosurfactantes se ha incrementado debido a su posible aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y petrolera, así como en la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos [1,2]. Los biosurfactantes (BSs) son biomoléculas anfífilas con actividad superficial. Los bioemulsificantes (BEs) son BSs de alto peso molecular con la capacidad de formar emulsiones estables con hidrocarburos [3]. Químicamente, los BEs son mezclas complejas de heteropolisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas. La combinación de componentes de polisacáridos, ácidos grasos y proteínas confiere al BE un mejor potencial emulsificante y capacidad para estabilizar las emulsiones [4].

Los BEs son producidos por una gran variedad de microorganismos, como las *Acinetobacter* sp. que producen una variedad de BEs [5–7]. *A. venetianus* RAG-1 y *A. calcoaceticus* PTCC 1318 produjeron emulsiones a partir de etanol y aceite de girasol, respectivamente [6,8]. El Emulsan es un lipo-heteropolisacárido polianiónico que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1,000 kDa. *A. radioresistens* KA53 produjo Alasan a partir de etanol, un BE estable de alto peso molecular. El Alasan es un complejo de polisacáridos y proteínas [9]. *A. beijerinckii* ZRS produjo un complejo de glicolipoproteína a partir de hexadecano [3]. Varios estudios han demostrado la capacidad de las especies del género *Acinetobacter* para consumir fuentes de carbono hidrofílicas, hidrofóbicas o mezclas de ambas para la producción de BEs [8,10,11]. Sin embargo, pocos trabajos han reportado estudios cinéticos de producción de BEs y crecimiento, que son necesarios para el diseño y control de biorreactores [12]. Además, hay pocas publicaciones sobre producción de BEs en biorreactores que permitan el desarrollo de tecnología para la producción de BEs a nivel industrial. Por lo tanto, los estudios de producción de BEs en biorreactores también son necesarios.

En el laboratorio de Residuos Sólidos de la UAM Unidad Iztapalapa existe una gran preocupación por el tratamiento de aguas y suelos contaminados con hidrocarburos. En México durante el periodo comprendido entre 2012 y 2016, se reportaron 2,874 derrames de hidrocarburos en ambientes marinos y terrestres (SEMARNAT). Debido a lo anterior, en los últimos 10 años, se ha tenido que remediar 693 sitios contaminados. Sin embargo, el Sistema Informático de Sitios Contaminados registró hasta 2017 un total de 623 sitios contaminados como pasivos ambientales,

es decir, 623 sitios contaminados que no se han podido remediar. Lo anterior crea un problema ambiental importante y obliga a la comunidad científica a plantear y ofrecer soluciones al respecto. Por lo tanto, con el objetivo de verificar el interés de la comunidad científica por aportar posibles soluciones al respecto. Se realizó una búsqueda de publicaciones relacionadas con los temas a desarrollar. Durante el periodo comprendido entre 2012 y 2017, de acuerdo con *Web of Science* (2018, Clarivate Analytics) el término *biosurfactant* generó 2,578 publicaciones científicas. Estas publicaciones han tenido 6.81 citas en promedio por estudio y 43 estudios se han citado 43 o más veces (h -index = 43). En el mismo periodo (2012-2017) se publicaron 566 trabajos relacionados con el **Tema** (*biosurfactant*) AND **Tema** (*hydrocarbons*), estos trabajos han tenido 8.34 citas en promedio y un h -index de 30. Además, se han publicado 69 trabajos relacionados con los BSs de *Acinetobacter* teniendo en promedio 8.55 citas por publicación y 14 estudios se han citado 14 veces o más (h -index = 14). Por otro lado, se han generado 110 publicaciones sobre la producción de BEs teniendo en promedio 7.33 citas y un h -index de 16. Lo anterior demuestra el gran interés de la comunidad científica por el estudio de BSs y la relevancia del presente trabajo. Al realizar una búsqueda con: **Tema** (*bioemulsifier**) AND **Tema** (*Acinetobacter*) generó 22 publicaciones científicas con un promedio de citas de 7.85 y un h -index de 6, es importante señalar que 12 estudios se publicaron entre 2016 y 2017. Al realizar una búsqueda similar, pero con: **Tema** (*bioemulsifier**) AND **Tema** (*bioreactor*) generó tan solo dos publicaciones, una de ellas publicada en 2016 y la otra de nuestro grupo de trabajo publicada en 2017.

Lo anterior sugiere la necesidad de realizar más investigaciones sobre la producción de BEs en biorreactores y éste es el aspecto novedoso de este trabajo. Por lo que al tener como motivación fundamental aportar conocimiento al estudio de BSs para su posible aplicación en sitios contaminados con hidrocarburos, el objetivo se centró en evaluar el efecto de la fuente de carbono que consume *A. bouvetii* UAM25 sobre la producción de los BEs en un biorreactor airlift. Posteriormente, se evaluaron las características químicas de los BEs producidos y, por último, se evaluó su estabilidad para determinar si la fuente de carbono utilizada para su producción tuvo algún efecto. A continuación, se presenta una revisión bibliográfica del estado del arte, se presentan los antecedentes y se justifica el estudio de la producción del BE producido por *A. bouvetii* UAM25 a partir de diferentes fuentes de carbono en biorreactores airlift. Posteriormente, se presenta la hipótesis y se enlistan los objetivos del estudio. Se menciona la estrategia experimental que se siguió y los materiales y métodos empleados. Enseguida se describen los resultados y se discuten. Finalmente, se enlistan las conclusiones, perspectivas y referencias bibliográficas del estudio.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOSURFACTANTES COMO AGENTES EMULSIFICANTES DE HIDROCARBUROS

Los BSs y BEs son moléculas anfifílicas producidas principalmente por microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Estos compuestos poseen un extremo hidrófilo y un hidrofóbico que les confiere actividades de superficie que, entre otras funciones, ayuda a solubilizar sustratos hidrofóbicos [13]. Los BSs son generalmente compuestos de bajo peso molecular ($PM < 30$ kDa) constituidos principalmente de glicolípidos y algunos lipopéptidos de cadena corta mientras que los BEs son polímeros de peso molecular elevado ($PM \geq 30$ kDa) generalmente constituidos por lipopolisacáridos, lipoproteínas o una combinación de éstos [14]. Los emulsificantes son grupos de moléculas que pueden formar mezclas moderadamente homogéneas de dos líquidos inmiscibles. Estos compuestos pueden reducir la tensión superficial ya que simplemente pueden enlazar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas para formar una emulsión. [15]. El interés en la investigación y aplicación de BSs y BEs está ganando mayor impulso por su carácter amigable con el ambiente, menor toxicidad, biodegradabilidad y eficacia en una amplia gama de valores de pH y temperatura en comparación con surfactantes sintéticos [16,17].

Los BSs y BEs se llaman de forma indistinta como BS y ambos pueden funcionar como tensoactivos, emulsificantes, espumantes, detergentes, dispersantes, humectantes y provocar la reducción de la viscosidad del petróleo crudo, que hace factible utilizarlos para muchos propósitos de aplicación. La mayoría de los emulsificantes que se utilizan actualmente son de origen petroquímico, sin embargo; los BEs pueden sustituir a sus análogos químicos e incluso ofrecer ventajas adicionales como el ser estables en amplios rangos de pH, temperatura y concentraciones de sales [1,2,18]. El único BE comercial disponible en el mercado actual es el Emulsan, patentado por Gutnick y col., [19]. El Emulsan es un lipopolisacárido aniónico extracelular asociado a proteína producido por *Acinetobacter venetianus* RAG-1. Su peso molecular es de aproximadamente 1,000 kDa, no reduce la tensión interfacial (10 mN m^{-1}) apreciablemente, pero se une firmemente a la interfase aceite-agua y protege las gotitas de aceite de la coalescencia. Es un fuerte estabilizador de la emulsión en lugar de un reductor de tensión interfacial [20].

2.2 EMULSIFICANTES DEL GÉNERO *ACINETOBACTER*: BIOEMULSANES

A. venetianus RAG-1 es una cepa industrialmente importante que se ha caracterizado extensamente con respecto a su crecimiento en hidrocarburos y la producción de un bioemulsificante de alto peso molecular. Entre los llamados genéricamente "bioemulsanes", los más estudiados son el Emulsan producido por *A. venetianus* RAG-1 [21], el Bioemulsan producido por *A. calcoaceticus* BD4 [22], el Alasan producido por *A. radioresistens* KA53 [23] y el Biodispersan que es sintetizado por *Acinetobacter radioresistens* A2 [24]. El Emulsan de *A. venetianus* RAG-1 es un polisacárido que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,000 kDa. El Emulsan de *A. calcoaceticus* BD4 proviene de la liberación de un polisacárido capsular al medio que forma un complejo con las proteínas y entonces se convierte en un emulsificante eficaz. El Alasan tiene un peso molecular de 100 a 200 kDa, y una actividad emulsificante que aumenta con precalentamiento de 60 a 90 °C [9,25].

La producción de Emulsan se ha estudiado en varias fuentes de carbono hidrofóbicas incluyendo petróleo crudo, hidrocarburos de cadena larga, ácidos grasos y triglicéridos, pero también en fuentes de carbono hidrofílicas tales como el etanol y el acetato [26,27]. El efecto de represión catabólica con etanol ha sido reportado en la regulación del crecimiento celular [28,29]. Por lo tanto, el etanol se utiliza con frecuencia como una fuente de carbono que participa en el crecimiento celular y la producción Emulsan. Sin embargo, una alta concentración de etanol (por encima de 10-16 g L⁻¹) tuvo un efecto inhibitorio sobre *A. venetianus* RAG-1 de cultivo para la producción de Emulsan [28,30]. Estudios previos han demostrado que la composición de ácidos grasos en las cadenas laterales de la cadena principal del polisacárido del Emulsan puede ser manipulado por el cambio de las condiciones de cultivo de *A. venetianus* RAG-1 [31,32]. Un estudio más reciente ha optimizado la producción de Emulsan por *A. venetianus* RAG-1 con etanol como fuente de carbono y se demostró que la concentración inicial de etanol es el factor más importante del medio de cultivo [8].

La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 produce BE de bajo peso molecular cuando se cultiva en fuentes de carbono hidrofóbicas (hexadecano y parafinas líquidas) e hidrofílicas (etanol y glucosa). Es importante resaltar que la mayoría de los representantes del género *Acinetobacter* sintetizan BE de alto peso molecular que no poseen propiedades tensoactivas [33]. Recientemente, se ha reportado que los miembros del género *Acinetobacter* producen tensoactivos de bajo peso molecular cuando se cultivan en sustratos hidrofóbicos [34].

2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS BIOEMULSIFICANTES

Las propiedades químicas de los BEs que se han estudiado son: (i) la composición química; (ii) la estructura molecular; (iii) el peso molecular (PM); (iv) las proporciones de polisacáridos, de proteína y de lípidos del BE; (v) su capacidad para modificar la tensión superficial (σ_s) del agua; (vi) su capacidad para modificar la tensión interfacial (TI) entre dos líquidos inmiscibles; la actividad emulsificante (AE) y la viscosidad dinámica del BE en suspensión [9,24,35].

2.3.1 Composición química y estructura molecular

La composición química del BE se refiere al grupo de biomoléculas (glúcidos, lípidos y proteínas) que conforman el complejo y la estructura molecular describe la distribución de éstas. Los BEs sintetizados por especies del género *Acinetobacter* son complejos aniónicos de heteropolisacáridos unidos a lípidos o a proteínas. El Emulsan es un heteropolisacárido unido a ácidos grasos de cadena larga [36], el Alasan está compuesto por polisacáridos unidos a proteínas [23], y tanto el Biodispersan como el Etapolan son polisacáridos [24,35].

2.3.2 Peso molecular

El peso molecular (PM) o masa molar de un BE es difícil de describir exactamente debido a la complejidad macromolecular. Un método muy común es establecer un peso molecular promedio, expresado en Da o g/mol, por cromatografía de exclusión a partir de la distribución de pesos moleculares del BE respecto a la distribución a las mismas condiciones de estándares de peso molecular definido y estrecha polidispersidad. El PM reportado para Emulsan varía entre 900 y 1,000 kDa [36]. El Alasan tiene un PM entre 100 y 200 kDa [23], el PM del Biodispersan es de aproximadamente 51.4 kDa [24] y el Etapolan tiene un PM entre 1,400 y 1,600 kDa [35].

2.3.3 Tensión superficial y tensión interfacial

La tensión superficial (σ_s) es una fuerza de contracción que se ejerce sobre las moléculas en la superficie de un líquido hacia su interior. Esta fuerza es consecuencia de la tendencia natural del líquido a reducir su superficie de contacto con un gas. El Emulsan reduce la σ_s del medio de cultivo de 66.5 a 50 mN m⁻¹ [8] y el Alasan (200 µg L⁻¹) reduce la σ_s de una solución de TRIS (20 mM) de 69.1 ± 1.2 a 41.6 ± 0.5 mN m⁻¹ [37].

Por otro lado; cuando se ponen en contacto dos líquidos inmiscibles, las moléculas en la interfase están sometidas a fuerzas de magnitudes diferentes que evitan que se mezclen espontáneamente. El valor intermedio entre estas tensiones superficiales se define como la

tensión interfacial. El Emulsan reduce la tensión interfacial entre el agua de mar y el petróleo de 8.3 a 6.5 mN m⁻¹ [21].

2.3.4 Actividad emulsificante

Una emulsión se define como una mezcla uniforme formada por dos líquidos inmiscibles, de los cuales uno está distribuido en el otro en forma de pequeñas gotas estabilizadas por un tercer componente, el agente emulsificante. La capacidad de un agente emulsificante para estabilizar una emulsión se define como actividad emulsificante (AE). La cuantificación de la AE de los BEs producidos por especies del género *Acinetobacter* se determina tradicionalmente por un método estándar de Rosenberg y col. [21]. El Emulsan es un emulsificante eficaz a bajas concentraciones (0.01 - 0.001%), lo que representa relaciones Emulsan-hidrocarburo de 1:100 a 1:1,000, y que exhibe una considerable especificidad de sustrato. El Emulsan no es capaz de emulsificar hidrocarburos alifáticos, aromáticos, o cíclicos puros, sin embargo; todas las mezclas que contienen una mezcla de alifáticos con aromático (o alcanos cíclicos) las emulsifica de forma eficiente [5].

2.4 ESTABILIDAD DE BIOEMULSIFICANTES

Una de las ventajas que tienen los BEs frente a sus homólogos químicos es la estabilidad que presentan frente a cambios de salinidad, temperatura y pH [1,2]. Se ha reportado que el BS producido por *Streptomyces* sp. R1 fue termoestable (20 – 120 °C), estable en un amplio rango de pH (2 – 12) y salinidad (5 – 20 % NaCl p/v) [2]. El BE producido por *Rhizobium tropici* LBMP-C01 se reportó como estable frente a cambios de pH (2 – 10) y salinidad (0 – 30 % NaCl p/v) [38]. El BS producido por *Bacillus subtilis* se reportó como termoestable (50 – 120 °C) y estable a cambios de salinidad (0 – 50 % NaCl p/v) [39]. Son pocos los estudios que han reportado la estabilidad de los BEs producidos por el género *Acinetobacter*. El Alasan de *A. radioresistens* KA53 se reportó como termoestable (27 – 100 °C) pero sólo fue estable en un pequeño rango de pH (8 – 9) [9]. El BE que produce *A. beijerinckii* ZRS se reportó como estable a cambios de pH (7– 12), salinidad (0 – 3 % NaCl p/v) y temperatura (4 – 60 °C) [3]. Es importante señalar que se reporta la estabilidad de los BEs pero en la mayoría de los estudios no se explica por qué son estables. Por lo tanto, son necesarios más estudios de la estabilidad de los BEs, en particular; de los producidos por especies del género *Acinetobacter*. Además, la estabilidad de una molécula depende de su estructura molecular y una duda que surge es que al cambiar la FC se pueda modificar la estructura molecular de BE producido y por lo tanto, modificar su estabilidad.

2.5 FUENTES DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOEMULSIFICANTES

En la actualidad, el costo de producción de BEs sigue siendo más elevado que el de sus análogos químicos. La aplicación de los BEs depende específicamente del uso de materias primas de bajo costo y la optimización de las condiciones operación de cultivo con el fin de lograr altos rendimientos. Por lo anterior, el aumento de la eficiencia de producción de BE es un aspecto clave en las investigaciones. Una manera de resolver este problema es la aplicación de tecnologías eficientes y procesos basados en la conversión de residuos a productos de mayor valor agregado. En la búsqueda de sustratos de bajo costo para la producción de BEs, se ha utilizado fuentes de carbono renovables como los productos agroindustriales y sus residuos [40].

Una FC prometedora es el aceite usado de cocina (AUC), el cual siendo de origen vegetal una fuente de residuos, ricos en nutrientes y de bajo costo. Se generan grandes cantidades de aceite usado en la producción de alimentos, el cual es, desechado sin mayor uso comercial, presentando además un problema medioambiental en algunos casos. Se ha estimado que en promedio 100 mil millones L semana⁻¹ de residuos de aceite se produce en los Estados Unidos [41]. Hay pocos informes, que utilizan el enorme potencial de los AUC para la producción de BE. Además de la materia prima, la comercialización de los BEs se restringe por los altos costos de producción que pueden ser estabilizados por la optimización de las condiciones de producción y la aplicación de nuevos y eficientes pasos intermedios en los métodos de procesamiento [40].

Otra FC a considerar es el glicerol, el cual se produce en grandes cantidades como subproducto de la producción de biodiesel entre muchos otros. El glicerol es un sustrato prometedor para procesos biotecnológicos. La producción de 100 L de biodiesel da como resultado la formación de casi la misma cantidad de glicerol en bruto. De 2004 a 2006, el precio de mercado de glicerol disminuyó más de diez veces. Los consumidores conocidos, la industria de fragancias, cosméticos y militar, no tienen la capacidad de utilizar todo el suministro generado de glicerol [42].

La aplicación de sustratos mixtos para la obtención de productos es uno de los métodos empleados para la optimización de procesos biotecnológicos. Estudios recientes demostraron que el uso de una mezcla de sustratos necesarios y no necesarios para el crecimiento aumentaron los rendimientos de biomasa y la síntesis de metabolitos de alto valor agregado [43]. Este es un enfoque que permite evitar la pérdida improductiva de carbono y energía que ocurre en el caso del crecimiento de células en mono-sustratos. Estos conceptos se aplicaron en la mejora de la síntesis del BS por *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 con una mezcla de sustratos energéticamente no equivalentes (hexadecano y glicerol) en una relación molar de 1:7; en la relación C/N de 30 aumentó de 2.6 a 3.5 veces la síntesis del BE en comparación con

cultivos de un sólo sustrato [10]. Debido a lo anterior, es necesario conocer los mecanismos de incorporación y consumo de las fuentes de carbono (FCs) empleadas para la producción de BEs.

2.5.1 Mecanismos de incorporación de las fuentes de carbono

Las FCs con carácter hidrofílico, como el etanol y el glicerol, se incorporan a la célula de forma inmediata debido a que están solubles en la fase acuosa. Por otro lado, las FCs con carácter hidrofóbico, como el hexadecano (HXD) y el AUC, se incorporan por tres mecanismos principales: (i) mediante moléculas solubles, (ii) mediante formas emulsificadas y (iii) por contacto directo (Figura 1).

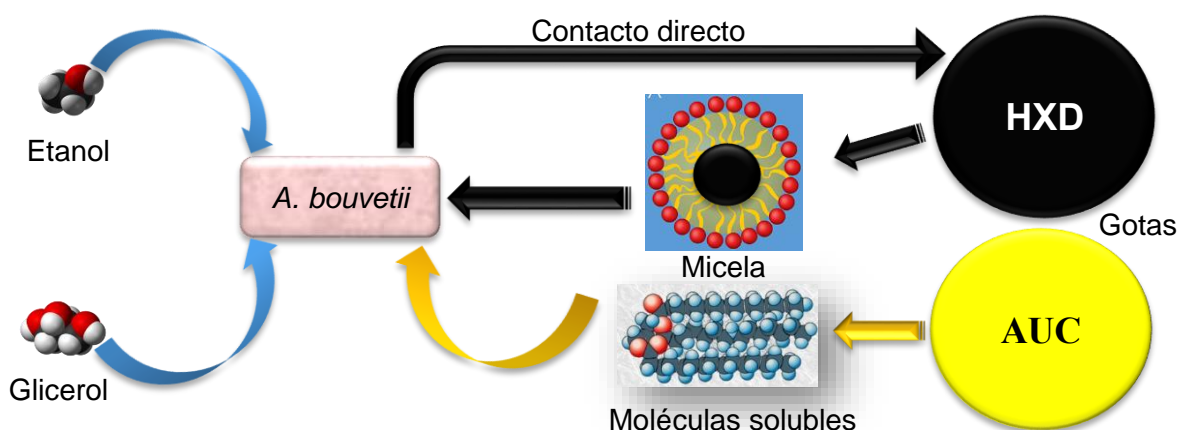


Figura 1. Mecanismos de incorporación de las fuentes de carbono.

La incorporación de la FC mediante contacto directo requiere que el microorganismo cambie su hidrofobicidad, es decir, adquirir un carácter hidrofóbico. De esta manera el microorganismo se puede adherir a las gotas de una FC hidrofóbica y consumirla directamente [44,45]. Por otro lado, la incorporación de FCs mediante formas emulsificadas requiere que el microorganismo que lo incorpora produzca una molécula tensoactiva para emulsificar la FC y así consumirla. Una vez incorporada a la célula, cada FC es consumida mediante diferentes rutas metabólicas.

2.5.2 Rutas metabólicas involucradas en el consumo de las fuentes de carbono

Cada fuente de carbono sigue una ruta específica de consumo (Figura 2). Es importante mencionar que *A. bouvetii* UAM25 no puede metabolizar glucosa [46]. A manera de ejemplo, a continuación, se detallan las rutas metabólicas involucradas en el consumo de las fuentes de carbono que se utilizaron en el presente trabajo: etanol, glicerol, hexadecano y aceite usado de cocina. El etanol es oxidado a ácido acético, posteriormente como acetil-CoA entra al ciclo de Krebs para su completa mineralización. El glicerol se transforma en 3-fosfo-gliceraldehído (G3P), posteriormente se transforma en piruvato y enseguida en acil-CoA. Por otro lado, el hexadecano

se oxida a ácido palmítico que entra a la ruta de la β -oxidación y produce acetil-CoA. El AUC se hidroliza para generar glicerol y ácidos grasos libres. Al realizar un balance energético se determinó que el etanol produce 8 mol ATP (mol C)⁻¹, la mezcla GLI-HXD produce 7.8 mol ATP (mol C)⁻¹ y el AUC produce 20.2 mol ATP (mol C)⁻¹. El balance energético demuestra que el AUC, que generalmente es un desecho del procesamiento de alimentos [41], puede ser aprovechado como una excelente fuente de carbono y energía.

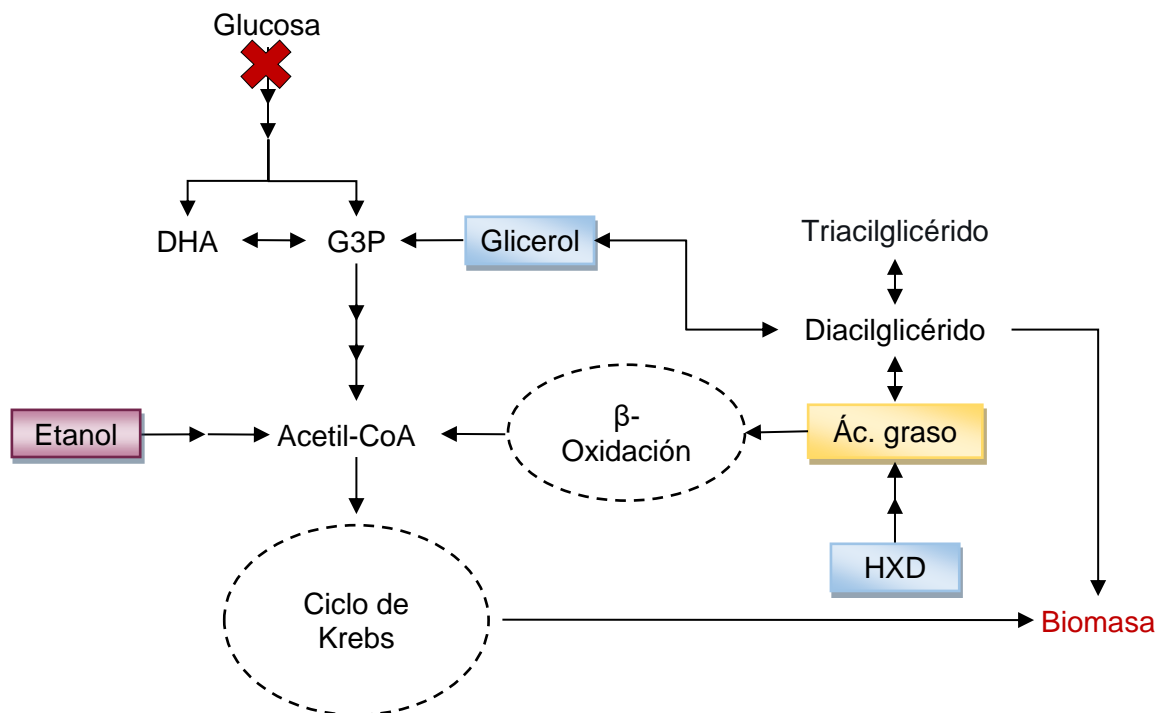


Figura 2. Rutas metabólicas involucradas en el consumo de las fuentes de carbono ensayadas en este trabajo.

El consumo de la fuente de carbono y energía permite que *A. bouvetii* UAM25 pueda sintetizar las moléculas implicadas en las rutas metabólicas involucradas en la producción del BE.

2.5.3 Rutas metabólicas involucradas en la producción de bioemulsificantes

Los BEs de las diferentes especies del género *Acinetobacter* son principalmente exopolisacáridos [47]. Los exopolisacáridos se sintetizan por diferentes rutas metabólicas. Hasta el momento se conocen cuatro mecanismos generales para la producción de exopolisacáridos en bacterias: (i) la denominada ruta dependiente de Wzx/Wzy, (ii) la vía dependiente del transportador de casete de unión a ATP, (iii) la ruta dependiente de sintasa y (iv) la síntesis extracelular mediante el uso de una única proteína sacarasa [48]. En este sentido, se ha propuesto que la ruta de síntesis y transporte del Emulsan podría ser mediante la ruta dependiente de Wzx/Wzy por su analogía con

los polisacáridos capsulares 1 y 4 de *E. coli* [49]. En la ruta dependiente de Wzx/Wzy (Figura 3), primero las glucosiltransferasas transfieren los azúcares al transportador de undecaprenol para formar una unidad de polisacárido en la cara citoplásmica de la membrana interna. Después ocurre la translocación del monómero en la cara periplásmica de la membrana interna mediante un proceso que implica Wzx. Seguida de la polimerización de unidades repetidas a través de la polimerasa Wzy. Wzc regula el proceso de polimerización. Es una autoquinasa cuya desfosforilación está mediada por la fosfatasa afin, Wzb. Por último sucede la exportación del polímero a través de la membrana externa a través del canal compuesto del complejo de proteína Wza [48,49].

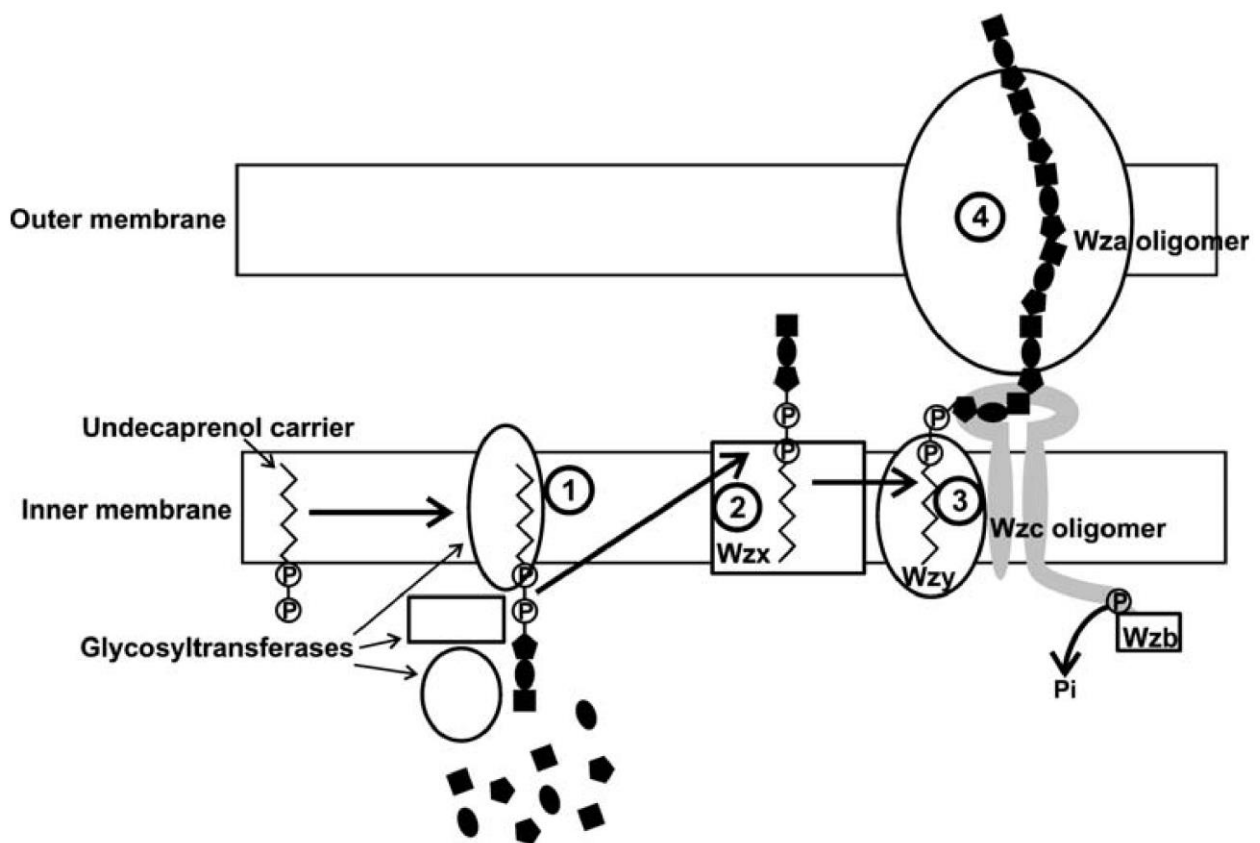


Figura 3. Ruta dependiente de Wzx/Wzy propuesta para la síntesis de Emulsan [49].

Como se puede apreciar, la síntesis de BEs es un proceso complicado que necesita de nutrientes y energía suficientes para lograr buenos rendimientos. De hecho, se ha reportado que la cantidad de BE sintetizado por especies del género *Acinetobacter* fluctúa entre 0.041 y 3.78 g L⁻¹ de cultivo [20,21]. Además, se ha demostrado que las condiciones de cultivo afectan la síntesis de los BEs (la cantidad del BE sintetizado, tasa de producción del BE, el rendimiento producto-sustrato), así como también; las propiedades químicas de los BEs producidos [50]. En consecuencia, cambios

en las propiedades químicas de los BEs podría modificar su aplicación como agente emulsificante de hidrocarburos. Por lo anterior, es importante controlar las condiciones de cultivo en la producción de BEs. La implementación de biorreactores permite controlar las condiciones de cultivo y abre la posibilidad a un escalamiento del proceso [51]. El uso de biorreactores airlift (BALs) puede ser adecuado para la producción de BEs, ya que presentan un entorno de bajo estrés por cizallamiento y una tasa de transferencia de oxígeno razonable, además de un bajo consumo de energía [45,52].

2.6 BIORREACTOR AIRLIFT

Un biorreactor del tipo airlift (BAL) es un reactor agitado neumáticamente por medio del suministro de una fase gaseosa en la parte inferior (Figura 4). La fase gaseosa se expande isotérmicamente dando lugar a la formación de burbujas que ascienden hasta la parte superior de BAL, homogeneizando el contenido del reactor [53].

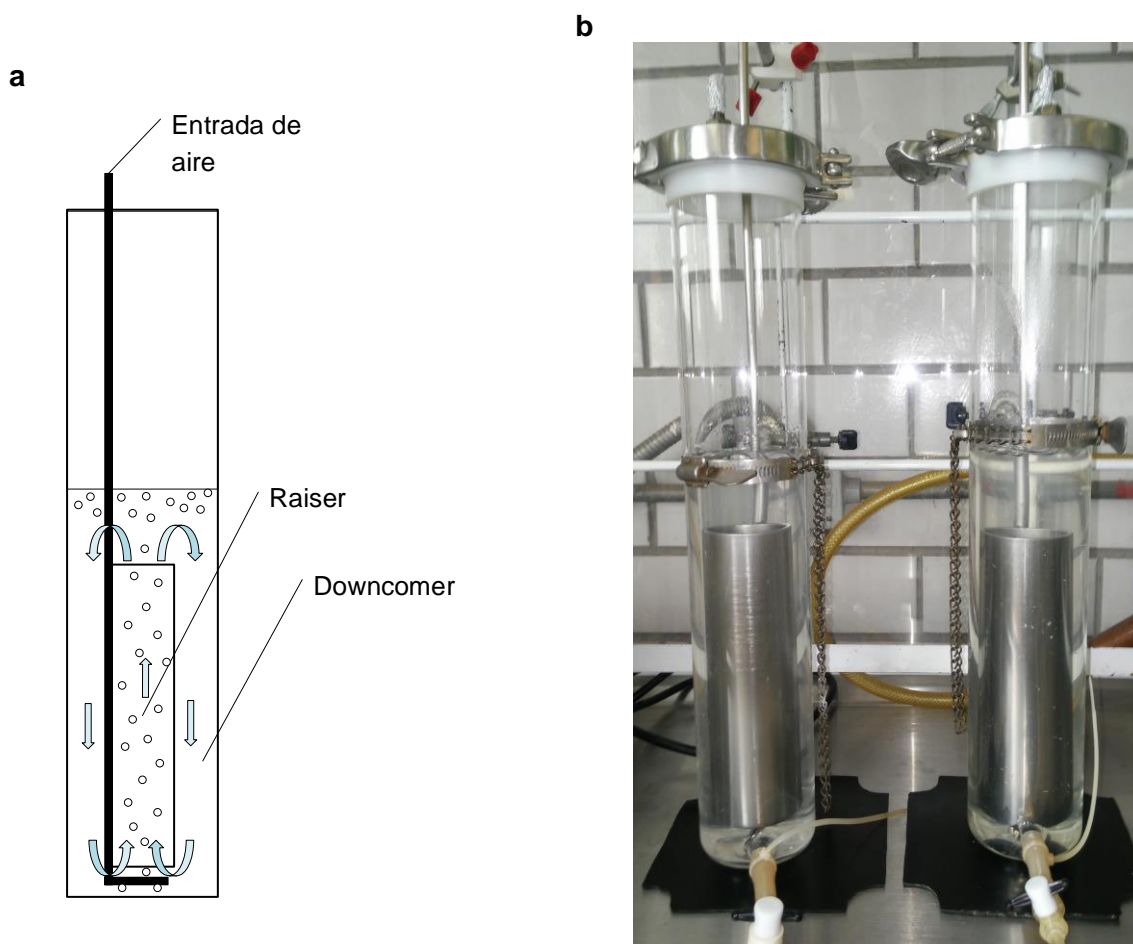


Figura 4. Esquema típico de un biorreactor airlift (a). Biorreactores airlift utilizados en este estudio (b).

Los BAL son utilizados en la producción de ácido láctico, degradación de compuestos fenólicos y la biodesulfuración del petróleo, entre otras aplicaciones. Por otro lado, la comercialización de los BEs se restringe por los altos costos de producción que pueden ser estabilizados por la optimización de las condiciones de producción y la aplicación de nuevos y eficientes pasos intermedios en los métodos de procesamiento. El desarrollo de bioprocesos eficientes y rentables, incluyendo la optimización de las condiciones de cultivo, son factores de estudio riguroso que permiten la reducción de los costos de producción de BEs [54]. En general, en los bioprocesos se han demostrado las ventajas de los biorreactores airlift sobre los biorreactores convencionales (tanque agitado) porque son los que producen un menor daño celular, mejor eficiencia de mezclado y mayores tasas de aireación con un menor consumo de energía [55]. Sin embargo, hay escasa información disponible sobre el crecimiento de microorganismos productores de BEs en BALs [56].

2.6.1 Parámetros cinéticos de producción y de crecimiento

Los estudios cinéticos son necesarios para realizar un correcto diseño y control de biorreactores [12]. Entre los parámetros cinéticos más importantes se encuentran: la tasa de volumétrica de producción (q_p), la tasa máxima específica de crecimiento (μ), la duración de la fase lag (λ), el crecimiento máximo, entre otros. Para estimar estos parámetros cinéticos se han desarrollado distintos modelos matemáticos.

2.6.2 Modelos de crecimiento

Un modelo de crecimiento es una representación abstracta que pretende representar el crecimiento de un microorganismo. Los modelos de crecimiento buscan establecer una correlación de causa efecto entre el tiempo del cultivo y el crecimiento microbiano bajo determinadas condiciones. Los parámetros cinéticos obtenidos como la μ , la λ , la densidad poblacional máxima (A) pueden ser modelados para determinar la influencia que ejerzan otras variables intrínsecas (concentración de FC, concentración de sales) o extrínsecas (temperatura, cambio de escala, etc.) sobre los parámetros cinéticos [57,58]. De esta forma, un modelo de crecimiento permite estimar el crecimiento, la supervivencia y/o la muerte de los microorganismos en función de las condiciones de operación en un biorreactor.

Diversos modelos se han desarrollado con el objetivo de predecir el crecimiento de poblaciones como el modelo Logístico, Gompertz, Richards, entre otros [57,58]. Sin embargo, estos modelos no son explícitos en términos de los parámetros cinéticos antes mencionados (μ , λ , A), lo que dificulta la interpretación física de los valores de los parámetros. Debido a lo anterior, Zwietering

y col. [57], reescribieron varios modelos de crecimiento con el objetivo de compararlos y determinar qué modelo(s) podrían ser usados en su forma reparametrizada tomando como criterio de decisión un razonamiento estadístico. En la Tabla 1 se enlistan algunos de los modelos que se reparametrizaron en el estudio antes mencionado [57]. En dicho estudio se concluyó que todas las curvas de crecimiento evaluadas se ajustaron mejor con el modelo de Gompertz en comparación con los demás modelos ajustados.

Tabla 1. Modelos de crecimiento y sus formas modificadas [57].

Modelo	Ecuación	Ecuación modificada
Logístico	$y = \frac{a}{1 + e^{(b-cx)}}$	$y = \frac{A}{1 + e^{\frac{4\mu}{A}(\lambda-t)+2}}$
Gompertz	$y = ae^{-e^{(b-cx)}}$	$y = Ae^{-e^{\left(\frac{\mu e}{A}(\lambda-t)+1\right)}}$
Richards	$y = a \left(1 + ve^{k(\tau-x)}\right)^{\frac{-1}{v}}$	$y = A \left(1 + ve^{1+v} e^{\frac{\mu}{A}(1+v)\left(1+\frac{1}{v}\right)(\lambda-t)}\right)^{\frac{-1}{v}}$

3 ANTECEDENTES

A continuación, se listan algunos antecedentes indirectos relacionados con el tema que se desarrolló el proyecto.

- Rosenberg y col. [21] aislaron y caracterizaron el BS de *Arthrobacter* sp. actualmente clasificado como *Acinetobacter venetianus* RAG-1 en el trabajo se describe por primera vez al BS Emulsan.
- Navon-Venezia y col. [23] aislaron y caracterizaron parcialmente por primera vez el BS de *A. radioresistens*, Alasan.
- Kim y col. [59] purificaron y caracterizaron el emulsificante producido por *Acinetobacter* sp. BE-254.
- Barkay y col. [37] demostraron que el Alasan de *A. radioresistens* KA 53 incrementa la solubilización de hidrocarburos y propusieron que la solubilización no depende de la formación de agregados multimoleculares similares a micelas si no a la naturaleza hidrofóbica de las moléculas de Alasan.
- Su y col. [8] optimizaron la producción de Emulsan generado por *A. venetianus* RAG-1 utilizando etanol como única fuente de carbono y energía.
- Chen y col. [60] aislaron cepas de *Acinetobacter* productoras de biosurfactantes, también optimizaron y estudiaron las propiedades de los biosurfactantes producidos utilizando hexadecano como fuente de carbono.
- Pirog y col. [10] intensificaron la síntesis del BS de *A. calcoaceticus* IMV B-7241 en una mezcla de hexadecano-glicerol.

A continuación, se listan algunos antecedentes directos desarrollados en el Laboratorio de Residuos Sólidos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana:

- Díaz-Ramírez y col. [61] analizaron la degradación de diferentes fracciones de petróleo por cultivos mixtos bacterianos. Los microorganismos fueron aislados de los suelos rizosféricos contaminados con hidrocarburos donde crecía una gramínea: *Cyperus laxus* LAM.
- Medina-Moreno y col. [62] demostraron que los biorreactores columna de burbujas al ser operados en lotes secuenciales y bajo limitación de oxígeno se pueden utilizar para producir consorcios con capacidad de biodegradación alta y constante.

- Lizardi-Jiménez y col. [56] estudiaron las tasas de transferencia de hexadecano y oxígeno para la producción de un consorcio degradador de hidrocarburos en un biorreactor airlift trifásico.
- Tzintzun-Camacho y col. [63] durante el estudio de los mecanismos de asimilación de hexadecano por parte de cultivos mixtos y puros, aislaron e identificaron una cepa de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 como productora de biosurfactante con actividad emulsificante.
- Ortega-de la Rosa y col. [64] evaluaron la factibilidad técnica y económica de la producción del biosurfactante de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 a partir de diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas.
- Vazquez-Vazquez y col. [46] evaluaron la producción del BE de *A. bouvetii* UAM25 a partir de hexadecano y determinaron su capacidad como emulsificante de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

4 JUSTIFICACIÓN

Recientemente, se ha observado un creciente interés por la producción de BEs debido a sus aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, petrolera y en la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos. Tzintzun-Camacho y col. [63] demostraron que la especie *Acinetobacter bouvetii* UAM25 es capaz de producir BEs. Durante el estudio que se realizó en la Maestría en Biotecnología [64], la principal aportación fue demostrar la factibilidad técnica y económica de la producción del BE de *A. bouvetii* UAM25 utilizando fuentes de carbono hidrofóbicas; se estudió por primera vez el BE producido por *A. bouvetii* UAM25 y se determinó que es un BE de carácter aniónico. Además, con un modelo matemático que se propuso fue posible determinar las condiciones necesarias para reducir al mínimo el costo de producción del BE con diferentes FCs. De este trabajo, surge la interrogante de que si el cambio de la fuente de carbono pudiera modificar la estructura molecular del BE reflejada en una diferente actividad emulsificante. Otra cuestión que surge es cómo se modifica la producción y las propiedades emulsificantes del BE de *A. bouvetii* UAM25 a partir de una FC hidrofílica como el etanol. Además, qué características del BE se modificarían si se produce a partir de una combinación de FCs hidrofílicas e hidrofóbicas (glicerol-hexadecano). Para resolver estas preguntas fue necesario producir, purificar y caracterizar los BEs producidos a partir de diferentes FCs, así como evaluar la estabilidad como agentes emulsificantes de hidrocarburos. Un análisis de los resultados debería contribuir al entendimiento del fenómeno y constituirse en una aportación al conocimiento científico, sin perder de vista aquellas posibles aplicaciones en: (i) la industria petrolera como, por ejemplo, mejorando la movilidad y solubilidad del petróleo pesado o (ii) en la biorremediación de suelos y aguas contaminados con compuestos orgánicos hidrofóbicos.

5 HIPÓTESIS

Acinetobacter bouvetii UAM25 producirá BEs estables con diferente actividad emulsificante a partir de distintas fuentes de carbono.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la FC que consume *A. bouvetii* UAM25 sobre las características de los BEs producidos.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Determinar parámetros cinéticos de producción de los BEs de *A. bouvetii* UAM25 a partir de etanol, una mezcla de glicerol-hexadecano y aceite usado de cocina en botellas serológicas y en biorreactor airlift (1 L).
- ☞ Caracterizar químicamente los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25.
- ☞ Evaluar la estabilidad de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos se planteó la siguiente estrategia experimental:

7.1 PRIMERA ETAPA

Se montaron cinéticas de producción de los BEs de *A. bouvetii* UAM25 a partir de etanol, aceite usado de cocina y una mezcla glicerol-hexadecano en botellas serológicas y en biorreactor airlift. A partir de los datos experimentales se evaluaron los parámetros cinéticos que corresponden a la producción y al crecimiento celular. Además, se determinó la capacidad emulsificante de los sobrenadantes libres de células.

7.2 SEGUNDA ETAPA

Se purificaron de los BEs y se realizó una caracterización química (contenido de carbohidratos y proteínas, tensión superficial, peso molecular, análisis elemental, composición de grupos funcionales). Además, se evaluó la estabilidad de los BEs purificados.

7.3 TERCERA ETAPA

Se realizó un análisis de los resultados obtenidos para determinar el efecto de la FC sobre los BEs producidos.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO

8.1.1 Microorganismo

Se utilizó la bacteria *Acinetobacter bouvetii* (cepa UAM25). La cepa fue aislada de la rizósfera de *Cyperus laxus* LAM, una planta nativa de pantanos contaminados con petróleo en Veracruz, México [61]. *A. bouvetii* fue identificada mediante un análisis del gen 16s rDNA [63].

8.1.2 Medios de cultivo

La preservación y propagación de la cepa se realizó con agar soya tripticaseína (Bioxon) y caldo nutritivo (Bioxon). Para la producción de los BEs se utilizó medio mineral (MM) con la siguiente composición (g L^{-1}): 3.187 de NaNO_3 (J. T. Baker, 99.9%), 1.075 de K_2HPO_4 (J. T. Baker, 99.9%), 0.565 de KCl (J. T. Baker, 99.9%) y 0.55 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker, 100.1%), el MM se ajustó a un pH inicial de 6.0 con HCl 1.0 M [62].

8.1.3 Activación de *A. bouvetii*

La bacteria se inoculó por picadura en matraces Erlenmeyer de 150 mL con 25 mL de caldo nutritivo. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 200 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific, USA) [63]. Después de 24 h se tomaron 0.5 mL del cultivo, se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 1.5 mL y se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de la dilución. La concentración de *A. bouvetii* UAM25 fue determinada con una curva patrón en unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} .

8.2 FUENTES DE CARBONO

Se utilizaron tres diferentes fuentes de carbono y energía: (i) etanol (J. T. Baker, 99%) en una concentración inicial de 10.58 g L^{-1} ; (ii) una mezcla de glicerol (J. T. Baker, 99%) y n-hexadecano (Sigma Aldrich, 99%) en una concentración inicial de 8.00 y 2.81 g L^{-1} , respectivamente (Relación molar 7:1) y (iii) aceite usado de cocina (AUC) en una concentración inicial de 7.11 g L^{-1} . Antes de su uso el AUC se dejó reposar por 48 h, posteriormente se decantó y se filtró con papel Whatman (Grado 1). El AUC filtrado se conservó en un recipiente herméticamente cerrado de vidrio (1 L) a temperatura ambiente (25 °C) y en oscuridad. Las fuentes de carbono que se ensayaron para la producción de los BEs de *A. bouvetii* se adicionaron siempre en una relación carbono/nitrógeno (C/N) aproximada de $10.5 \text{ g C g}^{-1} \text{ N}$.

8.3 PRODUCCIÓN DE LOS BIOEMULSIFICANTES

8.3.1 Cinéticas de producción en botellas serológicas

Las cinéticas de producción de BEs se realizaron en botellas serológicas de 150 mL con 50 mL de medio mineral inoculadas con 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *A. bouvetii* UAM25 [63]. Cada muestra para cada tiempo se ensayó por triplicado con botellas serológicas independientes.

8.3.2 Cinéticas de producción en biorreactor airlift

La producción de los BEs de *A. bouvetii* se realizó en un biorreactor airlift (BAL), integrado por una columna vertical de vidrio de 2 L, con un diámetro externo de 0.077 m y un diámetro interno de 0.072 m, un tubo concéntrico de acero inoxidable con diámetro interno de 0.041 m y altura de 0.204 m. Se utilizó un distribuidor de aire construido de acero inoxidable en forma de "L" (0.006 m de diámetro interno) con 7 perforaciones (0.001 m de diámetro y 0.004 m de separación) [65]. Los BAL se operaron por lotes a una velocidad superficial de gas (U_g) de 0.6 cm s⁻¹ durante 48 h a 30 °C. Cada fuente de carbono se ensayó por duplicado con un volumen de operación de 1 L, con el MM antes mencionado (ver 8.1.2) y un inóculo inicial 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *A. bouvetii* [63]. Se realizaron pruebas para: (i) producción de BEs y cinética de crecimiento microbiano: se tomaron 10 mL de medio de cultivo del ALB en cada tiempo de muestreo, una vez que se concluyó la cinética, se desechó el medio restante; y (ii) purificación de BEs: después de 48 horas de cultivo en el ALB, todo el caldo se usó para la purificación.

8.3.3 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante (AE) se determinó en el sobrenadante libre de células (10 000 g, 4 °C, 20 min). A 400 µL de muestra se agregaron 2.6 mL de Tris-HCl (20 mM, pH 7.0) con MgSO₄ (10 mM), enseguida se agregó 40 µL de mezcla n-hexadecano:2-metilnaftaleno 1:1 (v:v) [5]. Por último, se agitó por 2 min y se leyó la densidad óptica a los 3 min a 600 nm. Una absorbancia de 0.1 unidades a 600 nm multiplicada por el factor de dilución fue considerado como una unidad emulsificante por mL (UE mL⁻¹).

8.3.4 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se determinó por el método de cuenta viable (CV) en UFC mL⁻¹ mediante la técnica de dilución en placa. Las diluciones correspondientes se inocularon en agar soya tripticaseína y se incubaron a 30 °C. A las 48 h se realizó el conteo de las UFC.

La biomasa de *A. bouvetii* se determinó por peso seco. Se separó la biomasa de 1 L de medio de cultivo por centrifugación a 10 000 g, 4 °C por 30 min [66], la pastilla de biomasa se suspendió

en agua destilada y se secó en un horno de temperatura controlada (24 h, 60 °C). Posteriormente se pesó la biomasa en una balanza analítica OHAUS *Pioneer* (OHAUS, EUA).

8.3.5 Parámetro cinético de producción

La tasa volumétrica de producción (UE (mL h)⁻¹, q_p) fue calculada usando la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$q_p = \frac{EA_{\max}}{t_f}$$

Donde AE_{\max} es la actividad emulsificante máxima (UE mL⁻¹) y t_f es el tiempo de cultivo (48 h).

8.3.6 Modelo de crecimiento y parámetros cinéticos de crecimiento

Los parámetros de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 se determinaron ajustando el modelo reparametrizado de Gompertz que se muestra en la Ecuación 2 [57].

Ecuación 2

$$y = Ae^{-e^{\left(\frac{\mu e}{A}(\lambda - t) + 1\right)}}$$

Donde $y = \ln\left(\frac{CV}{VC_0}\right)$, A es la asíntota definida como $A = \ln\left(\frac{CV_{\max}}{VC_0}\right)$, μ es la tasa máxima específica de crecimiento (h⁻¹), λ es la duración de la fase lag (h), t es el tiempo (h), VC es el crecimiento al tiempo t (UFC mL⁻¹), VC_0 es el crecimiento inicial o inóculo (UFC mL⁻¹) y VC_{\max} es el crecimiento máximo (UFC mL⁻¹)

8.3.7 Consumo de aceite usado de cocina

El AUC residual se extrajo del sobrenadante libre de células (50 mL, 10 000 g, 4 °C, 20 min) con 50 mL de hexano-acetona 1:1 (v:v). La fase orgánica se transfirió a un matraz de reacción donde se eliminó el hexano remanente en un equipo de evaporación rotavapor (40 °C, 450 mbar) (Büchi R-205). Enseguida se agregaron 6 mL de una solución de NaOH 0.5 M en metanol y perlas de ebullición. Se conectó un condensador y se calentó la mezcla en baño de agua hasta que la grasa entró en solución. Posteriormente se agregaron 7 mL de una solución de BF₃ al 14 % (p/v) en metanol a través del condensador y se mantuvo en ebullición durante 2 min. Enseguida se agregaron 2 mL de hexano y se mantuvo a ebullición por un minuto más. El matraz de reacción se desmontó y se dejó enfriar en un baño de hielo; a continuación, se agregaron 15 mL de solución saturada de NaCl, el matraz se tapó y se agitó vigorosamente por 15 s. Después se agregó suficiente solución saturada de NaCl para que el hexano con los ésteres metílicos se

colocara en el cuello del matraz. Se transfirieron 2 mL de la solución hexano en un tubo de ensayo y se agregaron 50 mg de sulfato de sodio anhidro [67].

La solución de hexano seca con los ésteres metílicos sintetizados a partir del AUC se analizaron en un cromatógrafo de gases 5890N acoplado a un detector selectivo de masas 5975B VL (Agilent Technologies). Un μL de esta solución fue inyectado. La separación de los ésteres se obtuvo con una columna capilar 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) manteniendo el flujo constante a 1 mL min^{-1} (12.75 psi). La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 280 °C, con helio como gas acarreador. La temperatura inicial del horno fue de 150 °C, posteriormente se elevó a 210 °C con una rampa de 10 °C min^{-1} y por último hasta 270 °C con una rampa de 5 °C min^{-1} [68]. La temperatura de la interfase se mantuvo a 290 °C. Los resultados espectrométricos fueron obtenidos mediante el modo de adquisición SCAN, en un rango de masas de 10 a 300 UMA, con una energía de ionización de 70 eV. La identificación de ésteres metílicos se realizó a través de la librería NIST05a. El rendimiento de la reacción de transesterificación se realizó mediante un estándar externo (miristato de metilo) grado analítico por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo mediante estándares grado analítico de los ésteres metílicos encontrados, con curvas de calibración de 5 puntos

8.3.8 Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno

El coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) se estimó con experimentos en las botellas serológicas mediante la Ecuación 3 [69].

Ecuación 3

$$k_La = 16.610n^{1.087} \left(\frac{A}{V} \right)^{0.872}$$

Donde k_La es el coeficiente de transferencia de oxígeno (h^{-1}), n es la frecuencia de agitación (s^{-1}), A es el área superficial del líquido en el frasco inmóvil (cm^2), y V es el volumen de llenado (cm^3).

El k_La en el BAL se determinó por el método dinámico utilizando un electrodo de oxígeno disuelto (ADI dO₂, Applisens) [56].

8.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOEMULSIFICANTES

8.4.1 Purificación de los bioemulsificantes

El bioemulsificante producido en los BALs (ver 8.3.2) se purificó de la siguiente forma: las células se eliminaron por centrifugación (10,000 g , 4 ° C, 20 min) [66]. Se añadieron dos litros de isopropanol (J. T. Baker, 99%) al sobrenadante libre de células para la precipitación del BE. El

BE se recolectó luego por centrifugación (10,000 g, 4 ° C, 5 min), se suspendió en 100 mL de agua destilada y se liofilizó para conservar el producto [50]. Cien miligramos de producto liofilizado (BE crudo), se suspendieron en 100 mL de agua destilada y se ultrafiltraron con un sistema de célula agitada usando una membrana de ultrafiltración de corte Omega polietersulfona de 30 kDa (PALL, EE. UU.). Se inyectó aire en el sistema después de pasar a través de una membrana de politetrafluoroetileno (20 µm) a 10 psi. Se realizó una diafiltración discontinua, de modo que se diluyó repetidamente hasta el volumen original (100 mL), usando agua destilada hasta que la conductividad de la solución filtrada fue menor que 0.05 mS cm⁻¹ [46].

8.4.2 Carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se determinaron mediante el método fenol-sulfúrico [70]. A 1.0 mL de muestra se adicionaron 0.5 mL de una solución de fenol al 5.0 %. Se homogeneizó y se agregaron 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se homogeneizó cuidadosamente y se dejó en reposo durante 15 min. Por último, se leyó la densidad óptica 480 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración de 5 puntos utilizando glucosa anhidra (J. T. Baker, 99.9%) como patrón de referencia.

8.4.3 Proteína soluble

La proteína soluble se determinó por el método de Bradford [71]. A 160 µL de muestra se agregaron 40 µL de reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad). Se homogeneizó y se dejó en reposo durante 5 min. Por último, se leyó la densidad óptica 582 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración de 5 puntos utilizando albumina sérica bobina (J. T. Baker, 99.9 %) como patrón de referencia.

8.4.4 Tensión superficial

La tensión superficial de los sobrenadantes libres de células se determinó con un tensiómetro de burbuja SensaDyne QC6000 (Chem-Dyne Research Corporation, EE. UU.), Usando agua y etanol como referencia (25 °C).

8.4.5 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Las distribuciones de peso molecular de los BEs purificados (5 mg) se obtuvieron usando un cromatógrafo de líquidos serie Agilent 1260 equipado con detector de índice de refracción y dos columnas de PL aquagel-OH (Waters, EE. UU.). En series colocadas en un termostato a 25 °C y calibrado con patrones de polietilenglicol (PEG) (Agilent, EE. UU.). Se utilizó agua desionizada (Milli-Q-UV, Merck) como fase móvil a 0.8 mL min⁻¹ de flujo. Las muestras se disolvieron en la fase móvil y se filtraron (filtro de 0.45 µm) antes de la inyección en el cromatógrafo.

8.4.6 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se registraron usando un espectrómetro Spectrum RXI (Perkin Elmer, EE. UU.) en discos KBr (1:100 p/p) en el intervalo de longitud de onda de 4,000 - 400 cm^{-1} .

8.4.7 ^1H análisis de RMN

Los espectros de ^1H NMR de los BEs purificados se registraron usando un espectrómetro de unidad 9.4 T MR (Varian, EE. UU.) a 400 MHz usando agua deuterada como disolvente. El desplazamiento químico de $^2\text{H}_2\text{O}$ fue a 5.79 ± 0.01 ppm.

8.4.8 Análisis elemental

Los contenidos totales de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de los BEs purificados se determinaron usando un analizador elemental 2400 (Perkin Elmer, EE. UU.).

8.5 ESTABILIDAD DE LOS BIOEMULSIFICANTES

Los estudios de estabilidad se realizaron usando soluciones de BEs purificados en agua destilada (500 mg L^{-1}). Para la estabilidad salina, las soluciones de los BEs se suplementaron con diferentes concentraciones de NaCl (de 10, 20, 40 y 50 g L^{-1}). Para la estabilidad a cambios de pH, el pH de cada solución de BE se ajustó a 3, 5, 7, 9 y 10 mediante la adición de HCl 2 M o NaOH 2 M con homogeneización suave. Para la estabilidad a cambios de temperatura, las soluciones de los BEs se mantuvieron a 40, 60, 80 y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, y luego se colocaron a temperatura ambiente (alrededor de $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Se usó una solución de cada BE ($0 \text{ g de NaCl L}^{-1}$, pH 7.0 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$) como control. Se determinó la actividad emulsificante (EA) cada una de las soluciones de los BEs. La actividad emulsificante relativa (EA_R) se calculó de la siguiente manera:

Ecuación 4

$$EA_R = \frac{EA_T}{EA_C}$$

Donde EA_T es la actividad emulsificante del tratamiento y EA_C es la actividad emulsificante de su control.

8.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El algoritmo de estimación de Levenberg-Marquardt se utilizó para el ajuste no lineal del modelo de Gompertz reparametrizado. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se realizaron pruebas t para comparar dos medias de grupos independientes ($\alpha = 0.05$). ANOVA y comparaciones múltiples versus el grupo de control (método de Dunnett) se

realizaron para los estudios de estabilidad ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se analizó con el software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, 2011).

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE LOS BIOEMULSIFICANTES

La mayoría de los microorganismos productores de BEs utilizan FC hidrofóbicas para su crecimiento. Sin embargo, *Acinetobacter venetianus* RAG-1 no sólo crece en una variedad de FC hidrofóbicas, sino que también produce BE a partir de FC hidrofílicas [8]. Para determinar la capacidad de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 para producir BEs, se ensayaron cinéticas de producción de BE con una FC hidrofílica (etanol), una hidrofóbica (aceite usado de cocina) y una mezcla de ambas (glicerol-hexadecano) en botellas serológicas.

9.1.1 Cinéticas de producción de los bioemulsificantes en botellas serológicas

Las cinéticas de producción de los BEs de *A. bouvetii* UAM25 en botellas serológicas se muestran en la Figura 5. Se observó que *A. bouvetii* UAM25 produjo BEs a partir de las tres FCs y energía ensayadas. La Figura 5 muestra que la actividad emulsificante (AE), una medida indirecta de la producción del BE, se incrementó conforme el crecimiento bacteriano. Estos resultados son consistentes con lo observado con la producción de Emulsan [8] y con el comportamiento de un metabolito primario [6]. La mayoría de las producciones de BEs se han reportado como asociadas al crecimiento [72]. La AE permaneció constante durante la fase estacionaria de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25, lo cual indicó que la producción de los BEs se terminó. Por lo tanto, la producción de los BEs fue ligada al crecimiento sin importar la FC empleada.

Los parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 fueron estimados a partir de los datos experimentales (Tabla 2). El crecimiento máximo (UFC_{max}) fue similar sin importar la naturaleza de la FC y energía ensayada. Además, se observó que la actividad emulsificante máxima ($AE_{max} = 22.1 \pm 1.8 \text{ UE mL}^{-1}$), la tasa volumétrica de producción ($q_p = 0.46 \pm 0.04 \text{ UE (mL h)}^{-1}$) y la tasa específica de crecimiento máxima ($\mu = 0.58 \pm 0.09 \text{ h}^{-1}$) fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) cuando la FC ensayada fue aceite usado de cocina (AUC). Estudios en producción de BSs han demostrado que el uso de aceites vegetales usados como FCs mejoran su producción [73–75]. Este resultado se puede explicar debido a que el AUC es la fuente de carbono con mayor rendimiento energético ($20.2 \text{ mol ATP (mol C)}^{-1}$, ver 2.5.2) por lo que *A. bouvetii* UAM25 tuvo a su disposición mayor energía para crecer y producir el BE.

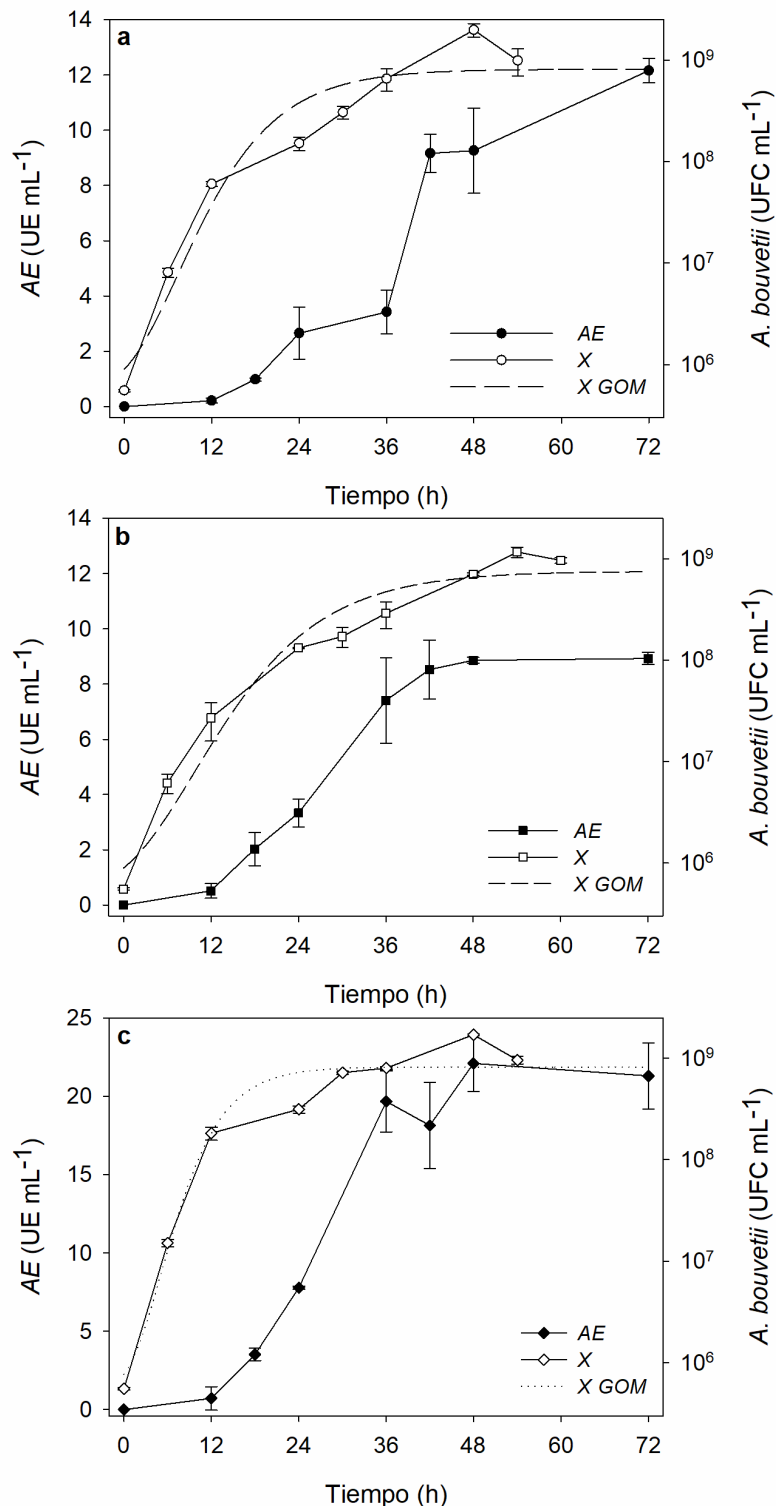


Figura 5. Cinéticas de producción de los bioemulsificantes (●, ■, ◆) y de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 (○, □, ◇) en botellas serológicas con tres diferentes fuentes de carbono: Etanol (a), una mezcla de glicerol-hexadecano (b) y aceite usado de cocina (c). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas independientes y las barras indican la desviación estándar.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento estimados en botellas serológicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba Tukey).

Fuente de C	EA_{max}	q_p	UFC_{max}	μ
	UE mL ⁻¹	UE (mL h) ⁻¹	UFC mL ⁻¹	h ⁻¹
<i>Etanol</i>	9.3 ± 1.5 ^b	0.19 ± 0.03 ^b	2.0 ± 0.3 × 10 ⁹	0.36 ± 0.07 ^b
<i>Glicerol-Hexadecano</i>	8.9 ± 0.1 ^b	0.18 ± 0.01 ^b	1.2 ± 0.1 × 10 ⁹	0.27 ± 0.04 ^b
<i>AUC</i>	22.1 ± 1.8 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	1.7 ± 0.1 × 10 ⁹	0.58 ± 0.09 ^a

EA_{max} , actividad emulsificante máxima; q_p , tasa volumétrica de producción; CFU_{max} , crecimiento máximo; μ , tasa específica de crecimiento máxima. Los resultados expresan la estimación ± el error estándar.

Estudios sobre producción de BEs han reportado diferentes valores de μ , por ejemplo; *Agrobacterium* strain C58C1 pTFS40 creciendo en medios definidos a base de sacarosa exhibió una μ de 0.27 h⁻¹ [76]. Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 creció en aceite de girasol con una μ de 0.16 h⁻¹ [77], *Acinetobacter venetianus* RAG-1 en etanol creció con una μ de 0.2 h⁻¹ [8] y *Acinetobacter baylyi* ADP1 con glucosa presentó una μ de 0.30 h⁻¹ [78]. Tomando estos reportes como referencia, la μ de *A. bouvetii* UAM25 fue similar o mayor que otras especies que representen el género *Acinetobacter*. Esta capacidad demuestra el potencial metabólico de *A. bouvetii* UAM25 para consumir diferentes fuentes de carbono.

Varios estudios han demostrado la capacidad de las especies de *Acinetobacter* para consumir FCs hidrofílicas, hidrofóbicas o mezclas de ambas fuentes de carbono para la producción de BEs [8,10,11]. Sin embargo, pocos reportes han realizado estudios cinéticos de crecimiento y producción de BEs [12]. Además, existen pocas publicaciones sobre producción de BEs en biorreactores. Por lo tanto, los estudios de producción de BEs en biorreactores también son necesarios para ampliar el conocimiento sobre la producción de BEs y esto permita el desarrollo de tecnologías que logren llevar su producción a una mayor escala.

9.1.2 Cinéticas de producción de los bioemulsificantes en biorreactores airlift

Con el objetivo de contribuir con el estudio de la producción de BEs en biorreactores, se realizaron cinéticas de producción de los BEs de *A. bouvetii* UAM25 en BAL de un litro de operación. En la Figura 6 se muestra la AE y el crecimiento bacteriano, durante 48 h, con las tres FC ensayadas. Se observó que la producción de los BEs de *A. bouvetii* UAM25 estuvo ligada al crecimiento, resultado similar al observado en experimentos previos en botellas serológicas (ver Figura 5). Además, se observó AE desde las primeras horas de cultivo (0 – 24 h), lo que indicó una liberación temprana del BE. Es probable que la hidrodinámica presente en el BAL haya favorecido dicha liberación del BE.

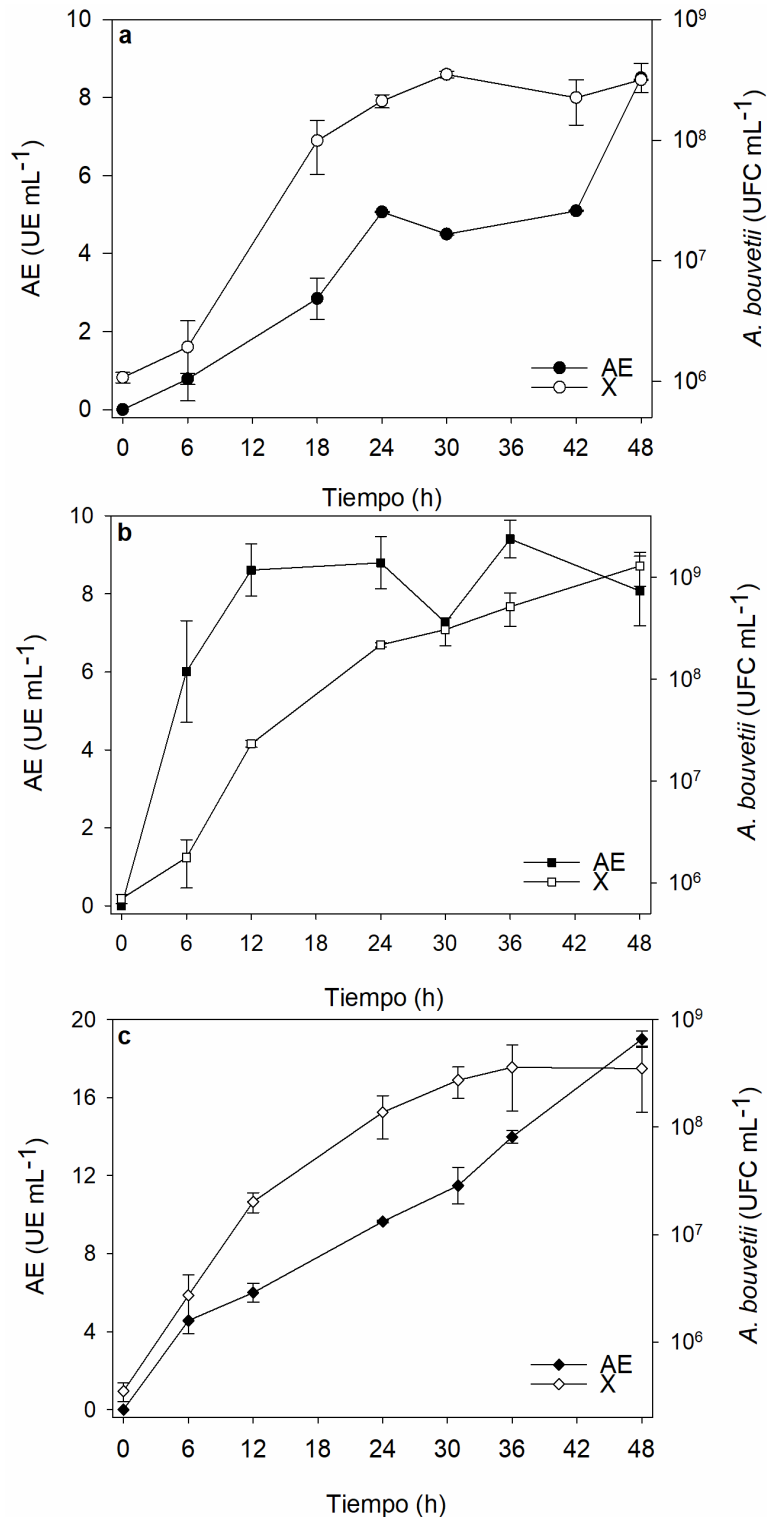


Figura 6. Cinéticas de producción de los bioemulsificantes (●, ■, ◆) y de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 (○, □, ◇) en biorreactores airlift con tres diferentes fuentes de carbono: Etanol (a), una mezcla de glicerol-hexadecano (b) y aceite usado de cocina (c). Cada punto representa el valor promedio de dos réplicas independientes y las barras indican la desviación estándar.

A partir de las cinéticas de producción de los BEs en BAL se estimaron los parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 (Tabla 3). Vale la pena señalar que el BE producido con AUC mostró mayor EA_{max} , (19.0 ± 0.4 EU mL⁻¹) y mayor q_p (0.40 ± 0.01 UE (mL h)⁻¹) en comparación con los BEs producidos con etanol y con la mezcla glicerol-hexadecano. Estos resultados fueron similares a los observados en botellas serológicas. En estos experimentos, la μ y la producción de biomasa (X) fueron similares con las tres FCs ensayadas en el BAL. Estos resultados indicaron que: (i) la producción de BE fue mayor cuando la FC fue AUC y (ii) el potencial metabólico de *A. bouvetii* UAM25 para consumir FCs hidrofílicas e hidrofóbicas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de producción de los BEs y de crecimiento estimados en BAL. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba Tukey).

Fuente de carbono	AE_{max}	q_p	UFC_{max}	μ	X
	UE mL ⁻¹	UE (mL h) ⁻¹	UFC mL ⁻¹	h ⁻¹	mg
Etanol	8.5 ± 0.4^b	0.18 ± 0.01^b	$3.2 \pm 0.1 \times 10^8$	0.42 ± 0.05	80 ± 25
Glicerol-HXD	9.4 ± 0.5^b	0.20 ± 0.01^b	$12.9 \pm 4.7 \times 10^8$	0.31 ± 0.04	103 ± 5
AUC	19.0 ± 0.4^a	0.40 ± 0.01^a	$3.5 \pm 2.1 \times 10^8$	0.38 ± 0.04	87 ± 12

EA_{max} , actividad emulsificante máxima; q_p , tasa volumétrica de producción; CFU_{max} , crecimiento máximo; μ , tasa específica de crecimiento máxima. Los resultados expresan la estimación \pm el error estándar. Los resultados de biomasa expresan el promedio \pm la desviación estándar.

9.1.3 Potencial de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 como productora de bioemulsificantes

A. bouvetii UAM25 no crece con glucosa como única fuente de carbono (FC) y energía [64]. Sin embargo, es capaz de crecer con petróleo crudo maya, aceite lubricante usado, aceite de ricino, AUC [64], etanol y glicerol-HXD como únicas FCs y energía. Lo anterior demostró el potencial metabólico de *A. bouvetii* UAM25 para consumir diferentes FCs. En el presente estudio y en el realizado para obtener el grado de maestría [64], el AUC fue la FC en la que se observó mayor AE. Por lo que resulta de gran interés determinar qué compuestos presentes en el AUC consume *A. bouvetii* UAM25 para producir el BE. Durante las cinéticas de producción del BE a partir de AUC se evaluó la variación de ésteres metílicos residuales producidos como metabolitos intermediarios que fueron determinados durante la cinética de producción del BE a partir de AUC (Figura 7a). El oleato de metilo se cuantificó en 6.7 ± 0.4 g L⁻¹ a las 6 h y disminuyó a 3.2 ± 0.1 g L⁻¹. El linoleato de metilo se determinó en 5.0 ± 0.3 g L⁻¹ las 6 h y disminuyó a 2.3 ± 0.1 g L⁻¹. El palmitato de metilo en 1.2 ± 0.1 g L⁻¹ las 6 h y disminuyó a 0.6 ± 0.04 g L⁻¹. El estearato de metilo en 0.8 ± 0.02 g L⁻¹ las 6 h y disminuyó a 0.4 ± 0.02 g L⁻¹. Los resultados anteriores indicaron que *A. bouvetii* UAM25 fue capaz de consumir todos los ácidos grasos procedentes del AUC utilizado.

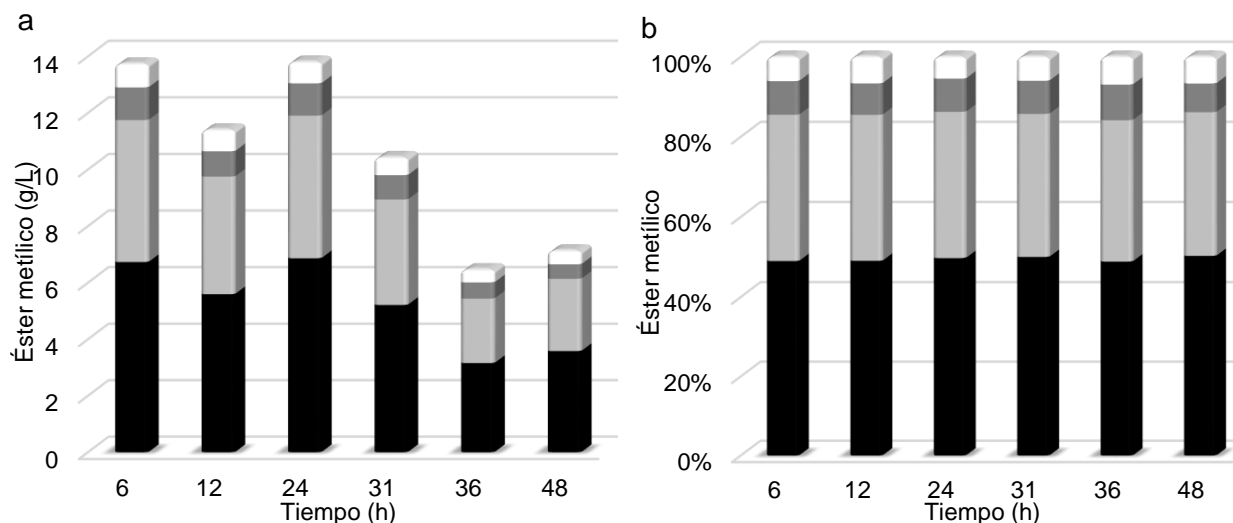


Figura 7. Variación de ésteres metílicos residuales (a) y su distribución porcentual (b) durante la cinética de producción del BE a partir de AUC. Oleato de metilo (■), linoleato de metilo (■), palmitato de metilo (■) y estearato de metilo (□). Valor promedio de 2 repeticiones.

En la Figura 7b se observa la distribución porcentual de los ésteres metílicos durante la cinética de consumo de AUC, cabe resaltar que la proporción de ésteres metílicos se mantuvo constante durante la cinética, lo que sugiere que *A. bouvetii* asimiló de manera indistinta los ácidos grasos procedentes en el AUC utilizado. Los resultados anteriores sugieren que *A. bouvetii* UAM25 tuvo la capacidad metabólica para consumir ácidos grasos saturados e insaturados de forma indistinta.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la cinéticas de producción de los BEs en botella serológica y en el BAL fueron similares (ver Tabla 2 y Tabla 3). La AE_{max} y la q_p fueron iguales con todas las FCs y el cambio al biorreactor no tuvo efecto ($P > 0.05$). Las UFC_{max} en el BAL con etanol y AUC fueron menores que en botella serológica ($P < 0.05$). También, la μ en el BAL con AUC fue menor que en botella serológica ($P < 0.05$). Estas diferencias no fueron tan importantes, como se esperaba, si se toma en cuenta las diferencias que existen entre la hidrodinámica de ambos sistemas de producción.

Un fenómeno que siempre es importante evaluar en el crecimiento de microorganismos aerobios es la transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase acuosa [56,69]. El coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) es usado para comparar la eficiencia de transporte de oxígeno en un biorreactor. El K_{La} en botellas serológicas bajo las condiciones de cultivo ensayadas (MM, $n = 200 \text{ min}^{-1}$, $A = 21.24 \text{ cm}^2$, $V = 50 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$) se estimó en 29.14 h^{-1} [69] y en el BAL (MM, $Ug = 0.6 \text{ cm s}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$) se determinó en $10.49 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Es decir, el K_{La} en el BAL fue aproximadamente tres veces menor al K_{La} en las botellas serológicas, el crecimiento del *A. bouvetii* UAM25 fue ligeramente menor en el BAL ($P < 0.05$) pero la producción de BEs fue similar

en ambos biorreactores ($P > 0.05$). Estos resultados sugieren que el transporte de oxígeno desde la fase gas hasta la fase líquida no afectó la producción de BEs.

Antes de proponer una explicación a la anterior observación, es importante mencionar que *A. bouvetii* UAM25 formó biopelícula en todos los medios (sólidos y líquidos) y biorreactores (caja Petri, matraces y BALs) que fueron utilizados en este estudio. Las biopelículas son agregados bacterianos adheridos a una superficie o interfase y recubiertos de una matriz abundante de sustancias poliméricas extracelulares [79]. Al formar una biopelícula, las células bacterianas son capaces de controlar la permeabilidad de la biopelícula y se producen fenómenos hidrodinámicos y de convección-difusión acoplados sumamente complejos [80,81]. Esta capacidad de regular la absorción de gases y sustancias químicas provoca una barrera para el transporte de nutrientes desde la fase líquida hasta las células de la biopelícula [82,83]. Esto implica que el transporte de oxígeno desde la fase gas hasta la fase líquida deja de ser el paso que limita la transferencia de oxígeno [80]. Lo anterior podría explicar las similitudes observadas en cuanto al crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 y la producción de BEs en matraces y BALs. Es probable que, independientemente de las condiciones ambientales, el metabolismo de la bacteria está dirigido por su capacidad de: (i) formar la biopelícula y (ii) de regular el transporte de nutrientes dentro de la misma.

Los resultados anteriores confirman el potencial de la bacteria *A. bouvetii* UAM25 para producir BEs a partir de distintas FCs. En este punto de nuestra investigación, era importante determinar el efecto de la FC sobre las características y la naturaleza del BE que se produce. Con el objetivo de dilucidar este efecto, se caracterizaron los BEs producidos en BAL.

9.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOEMULSIFICANTES

Los BEs producidos por especies de *Acinetobacter* pueden ser exopolisacáridos [8] o lipopéptidos [84]. Para determinar la naturaleza del BE producido por *A. bouvetii* UAM25, se cuantificaron los carbohidratos totales y la proteína soluble. La Tabla 4 muestra la composición bioquímica y la AE de los sobrenadantes libres de células y los BEs purificados, además de la cantidad de BE purificado por cada BAL (1 L, 48 h de cultivo).

Tabla 4. Composición química, actividad emulsificante y producción de bioemulsificantes por *A. bouvetii* UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los BEs ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey) y el asterisco indica diferencias significativas entre SLC y BE purificado ($\alpha = 0.05$, prueba t).

	Carbohidratos		Proteína soluble		AE		BE
	totales ($mg L^{-1}$)		($mg L^{-1}$)				
	SLC	BE	SLC	BE	SLC ($UE mL^{-1}$)	BE ($UE mg^{-1}$)	($mg L^{-1}$)
BE_E	96 ± 18 ^b	86 ± 19	31 ± 16 ^b	1.5 ± 1.1 [*]	8.0 ± 1.6 ^b	46.6 ± 7.1 ^b	145 ± 15
BE_{GH}	69 ± 2 ^b	62 ± 6	19 ± 1 ^b	9.4 ± 2.7 [*]	9.9 ± 0.2 ^b	49.5 ± 4.2 ^b	151 ± 41
BE_W	287 ± 24 ^a	114 ± 11 [*]	251 ± 43 ^a	12.2 ± 5.6 [*]	18.5 ± 0.6 ^a	76.2 ± 3.5 ^a	225 ± 2

SLC, sobrenadante libre de células; BE, bioemulsificante; BE_E, BE producido con etanol; BE_{GH}, BE producido con la mezcla de glicerol-hexadecano; BE_W, BE producido con aceite usado de cocina. Los resultados son el promedio ± la desviación estándar de dos biorreactores airlift independientes después de 48 h de cultivo.

En el sobrenadante libre de células (SLC), las concentraciones totales de carbohidratos fueron mayores que las concentraciones totales de proteína soluble con las tres fuentes de carbono. Por lo tanto, se aplicó un procedimiento de purificación para carbohidratos. La proteína soluble en los BEs purificados fue menor que los SLCs, pero la AE no disminuyó. Este resultado sugiere la ausencia de lipopéptidos en los BEs de *A. bouvetii* UAM25. Por otro lado, la mayor cantidad de proteína soluble se midió en el SLC del bioemulsificante producido a partir de AUC (BE_W), mientras que el pH (6.18 ± 0.19) fue más bajo que con los otros dos SLCs (6.80 ± 0.13 con el bioemulsificante producido a partir de etanol (BE_E) y 7.11 ± 0.12 con el bioemulsificante producido con la mezcla glicerol-hexadecano (BE_{GH})). Estos resultados sugieren la presencia de ácidos grasos libres. Probablemente, se liberaron ácidos grasos libres debido a la hidrólisis enzimática de triacilglicéridos, el principal componente de AUC; las enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos, conocidas como lipasas, son de gran importancia para su posible aplicación en síntesis orgánica [85,86]. Otras especies del género *Acinetobacter*, como *A. baylyi* [85], *Acinetobacter* sp. XMZ-26 [87] y *Acinetobacter* sp. [88], se ha informado que son productores de lipasas. Hasta donde sabemos, este informe es el primero en sugerir que *Acinetobacter bouvetii* produce lipasas.

El BE_W mostró la mayor AE en el sobrenadante libre de células y en el BE purificado (18.5 ± 3.5 EU mL⁻¹ y 76.2 ± 3.5 EU mg⁻¹, respectivamente) pero no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la producción de los BE purificados. *A. bouvetii* UAM25 produjo en promedio 173 mg L⁻¹ de BE utilizando cualquiera de las tres fuentes de carbono (Tabla 4). Amani y Kariminezhad

[6] reportaron un rendimiento de 900 mg L⁻¹ para el Emulsan producido por *A. calcoaceticus* PTCC 1318 a partir de aceite de girasol. Su y col. [8] reportaron un rendimiento de 60 mg L⁻¹ para el Emulsan producido por *A. venetianus* RAG-1 a partir de etanol. BE_E y BE_{GH} mostraron AEs similares en los SLCs y en los BE purificados (Tabla 4).

Por otro lado, las concentraciones totales de carbohidratos fueron similares después de la purificación de carbohidratos para todos los BEs. Esto sugiere que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 están compuestos principalmente de exopolisacáridos. Además, debido a que el BE_W presentó mayor AE que el BE_E y el BE_{GH}, esto sugiere que el AUC influyó en la parte hidrofóbica del BE_W. Las especies de *Acinetobacter* producen exopolisacáridos, como el Emulsan y los ramnolípidos [89,90]. El Emulsan es un lipo-heteropolisacárido poli-aniónico producido por *A. calcoaceticus* PTCC 1318 [6] y *A. venetianus* RAG-1 [8].

El Emulsan y los ramnolípidos pueden disminuir la tensión superficial del medio de cultivo [89,90]. Sin embargo, en este estudio no se observó la disminución esperada en la tensión superficial en los SLCs, solo un valor promedio de 67.9 ± 8.2 mN m⁻¹. Se ha reportado que el Emulsan disminuye la tensión superficial de los sobrenadantes de 70 a 27 mN m⁻¹ [6] y los ramnolípidos de *A. junii* BD de 70 a 31 mN m⁻¹ [89]. Los BE son biosurfactantes de alto peso molecular capaces de formar emulsiones estables con hidrocarburos; a diferencia de los biosurfactantes de bajo peso molecular, las BE no reducen la tensión superficial [3]. Por lo tanto, los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 fueron relacionados con el grupo de alto peso molecular, que fue corroborado por los análisis SEC (ver 8.4.5). La Tabla 5 muestra los altos pesos moleculares de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25, con la observación de dos bandas en el cromatógrafo.

Tabla 5. Peso molecular de los bioemulsificantes producidos por *A. bouvetii* UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey).

	M_{n1} (kDa)	PDI ₁	M_{n2} (kDa)	PDI ₂
BE _E	3,999 ± 48 ^a	1.05	352 ± 17 ^b	1.27
BE _{GH}	4,320 ± 72 ^a	1.04	485 ± 39 ^{ab}	1.14
BE _W	3,279 ± 125 ^b	1.03	551 ± 9 ^a	1.16

M_n, peso molecular promedio en número; PDI, índice de polidispersidad; BE, bioemulsificante; BE_E, BE producido a partir de etanol; BE_{GH}, BE producido a partir de la mezcla de glicerol-hexadecano; BE_W, BE producido a partir de aceite usado de cocina. Los resultados son el promedio ± la desviación estándar de dos mediciones independientes.

M_{n1} en particular tiene un índice de polidispersidad estrecho (1.04) que podría indicar alta pureza. La determinación de dos distribuciones para cada muestra (M_{n1} y M_{n2}) indicaron dos componentes principales en los BEs (pesos moleculares promedio de 4,866 ± 533 y 462 ± 101 kDa, respectivamente). Esto está de acuerdo con lo informado para el Emulsan, con un peso molecular

promedio de 1,000 kDa [8], formado por una mezcla de dos polímeros de aproximadamente el 80 % de un lipopolisacárido y el 20 % como un exopolisacárido de alto peso molecular [91]. Estos resultados indicaron que los BEs de *A. bouvetii* UAM25 tienen una estructura molecular con diferentes peso molecular y diferente actividad superficial a los otros BEs reportados.

Por otro lado, la composición de los BEs se estudió mediante análisis FTIR y la Figura 8a muestra un espectro representativo del BE_E. Todos los espectros muestran una banda ancha en 3,000 – 3,500 cm⁻¹ asignada a los grupos hidroxilo [92], y otra banda ancha en 1,000 - 1,150 cm⁻¹ representativa de los grupos –C–O y –C–O–C– que son espectros típicos de carbohidratos [93]. Además, se observaron bandas para los enlaces C–H asignadas a cadenas alifáticas en la región de 2,800 – 3,000 cm⁻¹ [94]. La presencia de los grupos metileno y metilo se confirmaron en 1,300 – 1,480 cm⁻¹ [3,93]. Otra banda de absorción fuerte en 1,641 – 1,648 cm⁻¹ reveló la presencia de grupos carbonilo [95,96]. Las bandas observadas en la región de 674 - 900 cm⁻¹ denotaron el pico característico para los compuestos heteropolisacáridos, de acuerdo con Rani y col. [96]. Una banda de absorción en 1,536 – 15,46 cm⁻¹ se asignó al estiramiento del enlace C–N, y en 512 - 529 cm⁻¹ se observaron señales que fueron características de derivados de azúcares [3,96]. Los análisis FTIR revelaron la presencia de carbohidratos y cadenas alifáticas que corroboraron que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 fueron lipo-heteropolisacáridos.

El análisis ¹H RMN de la muestra del BE_E, mostrada en la Figura 8b como un espectro representativo, presentó una señal característica entre 0.80 y 0.97 ppm para el grupo –CH₃ y entre 1.00 y 1.40 ppm señales indicativas de metilenos de las cadenas alifáticas [3,97,98]. Estos datos corroboraron lo observado en el análisis FTIR con la presencia de cadenas alifáticas en la estructura química de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25. La señal de 1.90 a 2.00 ppm sugiere la presencia del –CH₃ del grupo O–acetilo, mientras que en 2.00 - 2.25 ppm indicó el –CH₃ del grupo lateral de acetamida [99]. Señales amplias de 3.5 a 4.5 ppm se asignaron a los protones anulares que se observan en los polisacáridos [97,99,100]. La estructura del polisacárido fue confirmada por la señal en 5 – 5.3 ppm asignada a protones anoméricos [99]. Por lo tanto, el análisis de ¹H NMR apoyó el análisis FTIR e indicó que todos los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 fueron lipo-heteropolisacáridos.

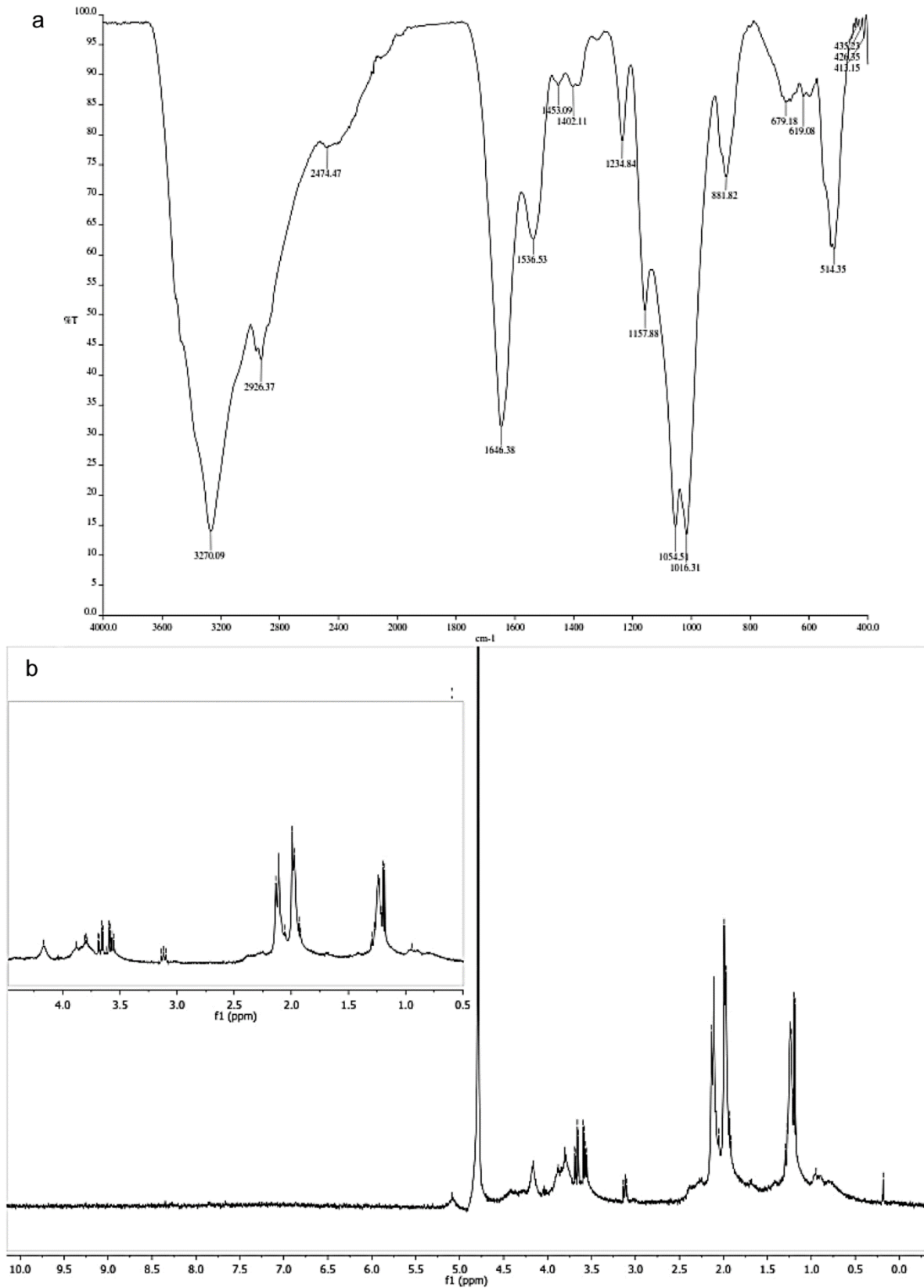


Figura 8. Espectro de FTIR (a) y espectro de ¹H NMR (b) del BE_ε.

Los análisis FTIR y ¹H NMR también sugieren que los BE producidos por *A. bouvetii* UAM25 entre ellos, sólo difieren en sus cadenas alifáticas. En este sentido, BE_W mostró un mayor carácter hidrofóbico en comparación con BE_E y BE_{GH} (ver Anexo, Figura 2–A). Estudios previos demostraron que la composición de ácidos grasos en las cadenas alifáticas de Emulsan varía según el uso de diferentes fuentes de carbono [101]. El AUC se analizó mediante GC-MS y se identificaron ácidos grasos insaturados de 18 carbonos (ver 9.1.3). El mayor carácter hidrofóbico de BE_W podría deberse que *A. bouvetii* UAM25 utilizó los ácidos grasos del AUC para la síntesis del BE. Se ha observado que, después de la entrada en la célula, los ácidos grasos libres se catabolizan o se incorporan directamente a los lípidos complejos [102]. Este aumento en el carácter hidrofóbico podría explicar una mayor afinidad por los compuestos hidrofóbicos, y por lo tanto el aumento en la actividad emulsificante de BE_W observada en la Tabla 4. Además, el análisis elemental de los BEs (Tabla 6) reveló la presencia de C 43.3 ± 4.1 %, H 7.3 ± 0.9 %, N 6.4 ± 3.7 % y S 0.6 ± 0.1 % en peso.

Tabla 6. Composición elemental (expresada como distribución porcentual masiva) de los bioemulsificantes producidos por *A. bouvetii* UAM25. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, prueba de Tukey).

	C	H	N	S	O
BE _E	40.98 ± 0.69	6.96 ± 0.02 ^b	9.03 ± 1.24 ^a	0.68 ± 0.17	42.34 ± 2.12
BE _{GH}	40.93 ± 0.01	6.63 ± 0.11 ^b	8.04 ± 0.39 ^a	0.54 ± 0.14	43.87 ± 0.41
BE _W	48.02 ± 7.64	8.26 ± 0.51 ^a	2.15 ± 1.21 ^b	0.69 ± 0.10	40.88 ± 9.45

BE_E, BE producido a partir de etanol; BE_{GH}, BE producido a partir de la mezcla de glicerol-hexadecano; BE_W, BE producido a partir de aceite de cocina de desecho. Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de dos mediciones independientes.

Es notable destacar que este estudio, según nuestro conocimiento, es el primero que reporta la composición elemental de los BEs producidos por *A. bouvetii*. Los BEs mostraron composiciones elementales similares de C, S y O. BE_W mostró una composición más alta de H y una composición menor de N con respecto a el BE_E y el BE_{GH}. Estos datos corroboraron que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 sólo difieren en sus cadenas alifáticas. Por otro lado, el contenido de CHN de los BEs fue similar al reportado para los exopolisacáridos producidos por *Paenibacillus pabuli* ATSKP (37.5: 5.90: 8.28) [103] y el contenido de CHNP fue diferente al reportado para el exobiopolímero de *A. haemolyticus* MG606 (10.4: 2.6: 1.7: 0.3) [66]. El análisis elemental sugirió que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 fueron macromoléculas similares: complejos de lipo-heteropolisacáridos de alto peso molecular que sólo difieren es sus cadenas alifáticas.

9.3 ESTABILIDAD DE LOS BIOEMULSIFICANTES

Los BEs con alto peso molecular pueden formar emulsiones estables [4]. En general, los BE que son glicolípidos muestran una alta estabilidad en condiciones extremas de salinidad, pH y temperatura [1,2]. La Figura 9 muestra el efecto de la salinidad (a, g de NaCl L⁻¹), el pH (b) y la temperatura (c, °C) sobre la actividad emulsificante relativa (AE_R) de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25. La AE_R se calculó a partir de la AE de cada tratamiento con relación a su respectivo control (0 g de NaCl L⁻¹, pH 7.0, 25 °C). El aumento en la concentración de NaCl no disminuyó la AE_R de los BEs. En cambio, la AE_R del BE_{GH} aumentó en una concentración de NaCl de 20 y 50 g L⁻¹ (Figura 9a). Estos resultados fueron similares a los reportados para la estabilidad del exopolisacárido *Rhizobium tropici* LBMP-C01 [38] y del biosurfactante de *Bacillus subtilis* [39]. Los tensioactivos iónicos son muy sensibles a los electrolitos; este fenómeno se produce porque los electrolitos afectan directamente los grupos carboxílicos del biosurfactante, lo que disminuye su AE [38,104]. En nuestros resultados, los análisis FTIR y NMR indicaron que los BEs de *A. bouvetii* UAM25 no contienen grupos carboxílicos, lo que explica por qué la concentración de NaCl no disminuyó la AE_R de los BEs.

Por otro lado, el pH no afectó la AE_R de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 (Figura 9b). Se han reportado resultados similares para la estabilidad del Alasan de *A. radioresistens* KA53 [9] y del exopolisacárido de *Rhizobium tropici* LBMP-C01 [38]. Se observó un ligero aumento en las AE_R de los BEs a pH 10, probablemente porque en soluciones alcalinas los biopolímeros adquieren un comportamiento aniónico, lo que conduce a una reducción en la tensión superficial [38].

La temperatura no disminuyó la AE_R de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 (Figura 9c). El BE_{GH} mostró activación por calor. Es bien conocido que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables y que cualquier aumento en la temperatura dará como resultado un aumento de las tasas de colisión de las gotas. Sin embargo, los BEs de alto peso molecular disminuyen este fenómeno debido a su tamaño [104]. BEs de las especies de *Acinetobacter* se ha reportado como termoestables [3,9].

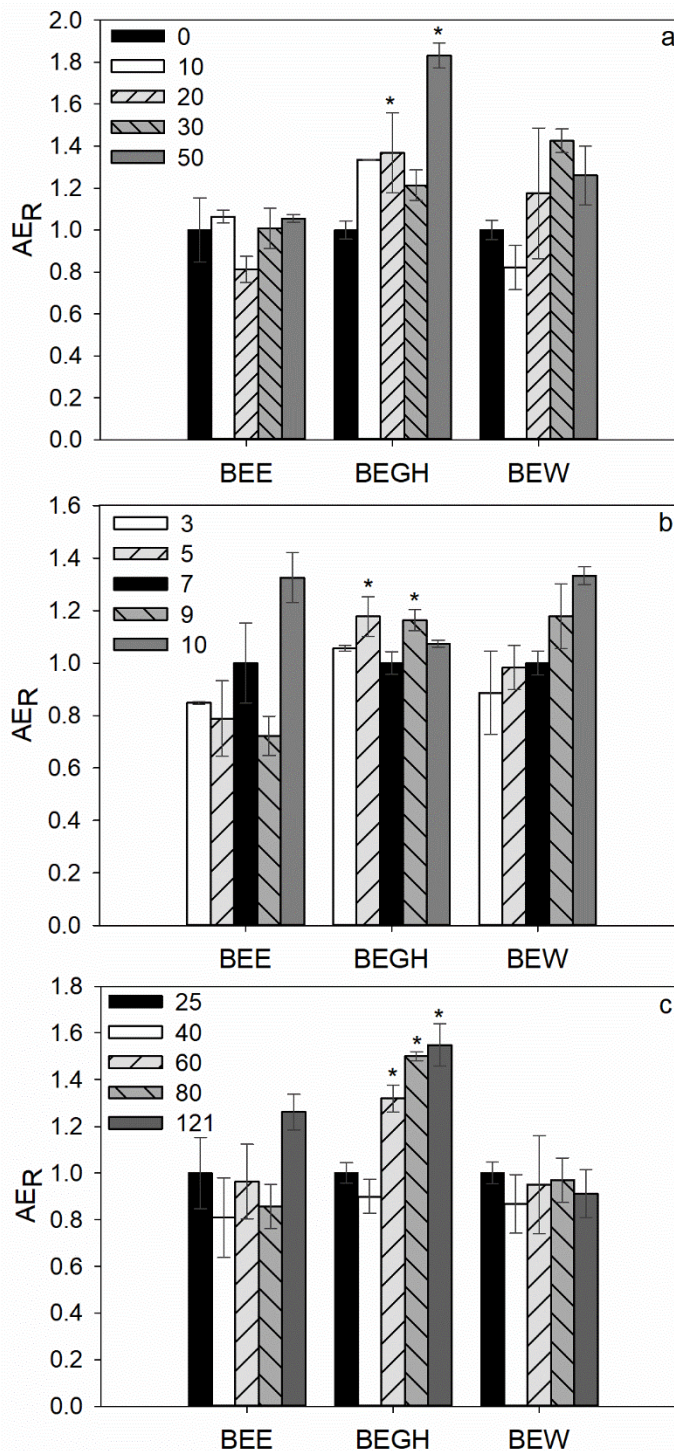


Figura 9. Efecto de la salinidad (a, g de NaCl L⁻¹), pH (b) y temperatura (c, °C) sobre la actividad emulsificante relativa (EA_R) de BE de *A. bouvetii* UAM25. El asterisco indica diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, método de Dunnett). BE_E, BE producido con etanol; BE_{GH}, BE producido con la mezcla de glicerol-hexadecano; BE_W, BE producido con aceite usado de cocina. Los resultados son el promedio \pm la desviación estándar de dos mediciones independientes.

Nuestra evidencia experimental muestra la notable estabilidad de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 bajo todas las variaciones de salinidad, pH y temperatura ensayadas. Estudios previos han demostrado que los BEs de alto peso molecular suelen ser moléculas extremadamente estables [3,9]. Además, recientemente se demostró la capacidad del BE producido con hexadecano por *A. bouvetii* UAM25 para emulsificar hidrocarburos aromáticos policíclicos [46]. Por lo tanto, una posible aplicación en biotecnología para estos nuevos BEs incluye la biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos [3, 4].

9.4 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS BIOEMULSIFICANTES PRODUCIDOS Y SU ESTABILIDAD.

Durante la planeación de este estudio, se tenía la hipótesis equivocada de que la biomolécula que produce *A. bouvetii* UAM25 con actividad emulsificante era sintetizada por la bacteria para consumir FCs hidrofóbicas. En contraste, *A. bouvetii* UAM25 produce BE a partir de una FC hidrofílica como el etanol. Además, se demostró que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 se producen como metabolitos primarios; durante las cinéticas de producción se hizo evidente que la mayor producción de BE se observó durante la fase exponencial de crecimiento de *A. bouvetii* UAM25 y no durante la fase lag de cultivo (ver 9.1), lo que sí se esperaría para una biomolécula que fuera necesaria para el consumo de la FC. Los hallazgos anteriores sugieren que *A. bouvetii* UAM25 produce BEs con otro propósito. En este sentido, es importante mencionar que *A. bouvetii* UAM25 formó una biopelícula con las tres fuentes de carbono ensayadas. Otras especies de *Acinetobacter* como *A. calcoaceticus* MM5, *A. junii* BB1A y *A. oleivorans* DR1, entre otras, se han descrito como productoras de biopelículas [105–107]. Una biopelícula es una comunidad multicelular de una o varias especies de microorganismos, que se puede unir a cualquier superficie biótica o abiótica, por lo que se puede formar en la interfaz entre el aire y agua [107]. La biopelícula está constituida por exopolisacáridos, proteínas, ADN y ácidos húmicos, de los cuales, los exopolisacáridos han sido identificados como el constituyente predominante [106]. La formación de biopelículas se caracteriza por un cambio en la hidrofobicidad celular por medio de la producción de exopolisacáridos que se acumulan en la superficie de las células. Luego, una vez que el crecimiento alcanza la fase estacionaria, la biopelícula se rompe y los exopolisacáridos se liberan al medio [108]. Se ha observado que los exopolisacáridos liberados pueden tener actividad emulsificante [105]. A la luz de esta evidencia se puede inferir que los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25, caracterizados como lipoheteropolisacáridos (ver 9.2), son el componente principal que sintetiza para la formación de su

biopelícula. Esto explica: (i) por qué se producen con cualquier FC (ver 9.1.1), (ii) por qué se producen asociados al crecimiento celular (ver 9.1.2), (iii) por qué la mayor AE se alcanza durante la fase estacionaria de crecimiento (ver 9.1.1 9.1.2) y (iv) por qué son similares sin importar la FC utilizada para su producción (ver 9.2). Por otro lado, cuando un microorganismo crece en forma de biopelícula, esta le sirve como capa protectora para la células contra condiciones ambientales adversas [106,107]. Lo anterior sugiere que la capa protectora debe estar constituida por biomoléculas sumamente estables frente a diferentes cambios ambientales y esto explica la notable estabilidad observada para los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25 (ver 9.3). En síntesis, la fuente de carbono no afectó significativamente la composición química y ni la estabilidad de los BEs producidos por *A. bouvetii* UAM25.

10 CONCLUSIONES

A. bouvetii UAM25 produjo bioemulsificantes a partir de etanol, una mezcla de glicerol-hexadecano y aceite usado de cocina. La producción de los bioemulsificantes estuvo asociada al crecimiento de la bacteria. Además, el bioemulsificante producido con aceite usado de cocina presentó la mayor actividad emulsificante.

Los bioemulsificantes fueron macromoléculas similares sin importar la fuente de carbono utilizada. Todos se caracterizaron como complejos de lipo-heteropolisacáridos de alto peso molecular. El uso de aceite usado de cocina como fuente de carbono modificó la cadena alifática del bioemulsificante producido. Es probable que debido a esta modificación este bioemulsificante tuviera la mayor actividad emulsificante.

Por otro lado, la estabilidad de los bioemulsificantes fue similar sin importar la fuente de carbono utilizada. Los bioemulsificantes fueron notablemente estables bajo todas las variaciones de salinidad (0 – 50 g de NaCl L⁻¹), pH (3 – 10) y temperatura (25 – 121 °C) ensayadas.

11 PERSPECTIVAS

- Optimizar el proceso de purificación y determinar la estructura química de los bioemulsificantes de *A. bouvetii* UAM25.
- Optimizar la producción del BE en biorreactores airlift con miras al escalamiento del proceso.
- Evaluar la aplicación de *A. bouvetii* UAM25 y de su BE en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos.
- Determinar la viabilidad de la aplicación del BE de *A. bouvetii* UAM25 en recuperación mejorada de petróleo.
- Desarrollar una técnica estándar para el estudio de BEs de alto peso molecular.
- Estudiar la lipasa de *A. bouvetii* UAM25 para definir sus potenciales aplicaciones industriales.
- Evaluar la producción del BE y la lipasa de *A. bouvetii* UAM25 a partir de aceite usado de cocina a un nivel de escala planta piloto.
- Estudiar la ruta metabólica de biosíntesis del bioemulsificante de *A. bouvetii* UAM25.
- Estudiar la formación de biopelícula de *A. bouvetii* UAM25 para dilucidar las posibles aplicaciones biotecnológicas.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Manivasagan, P. Sivasankar, J. Venkatesan, K. Sivakumar, S.K. Kim, Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (2014) 783–797. doi:10.1007/s00449-013-1048-6.
- [2] N.S. Zambry, A. Ayoib, N.A. Md Noh, A.R.M. Yahya, Production and partial characterization of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. R1, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40 (2017) 1007–1016. doi:10.1007/s00449-017-1764-4.
- [3] Y.H. Zhao, L.Y. Chen, Z.J. Tian, Y. Sun, J.B. Liu, L. Huang, Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS, *J. Basic Microbiol.* 56 (2016) 184–195. doi:10.1002/jobm.201500487.
- [4] C. Uzoigwe, J.G. Burgess, C.J. Ennis, P.K.S.M. Rahman, Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–6. doi:10.3389/fmicb.2015.00245.
- [5] E. Rosenberg, A. Perry, D.T. Gibson, D.L. Gutnick, Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 409–413. doi:10.1016/0014-5793(79)81320-4.
- [6] H. Amani, H. Kariminezhad, Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation, *Pet. Sci. Technol.* 34 (2016) 216–222. doi:10.1080/10916466.2015.1118500.
- [7] J. Jung, W. Park, *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2533–2548. doi:10.1007/s00253-015-6439-y.
- [8] W.T. Su, W.J. Chen, Y.F. Lin, Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 271–279. doi:10.1007/s00253-009-1957-0.
- [9] A. Toren, S. Navon-Venezia, E.Z. Ron, E. Rosenberg, Emulsifying Activities of Purified Alasan Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1102–1106. doi:10.1128/AEM.67.3.1102-1106.2001.
- [10] T.P. Pirog, A.D. Konon, T.A. Shevchuk, I. V. Bilets, Intensification of biosurfactant synthesis

- by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on a hexadecane-glycerol mixture, *Microbiology*. 81 (2012) 565–572. doi:10.1134/S0026261712050128.
- [11] I.E. Affandi, N.H. Suratman, S. Abdullah, W.A. Ahmad, Z.A. Zakaria, Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95 (2014) 33–40. doi:10.1016/j.ibiod.2014.04.009.
- [12] O.S. Amodu, T. V. Ojumu, S.K.O. Ntwampe, Kinetic modelling of cell growth, substrate utilization, and biosurfactant production from solid agrowaste (*Beta vulgaris*) by *Bacillus licheniformis* STK 01, *Can. J. Chem. Eng.* 94 (2016) 2268–2275. doi:10.1002/cjce.22631.
- [13] J.D. Desai, I.M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Fuel Energy Abstr.* 38 (1997) 221. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6.
- [14] H. Suthar, K. Hingurao, A. Desai, A. Nerurkar, Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column, *J. Microbiol. Methods*. 75 (2008) 225–230. doi:10.1016/j.mimet.2008.06.007.
- [15] S.K. Satpute, A.G. Banpurkar, P.K. Dhakephalkar, I.M. Banat, B.A. Chopade, Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 127–144. doi:10.3109/07388550903427280.
- [16] I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant, Microbial biosurfactants production, applications and future potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 427–444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0.
- [17] S.S. Cameotra, R.S. Makkar, Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants, *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 97–116. doi:10.1351/PAC-CON-09-02-10.
- [18] K. Phetrong, A. H-Kittikun, S. Maneerat, Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30 (2008) 297–305.
- [19] D.L. Gutnick, E. Rosenberg, Y. Shabtai, Production of alpha emulsans, 4234689, 1980.
- [20] P. Chamanrokh, M.M. Assadi, A. Noohi, S. Yahyai, Emulsan Analysis Produced by Locally Isolated Bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, *Iran J Env. Heal. Sci Eng.* 5 (2008) 101–108.
- [21] E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, D.L. Gutnick, Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-

- 1: Chemical and Physical Properties, Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979) 402–408.
- [22] N. Kaplan, Z. Zosim, E. Rosenberg, Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein, Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 440–446.
- [23] S. Navon-Venezia, Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmann, S. Carmeli, E.Z. Ron, E. Rosenberg, Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 3240–3244.
- [24] E. Rosenberg, C. Rubinovitz, A. Gottlieb, S. Rosenhak, E.Z. Ron, Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 317–322.
- [25] A. Toren, G. Segal, E.Z. Ron, E. Rosenberg, Structure-function studies of the recombinant protein bioemulsifier AlnA, Environ. Microbiol. 4 (2002) 257–261. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00298.x.
- [26] B.J. Abbott, A.I. Laskin, C.J. McCoy, Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on ethanol., Appl. Microbiol. 25 (1973) 787–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4715559> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC380913>.
- [27] T.P. Pirog, Y. V. Kuz'minskaya, Regulation of Acetate Metabolism in a Strain of *Acinetobacter* sp. Growing on Ethanol, Appl. Biochem. Microbiol. 39 (2003) 158–165. doi:10.1023/A:1022533828803.
- [28] B.J. Abbott, Ethanol Inhibition of A Bacterium (*Acinetobacter-Calcoaceticus*) in Chemostat Culture, J. Gen. Microbiol. 75 (1973) 383–389.
- [29] B.J. Abbott, A.I. Laskin, Effect of Growth Rate and Nutrient Limitation on the Composition and Biomass Yield of *Acinetobacter calcoaceticus* Effect of Growth Rate and Nutrient Limitation on the Composition and Biomass Yield of *Acinetobacter calcoaceticus*, 28 (1974) 58–63.
- [30] J.W. Choi, H.G. Choi, W.H. Lee, Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, J. Biotechnol. 45 (1996) 217–225. doi:10.1016/0168-1656(95)00175-1.
- [31] P. Kim, D.K. Oh, S.Y. Kim, J.H. Kim, Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1,

- Biotechnol. Lett. 19 (1997) 457–459. doi:10.1023/A:1018348227965.
- [32] A. Gorkovenko, J. Zhang, R.A. Gross, D.L. Kaplan, Control of unsaturated fatty acid substituents in emulsans, Carbohydr. Polym. 39 (1999) 79–84. doi:10.1016/S0144-8617(98)00156-8.
- [33] E. Rosenberg, E.Z. Ron, High- and low-molecular-mass microbial surfactants, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (1999) 154–162. doi:10.1007/s002530051502.
- [34] Z. Zhao, J.W.C. Wong, Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene, Environ. Technol. 30 (2009) 291–299. doi:10.1080/09593330802630801.
- [35] T.A. Grinberg, T.P. Pirog, Y.R. Malashenko, S.A. Vlasov, Ethapolan: A New Microbial Exopolysaccharide for Oil Industry, Energy and Fuels. 9 (1995) 1086–1089. doi:10.1021/ef00054a023.
- [36] N. Sar, E. Rosenberg, Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains, Curr. Microbiol. 9 (1983) 309–313. doi:10.1007/BF01588825.
- [37] T. Barkay, S. Navon-Venezia, E.Z. Ron, E. Rosenberg, Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 2697–2702.
- [38] C. Moretto, T.C.L. Castellane, E.M. Lopes, W.P. Omori, L.P. Sacco, E.G. de M. Lemos, Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia, Int. J. Biol. Macromol. 81 (2015) 291–298. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056.
- [39] H. Amani, M.H. Sarrafzadeh, M. Haghighi, M.R. Mehrnia, Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, J. Pet. Sci. Eng. 75 (2010) 209–214. doi:10.1016/j.petrol.2010.11.008.
- [40] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, I.M. Banat, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production, AMB Express. 1 (2011) 1–19. doi:10.1186/2191-0855-1-5.
- [41] V. Shah, M. Jurjevic, D. Badia, Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production, Biotechnol. Prog. 23 (2007) 512–515. doi:10.1021/bp0602909.
- [42] S.S. Yazdani, R. Gonzalez, Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry, Curr. Opin. Biotechnol. 18 (2007) 213–219. doi:10.1016/j.copbio.2007.05.002.

- [43] T.P. Pirog, M.A. Kovalenko, Y. V. Kuz'minskaya, Intensification of exopolysaccharide synthesis by *Acinetobacter* sp. on an ethanol-glucose mixture: Aspects related to biochemistry and bioenergetics, *Microbiology*. 72 (2003) 305–312. doi:10.1023/A:1024247915758.
- [44] O. Angeles, S.A. Medina-Moreno, A. Jiménez-González, A. Coreño-Alonso, M.A. Lizardi-Jiménez, Predominant mode of diesel uptake: Direct interfacial versus emulsification in multiphase bioreactor, *Chem. Eng. Sci.* 165 (2017) 108–112. doi:10.1016/j.ces.2017.02.046.
- [45] B. Denis, O.A. Pérez, M.A. Lizardi-Jiménez, A. Dutta, Numerical evaluation of direct interfacial uptake by a microbial consortium in an airlift bioreactor, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119 (2017) 542–551. doi:10.1016/j.ibiod.2016.08.012.
- [46] J.L. Vázquez-Vázquez, N.D. Ortega-de la Rosa, S. Huerta-Ochoa, M. Gimeno, M. Gutiérrez-Rojas, Novel exopolysaccharide produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25: production, characterization and pabs bioemulsifying capability, *Rev. Mex. Ing. Química*. 16 (2017) 721–733.
- [47] E. Rosenberg, E.Z. Ron, Bioemulsans: Surface-active Polysaccharide-containing Complexes, *Biopolym. Online*. (2005) 91–99. doi:10.1002/3527600035.bpol5004.
- [48] J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm, Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–24. doi:10.3389/fmicb.2015.00496.
- [49] H. Dams-Kozłowska, M.P. Mercaldi, B.J. Panilaitis, D.L. Kaplan, Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 201–210. doi:10.1007/s00253-008-1664-2.
- [50] T.P. Pirog, I. V Korzh, T. a Shevchuk, Effect of cultivation conditions on the physicochemical properties of exopolysaccharide ethapolan, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 45 (2009) 58–63. doi:10.1134/S0003683809010098.
- [51] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 153–176. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- [52] S.S. de Jesus, J. Moreira Neto, R. Maciel Filho, Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A

- comparative study, *Biochem. Eng. J.* 118 (2017) 70–81. doi:10.1016/j.bej.2016.11.019.
- [53] Y. Chisti, *Pneumatically Agitated Bioreactors in Industrial and Environmental Bioprocessing: Hydrodynamics, Hydraulics, and Transport Phenomena*, *Appl. Mech. Rev.* 51 (1998) 33. doi:10.1115/1.3098989.
- [54] S. Mukherjee, P. Das, R. Sen, Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 509–515. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.005.
- [55] Y. Chisti, U.J. Jauregui-Haza, Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 10 (2002) 143–153. doi:10.1016/S1369-703X(01)00174-7.
- [56] M.A. Lizardi-Jiménez, G. Saucedo-Castañeda, F. Thalasso, M. Gutiérrez-Rojas, Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor, *Chem. Eng. J.* 187 (2012) 160–165. doi:10.1016/j.cej.2012.01.114.
- [57] M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van 't Riet, Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1875–1881. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x.
- [58] J. Baranyi, T.A. Roberts, Mathematics of predictive food microbiology, *Int. J. Food Microbiol.* 26 (1995) 199–218. doi:10.1016/0168-1605(94)00121-L.
- [59] S. Kim, J. Lee, B. Kim, T. Lee, Purification and characterization of bioemulsifier produced by *Acinetobacter* sp. BE-254, *J. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1996) 184–188. http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1MBA4_1996_v6n3_184.
- [60] J. Chen, P.T. Huang, K.Y. Zhang, F.R. Ding, Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil, *J. Appl. Microbiol.* 112 (2012) 660–671. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05242.x.
- [61] I.J. Díaz-Ramírez, H. Ramírez-Saad, M. Gutiérrez-Rojas, E. Favela-Torres, Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site, *Can. J. Microbiol.* 49 (2003) 755–761. doi:10.1139/w03-098.
- [62] S.A. Medina-Moreno, S. Huerta-Ochoa, M. Gutiérrez-Rojas, Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil, *Can. J. Microbiol.* 51 (2005) 231–239. doi:10.1139/w04-130.

- [63] O. Tzintzun-Camacho, O. Loera, H.C. Ramírez-Saad, M. Gutiérrez-Rojas, Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 70 (2012) 1–7. doi:10.1016/j.ibiod.2012.01.009.
- [64] N.D. Ortega-de la Rosa, Evaluación de la eficiencia de producción de diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas, (2013) 63.
- [65] M.A. Lizardi-Jiménez, R.M. Leal-Bautista, A. Ordaz, R. Reyna-Velarde, Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole, *Desalin. Water Treat.* 54 (2015) 44–49. doi:10.1080/19443994.2013.876670.
- [66] T. Kaur, M. Ghosh, *Acinetobacter haemolyticus* MG606 produces a novel, phosphate binding exobiopolymer, *Carbohydr. Polym.* 132 (2015) 72–79. doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.002.
- [67] V. Ugalde-Benítez, A. Rojo-Domínguez, M.E. Jaramillo-Flores, I. Guerrero-Legarreta, Effect of sample solubilized aliquot volume and concentration on hydroperoxide detection in PUFA-rich fish oil, *Int. J. Food Prop.* 17 (2014) 650–660. doi:10.1080/10942912.2012.660719.
- [68] K. Ramezani, S. Rowshanzamir, M.H. Eikani, Castor oil transesterification reaction: A kinetic study and optimization of parameters, *Energy.* 35 (2010) 4142–4148. doi:10.1016/j.energy.2010.06.034.
- [69] G.I. Reynoso-Cereceda, R.I. Garcia-Cabrera, N.A. Valdez-Cruz, M.A. Trujillo-Roldán, Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient $k_L a$ characterization and *Escherichia coli* cultures comparison, *Biochem. Eng. J.* 105 (2016) 379–390. doi:10.1016/j.bej.2015.10.015.
- [70] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. t Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [71] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [72] C. Sivapathasekaran, R. Sen, Origin, properties, production and purification of microbial surfactants as molecules with immense commercial potential, *Tenside, Surfactants, Deterg.* 54 (2017) 92–104. doi:10.3139/113.110482.

- [73] T. Pirog, A. Sofilkanych, A. Konon, T. Shevchuk, S. Ivanov, Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium, *Food Bioprod. Process.* 91 (2013) 149–157. doi:10.1016/j.fbp.2013.01.001.
- [74] G.L. Maddikeri, P.R. Gogate, A.B. Pandit, Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound, *Chem. Eng. J.* 263 (2015) 479–487. doi:10.1016/j.cej.2014.11.010.
- [75] G. Lan, Q. Fan, Y. Liu, C. Chen, G. Li, Y. Liu, X. Yin, Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4, *Biochem. Eng. J.* 101 (2015) 44–54. doi:10.1016/j.bej.2015.05.001.
- [76] I.K. Leth, K.A. McDonald, Growth kinetics and scale-up of *Agrobacterium tumefaciens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 4895–4903. doi:10.1007/s00253-017-8241-5.
- [77] M. Henkel, A. Schmidberger, M. Vogelbacher, C. Kühnert, J. Beuker, T. Bernard, T. Schwartz, C. Syldatk, R. Hausmann, Kinetic modeling of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 including cell density-dependent regulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 7013–7025. doi:10.1007/s00253-014-5750-3.
- [78] M. Kannisto, E. Efimova, M. Karp, V. Santala, Growth and wax ester production of an *Acinetobacter baylyi* ADP1 mutant deficient in exopolysaccharide capsule synthesis, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44 (2017) 99–105. doi:10.1007/s10295-016-1872-1.
- [79] C.R. Arciola, D. Campoccia, L. Montanaro, Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (2018) 1–13. doi:10.1038/s41579-018-0019-y.
- [80] P.S. Stewart, Mini-review: Convection around biofilms, *Biofouling.* 28 (2012) 187–198. doi:10.1080/08927014.2012.662641.
- [81] D. Taherzadeh, C. Piciooreanu, H. Horn, Mass transfer enhancement in moving biofilm structures, *Biophys. J.* 102 (2012) 1483–1492. doi:10.1016/j.bpj.2012.02.033.
- [82] M. Tallawi, M. Opitz, O. Lieleg, Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 887–900. doi:10.1039/c6bm00832a.
- [83] N. Billings, A. Birjiniuk, T.S. Samad, P.S. Doyle, K. Ribbeck, Material properties of biofilms - A review of methods for understanding permeability and mechanics, *Reports Prog. Phys.*

- 78 (2015) 36601. doi:10.1088/0034-4885/78/3/036601.
- [84] M. Bao, Y. Pi, L. Wang, P. Sun, Y. Li, L. Cao, Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil, *Environ. Sci. Process. Impacts*. 16 (2014) 897. doi:10.1039/c3em00600j.
- [85] S. Uttatree, P. Winayanuwattikun, J. Charoenpanich, Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 1362–1376. doi:10.1007/s12010-010-8928-x.
- [86] T. Kar, J. Destain, P. Thonart, F. Delvigne, Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (2012) 483–492. doi:10.1007/s00449-011-0614-z.
- [87] X. Zheng, N. Wu, Y. Fan, Characterization of a novel lipase and its specific foldase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26, *Process Biochem.* 47 (2012) 643–650. doi:10.1016/j.procbio.2012.01.005.
- [88] S. Moradi, S.H. Razavi, S.M. Mousavi, S.M.T. Gharibzahedi, Optimization and partial purification of a high-activity lipase synthesized by a newly isolated *Acinetobacter* from offshore waters of the Caspian Sea under solid-state fermentation, *RSC Adv.* 5 (2015) 12052–12061. doi:10.1039/C4RA10485D.
- [89] H. Dong, W. Xia, H. Dong, Y. She, P. Zhu, K. Liang, Z. Zhang, C. Liang, Z. Song, S. Sun, G. Zhang, Rhamnolipids produced by indigenous *Acinetobacter junii* from petroleum reservoir and its potential in enhanced oil recovery, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.01710.
- [90] J. Wu, J. Zhang, P. Wang, L. Zhu, M. Gao, Z. Zheng, X. Zhan, Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40 (2017) 1611–1619. doi:10.1007/s00449-017-1817-8.
- [91] M.P. Mercaldi, H. Dams-Kozłowska, B. Panilaitis, A.P. Joyce, D.L. Kaplan, Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component, *Biomacromolecules.* 9 (2008) 1988–1996. doi:10.1021/bm800239p.
- [92] D.K.F. Santos, H.M. Meira, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a

- bioremediation agent, *Process Biochem.* 54 (2017) 20–27. doi:10.1016/j.procbio.2016.12.020.
- [93] K.A. Peele, V.R.T. Ch, V.P. Kodali, Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium, *3 Biotech.* 6 (2016) 1–6. doi:10.1007/s13205-016-0494-7.
- [94] S.S. Balan, C.G. Kumar, S. Jayalakshmi, Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation, *Process Biochem.* 51 (2016) 2198–2207. doi:10.1016/j.procbio.2016.09.009.
- [95] R. Chandankere, J. Yao, M.M.F. Choi, K. Masakorala, Y. Chan, An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir, *Biochem. Eng. J.* 74 (2013) 46–53. doi:10.1016/j.bej.2013.02.018.
- [96] R.P. Rani, M. Anandharaj, P. Sabhapathy, A.D. Ravindran, Physicochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 1–10. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122.
- [97] Z.A. Raza, A. Rehman, M.T. Hussain, R. Masood, A. Ul Haq, M.T. Saddique, A. Javid, N. Ahmad, Production of rhamnolipid surfactant and its application in bioscouring of cotton fabric, *Carbohydr. Res.* 391 (2014) 97–105. doi:10.1016/j.carres.2014.03.009.
- [98] C. Zou, M. Wang, Y. Xing, G. Lan, T. Ge, X. Yan, T. Gu, Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications, *Biochem. Eng. J.* 90 (2014) 49–58. doi:10.1016/j.bej.2014.05.007.
- [99] D. Barnhart, D.L. Kaplan, W.T. Winter, B.J. Panilaitis, D.J. Kiemle, Structural details of the Polyelectrolytic Exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 emulsan complex, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 257–262. doi:10.1016/j.carbpol.2011.12.006.
- [100] J.H. Kügler, A. Kraft, S. Heißler, C. Muhle-Goll, B. Luy, W. Schwack, C. Sylдатk, R. Hausmann, Extracellular aromatic biosurfactant produced by *Tsukamurella pseudospumae* and *T. spumae* during growth on n-hexadecane, *J. Biotechnol.* 211 (2015) 107–114. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.424.
- [101] S.Y. Kim, O.H. Deok-Kun, J.H. Kim, Biological modification of hydrophobic group in

- Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 emulsan, J. Ferment. Bioeng. 84 (1997) 162–164. doi:10.1016/S0922-338X(97)82548-2.
- [102] N.G. Wakelin, C.F. Forster, An investigation into microbial removal of fats, oils and greases, Bioresour. Technol. 59 (1997) 37–43. doi:10.1016/S0960-8524(96)00134-4.
- [103] K.P. Pooja, T.S. Chandra, Production and partial characterization of a novel capsular polysaccharide KP-EPS produced by *Paenibacillus pabuli* strain ATSKP, World J. Microbiol. Biotechnol. 25 (2009) 835–841. doi:10.1007/s11274-009-9954-0.
- [104] A.I.A. Mohamed, I.A. Hussein, A.S. Sultan, G.A. Al-Muntasheri, Use of organoclay as a stabilizer for water-in-oil emulsions under high-temperature high-salinity conditions, J. Pet. Sci. Eng. 160 (2018) 302–312. doi:10.1016/j.petrol.2017.10.077.
- [105] M. Marin, a. Pedregosa, F. Laborda, Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5, Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 (1996) 660–667. doi:10.1007/BF00172500.
- [106] I.K. Sen, A.K. Mandal, R. Chakraborty, B. Behera, K.K. Yadav, T.K. Maiti, S.S. Islam, Structural and immunological studies of an exopolysaccharide from *Acinetobacter junii* BB1A, Carbohydr. Polym. 101 (2014) 188–195. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.018.
- [107] I.A. Jang, J. Kim, W. Park, Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1, Sci. Rep. 6 (2016) 1–12. doi:10.1038/srep21121.
- [108] H.J. Doughari, P.A. Ndakidemi, I.S. Human, S. Benade, The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview, Microbes Environ. 26 (2011) 101–112. doi:10.1264/jsme2.ME10179.

13 ANEXO

13.1 ESPECTROS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS PRESENTES EN EL ACEITE USADO DE COCINA

Abundance

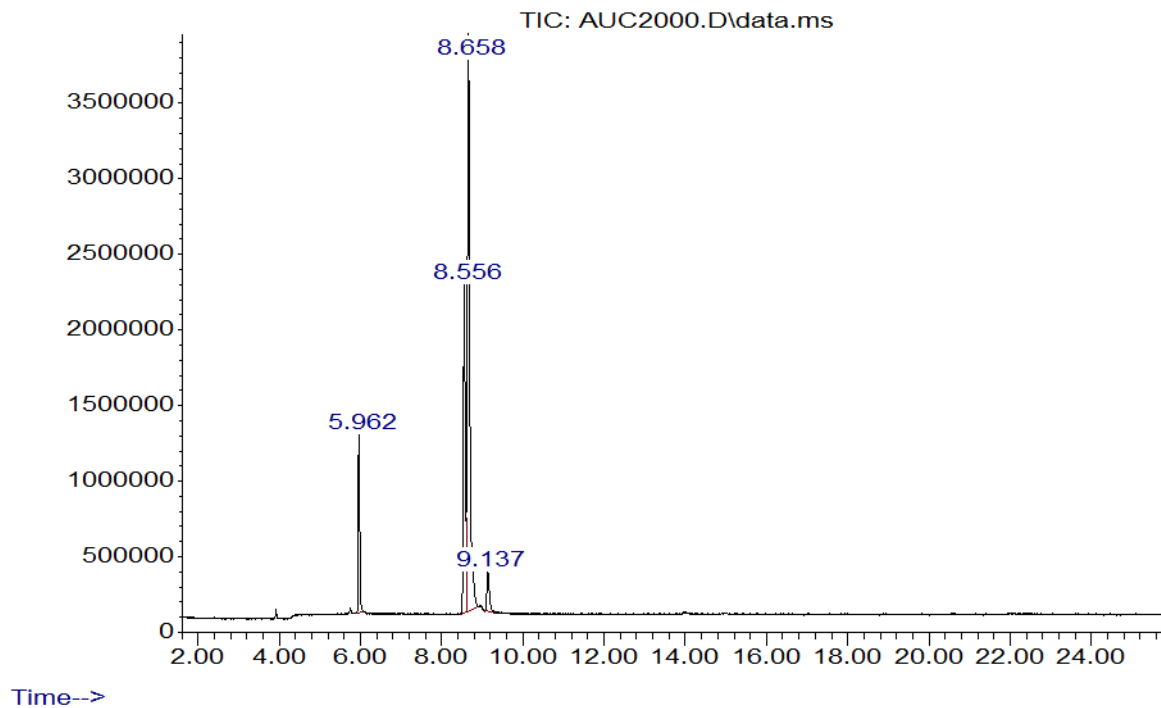


Figura 1-A. Espectros de los ésteres metílicos presentes en el aceite usado de cocina.

13.2 ESPECTROS DE LOS BIOEMULSIFICANTES DE ACINETOBACTER BOUVETII UAM25

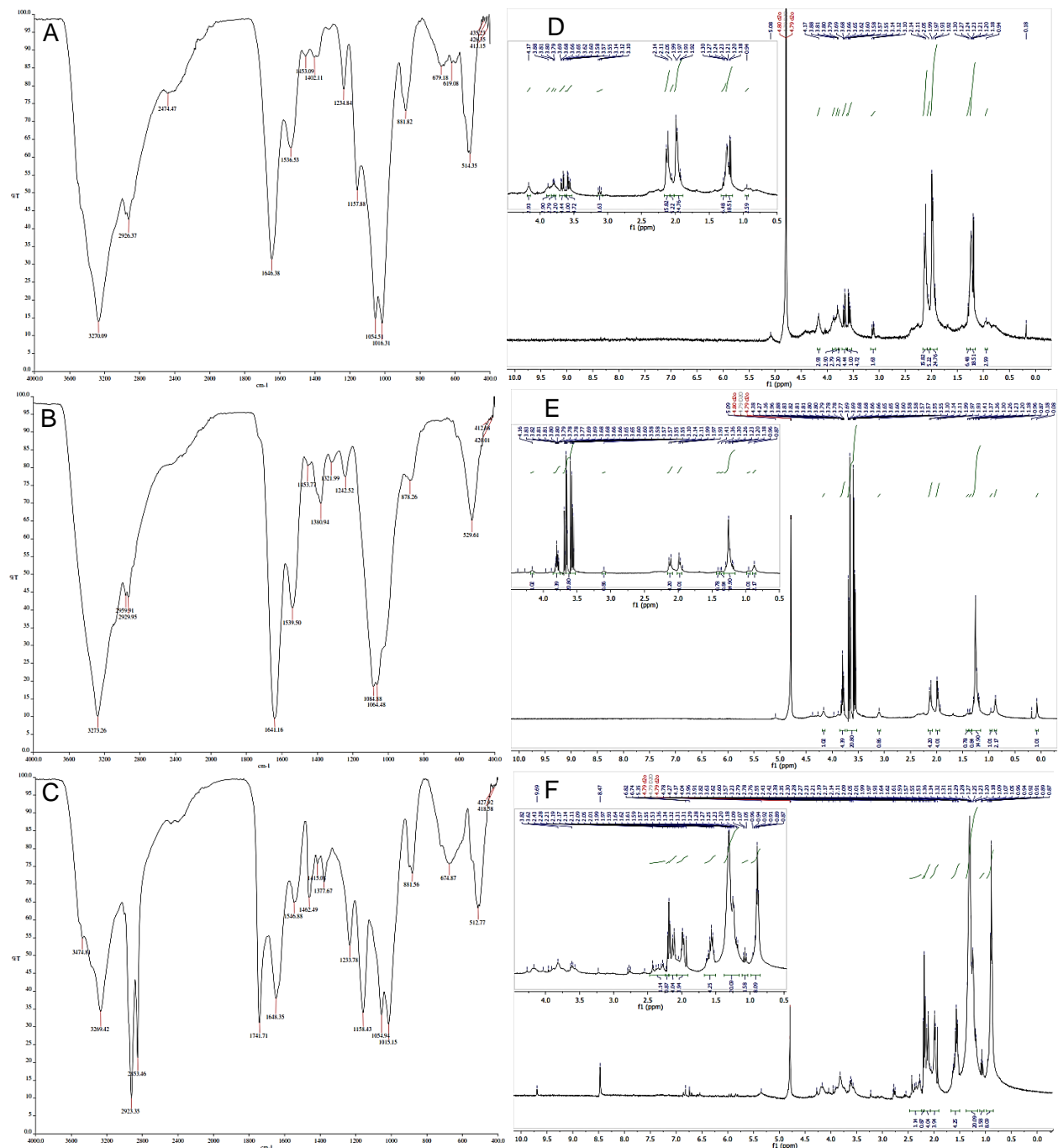


Figura 2–A. Espectros de FTIR del BE_E (A), BE_{GH} (B) y BE_W (C). Espectros de ¹H NMR del BE_E (D), BE_{GH} (E) y BE_W (F).

13.3 ARTÍCULO CIENTÍFICO

<https://doi.org/10.1007/s00449-018-1920-5>



Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources

Nestor D. Ortega-de la Rosa¹ · Jose L. Vázquez-Vázquez¹ · Sergio Huerta-Ochoa¹ · Miquel Gimeno² · Mariano Gutiérrez-Rojas¹

Received: 11 October 2017 / Accepted: 6 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Acinetobacter species are identified as producing surface-active and emulsifying molecules known as bioemulsifiers. Production, characterization and stability of bioemulsifiers produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 were studied. *A. bouvetii* UAM25 grew in three different carbon and energy sources: ethanol, a glycerol–hexadecane mixture and waste cooking oil in an airlift bioreactor, showing that bioemulsifier production was growth associated. The three purified bioemulsifiers were lipo-heteropolysaccharides of high molecular weight (4866 ± 533 and 462 ± 101 kDa). The best carbon source and energy for bioemulsifier production was wasted cooking oil, with a highest emulsifying capacity (76.2 ± 3.5 EU mg^{-1}) as compared with ethanol (46.6 ± 7.1 EU mg^{-1}) and the glycerol–hexadecane mixture (49.5 ± 4.2 EU mg^{-1}). The three bioemulsifiers in our study displayed similar macromolecular structures, regardless of the nature (hydrophobic or hydrophilic) of the carbon and energy source. Bioemulsifiers did not decrease surface tension, but the emulsifying capacity of all of them was retained under extreme variation in salinity (0–50 g NaCl L^{-1}), pH (3–10) and temperature (25–121 °C), indicative of remarkable stability. These findings contribute to understanding of the relationship between: production, physical properties, chemical composition and stability of bioemulsifiers for their potential applications in biotechnology, such as bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil and water.

Keywords Bioemulsifier · *Acinetobacter bouvetii* · Lipo-heteropolysaccharide · Airlift bioreactor

Introduction

Interest in the production of biosurfactants has increased due to their potential application in the food, pharmaceutical, and oil industry, as well as in bioremediation of hydrocarbon-contaminated sites [1, 2]. Biosurfactants are amphiphilic molecules with surface activity. Bioemulsifiers (BEs) are high molecular weight biosurfactants with the ability to form stable emulsions with hydrocarbons [3]. Chemically, BEs are complex mixtures of heteropolysaccharides, lipopolysaccharides, lipoproteins, and proteins. The combination of

polysaccharide, fatty acid, and protein components confers BEs better emulsifying potential and capacity to stabilise emulsions [4].

BEs are produced by a wide variety of microorganisms, such as *Acinetobacter* spp. which produce a variety of BEs [5–7]. *A. venetianus* RAG-1 and *A. calcoaceticus* PTCC 1318 produced emulsan from ethanol and sunflower oil, respectively [6, 8]. Emulsan is a polyanionic lipo-heteropolysaccharide which has an average molecular weight of about 1000 kDa. *A. radioresistens* KA53 produced alasan from ethanol, a stable BE of high molecular weight. Alasan is a complex of polysaccharide and protein [9]. *A. beijerinckii* ZRS produced a glycolipoprotein complex from hexadecane [3]. Several studies have demonstrated the capacity of *Acinetobacter* species to consume hydrophilic, hydrophobic or mixtures of both carbon sources for BE production [8, 10, 11]. However, very few studies have reported kinetic studies of BE production and growth, which are necessary for bioreactor design and control [12]. In addition, there are few publications on BE production in bioreactors. Therefore,

✉ Mariano Gutiérrez-Rojas
mgr@xanum.uam.mx

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de Mexico, Mexico

² Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de Mexico, Mexico

studies of BE production in bioreactors are also necessary. The use of airlift bioreactors (ALBs) may be suitable for BE production, since they present low shear environment and a reasonable oxygen transfer rate, in addition to low power consumption [13, 14].

A recent study showed that *A. bouvetii* UAM25 produced BEs [15], but its production, physical properties, chemical composition and emulsifier properties were not discussed. The aims of this study were: (i) to characterise BE production by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 from different carbon sources in an ALB, (ii) to assess the influence of carbon source on physical and chemical properties of BEs produced, and (iii) to determine the stability of BEs to elucidate their potential applications in biotechnology.

Materials and methods

Microorganism

The bacterial strain *A. bouvetii* UAM25 (GenBank Accession Number HQ424441.1) is available at the WDCM449 culture collection from Instituto Politécnico Nacional (Mexico) with the number ENCB-MG-076. The strain was kept in Petri dishes with trypticasein soy agar (Bioxon) broth at 30 °C for 48 h and re-seeded every 2 months.

Carbon sources

Ethanol (J. T. Baker, 99%) had an initial concentration of 10.58 g L⁻¹. A mixture of glycerol (J. T. Baker, 99%) and n-hexadecane (Sigma-Aldrich, 99%) had an initial concentration of 8.00 and 2.81 g L⁻¹, respectively. Waste cooking oil (WCO, provided by the University catering department) was left standing for 48 h, then decanted and filtered through Whatman paper (Grade 1). Filtered WCO was stored in a hermetically sealed glass vessel (1 L) at room temperature (25 °C) in dark condition and added at an initial concentration of 7.11 g L⁻¹. Carbon sources tested for BE production were evaluated at a C/N ratio of 10.5 g C (g N)⁻¹.

Production of bioemulsifiers in airlift bioreactor

Production of BEs was carried out in an ALB, which consisted of a vertical glass column of 2 L with an external diameter of 0.077 m and an internal diameter of 0.072 m, a concentric stainless steel tube with internal diameter of 0.041 m and height of 0.204 m. A stainless steel (0.006 m internal diameter) “L”-shaped air distributor with seven perforations (0.001 m diameter and 0.004 m separation) was used. Two independent ALBs were batch operated at superficial gas velocity (U_g) of 0.6 cm s⁻¹ for 48 h at 30 °C [16]. Each carbon source was tested in duplicate with 1 L of mineral medium composed of

NaNO₃ 3.18 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1.075 g L⁻¹, KCl 0.565 g L⁻¹, and MgSO₄·5H₂O 0.55 g L⁻¹ (J.T. Baker; 99.3% purity or above). The pH was adjusted to 6.0 with 1.0 M HCl. Initial inoculum *A. bouvetii* UAM25 (1 × 10⁶ CFU mL⁻¹), previously cultured in 25 mL nutrient broth (Bioxon, 30 °C, 200 rpm, 48 h), was then added [15]. Tests were conducted for: (i) BE production and microbial growth kinetics: 10 mL of culture medium was taken from the ALB at each sampling time; once kinetics were concluded, the remaining media was discarded; and (ii) BE purification: after 48 h culture in the ALB, all broth was used for purification.

Purification of bioemulsifiers

Cells were removed by centrifugation (10,000×g, 4 °C, 20 min) [17]. Two litres of isopropanol (J. T. Baker, 99%) was added to the cell-free supernatant for BE precipitation. The BE was then collected by centrifugation (10,000×g, 4 °C, 5 min), suspended in 100 mL of distilled water and lyophilised to conserve the product [18]. One hundred milligrams of lyophilised product (crude BE) was suspended in 100 mL of distilled water and ultra-filtered with a stirred cell system using an Omega polyethersulfone 30 kDa cut-off ultrafiltration membrane (PALL, USA). Air was injected into the system after passing through a polytetrafluoroethylene membrane (20 µm) at 10 psi. Discontinuous diafiltration was conducted, such that it was repeatedly diluted to the original volume (100 mL), using distilled water until the conductivity of the filtered solution was <0.05 mS cm⁻¹ [19].

Emulsifying activity

Emulsifying activity (EA) was determined for purified BEs and cell-free supernatants [5]. Samples (0.4 mL) were placed in 10-mL glass tubes containing 2.6 mL buffer mix (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, pH 7.0); 40 µL of n-hexadecane and 2-methylnaphthalene mixture (1:1 v/v) was then added. Tubes were vortexed for 2 min. Optical density was determined in a Varian Cary 50 UV-Vis spectrophotometer (Agilent, USA). One emulsifying unit (EU) was defined as the capacity of 1 mL of sample to raise the optical density measured at 600 nm by 0.1 units.

Kinetic parameters of production and growth

Volumetric production rate (EU (mL h)⁻¹, q_p) was calculated using the following:

$$q_p = \frac{EA_{\max}}{t_f} \quad (1)$$

where EA_{\max} is the maximum emulsifying activity (EU mL⁻¹) and t_f is cultivation time (48 h). Growth kinetic

parameters were estimated by fitting the reparameterized Gompertz model [20] based on the following equation:

$$y = Ae^{-e^{\left(\frac{\mu}{\lambda}(\lambda-t+1)\right)}} \quad (2)$$

where $y = \ln\left(\frac{CV}{VC_0}\right)$, A is the asymptote defined as

$A = \ln(CV_{\max}/VC_0)$, μ is the maximum specific growth rate (h^{-1}), λ is lag time (h), t is time (h), VC is growth at time t ($CFU\ mL^{-1}$), VC_0 is initial growth ($CFU\ mL^{-1}$) and VC_{\max} is maximum growth ($CFU\ mL^{-1}$).

Bacterial growth

Plate dilution technique was used to determine bacterial growth. All dilutions were inoculated on trypticasein soy agar and incubated (30 °C; 48 h). Biomass was determined by dry weight. Cells were separated from the broth by centrifugation (10,000×g, 4 °C, 20 min) [17], and the pellet was then suspended in distilled water and dried in a temperature-controlled oven (24 h, 60 °C). Subsequently, biomass was determined using an analytical balance (OHAUS Pioneer, OHAUS, USA).

Characterization of bioemulsifiers

Analysis of total carbohydrates and soluble protein

Cell-free supernatants were analysed for total carbohydrates using the sulphuric acid–phenol method [21] and soluble protein using the Bradford method [22].

Surface tension

Surface tension of cell-free supernatants was determined with a SensaDyne QC6000 bubble tensiometer (Chem-Dyne Research Corporation, USA), using water and ethanol as references (25 °C).

Size-exclusion chromatography

Molecular weight distributions of purified BE samples (5 mg) were acquired using an Agilent 1260 series liquid chromatograph equipped with refractive index detector (RID) and two PL aquagel-OH (Waters, USA) columns in series placed in a thermostat at 25 °C and calibrated with polyethylene glycol (PEG) standards (Agilent, USA). Deionised water (Milli-Q-UV, Merck) was used as mobile phase at 0.8 mL min⁻¹ flow. Samples were dissolved in the mobile phase and filtered (0.45-µm filter) before injection into the chromatograph.

Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded using a Spectrum RXI spectrometer (Perkin Elmer, USA) on KBr discs (1:100 w/w) in the 4000–400 cm⁻¹ wavelength range.

¹H NMR analysis

¹H NMR spectra were recorded for purified BEs using a unity spectrometer 9.4 T MR (Varian, USA) at 400 MHz using deuterated water as a solvent. Chemical shift of ²H₂O was at 5.79 ± 0.01 ppm.

Elemental analysis

Total carbon, hydrogen, nitrogen and sulphur contents of purified BEs were determined using a 2400 elemental analyzer (Perkin Elmer, USA).

Stability studies

Stability studies were performed using purified BE solutions in distilled water (500 mg L⁻¹). For saline stability, BE solutions were supplemented with different NaCl concentrations (from 10, 20, 40 and 50 g L⁻¹). For pH stability, pH of each BE solution was adjusted to 3, 5, 7, 9, and 10 by the addition of 2 M HCl or 2 M NaOH with gentle homogenization. For temperature stability, BE solutions were kept at 40, 60, 80 and 121 °C for 30 min, and then placed at room temperature (around 25 °C). A solution of each BE (0 g NaCl L⁻¹, pH 7.0 and 25 °C) was used as a control. Emulsifying activity (EA) of BE solutions were determined. Relative emulsifying activity (EA_R) was then calculated as follows:

$$EA_R = \frac{EA_T}{EA_C} \quad (3)$$

where EA_T is the emulsifying activity of the treatment and EA_C is the emulsifying activity of its control.

Statistical analysis

Levenberg–Maquard estimation algorithm was used for non-linear adjustment of the reparameterized Gompertz model. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc tests were performed ($\alpha=0.05$). t tests were performed to compare two means of independent groups ($\alpha=0.05$). ANOVA and multiple comparisons versus control group (Dunnett's method) were performed for stability studies ($\alpha=0.05$).

Statistical analysis was tested with SigmaPlot 12.5 software (Systat Software Inc, 2011).

Results and discussion

Bioemulsifier production kinetics in airlift bioreactor

Most bioemulsifier-producing microorganisms use hydrophobic carbon sources. *Acinetobacter venetianus* RAG-1, for example, grows not only on a variety of hydrophobic carbon sources but also on hydrophilic carbon sources [8]. To determine the capacity of *A. bouvetii* UAM25 to produce bioemulsifiers, hydrophilic (ethanol, E), hydrophobic (waste cooking oil, WCO) and hydrophilic–hydrophobic (glycerol–hexadecane, GH) carbon sources were assayed. Figure 1 shows the production kinetics of BEs by *A. bouvetii* UAM25 in ALBs. *A. bouvetii* UAM25 produced BEs using the three carbon and energy sources tested. Figure 1 shows that emulsifying activity (EA), an indirect measure of BE production, was increased as bacterial growth was increased. This result is consistent with emulsan production [8] and a typical behaviour of a primary metabolite [6]. Most BE productions are reported to be growth associated [23]. The EA remained constant during the stationary phase of *A. bouvetii* UAM25, which indicated that BE production had ended. Therefore, BE production was growth-associated regardless of the carbon source.

The kinetic parameters of BE production and growth of *A. bouvetii* strain UAM25 were estimated as shown in Table 1. Maximum growth (CFU_{max}), biomass (X) and specific growth rate (μ) were similar regardless of the nature, hydrophobic or hydrophilic, of the carbon and energy source. Studies on BE production reported different μ values; for example, *Agrobacterium* strain C58C1 pTFS40 growing in sucrose-based defined media had a μ of 0.27 h^{-1} [24]. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 grew in sunflower oil with a μ of 0.16 h^{-1} [25], *A. venetianus* RAG-1 in ethanol with a μ of 0.2 h^{-1} [8] and *Acinetobacter baylyi* ADP1 with glucose presented a μ of 0.30 h^{-1} [26]. Taking these reports as a reference, μ for *A. bouvetii* UAM25 was similar or higher than other species belonging to the *Acinetobacter* genus. This capacity demonstrates the metabolic potential of *A. bouvetii* UAM25 to degrade different carbon sources.

It is worth noting that BE produced using waste cooking oil (BE_W) showed the highest maximum emulsifying activity (EA_{max} , $19.0 \pm 0.4\text{ EU mL}^{-1}$) and volumetric production rate (q_p) compared to BE produced with ethanol (BE_E) and

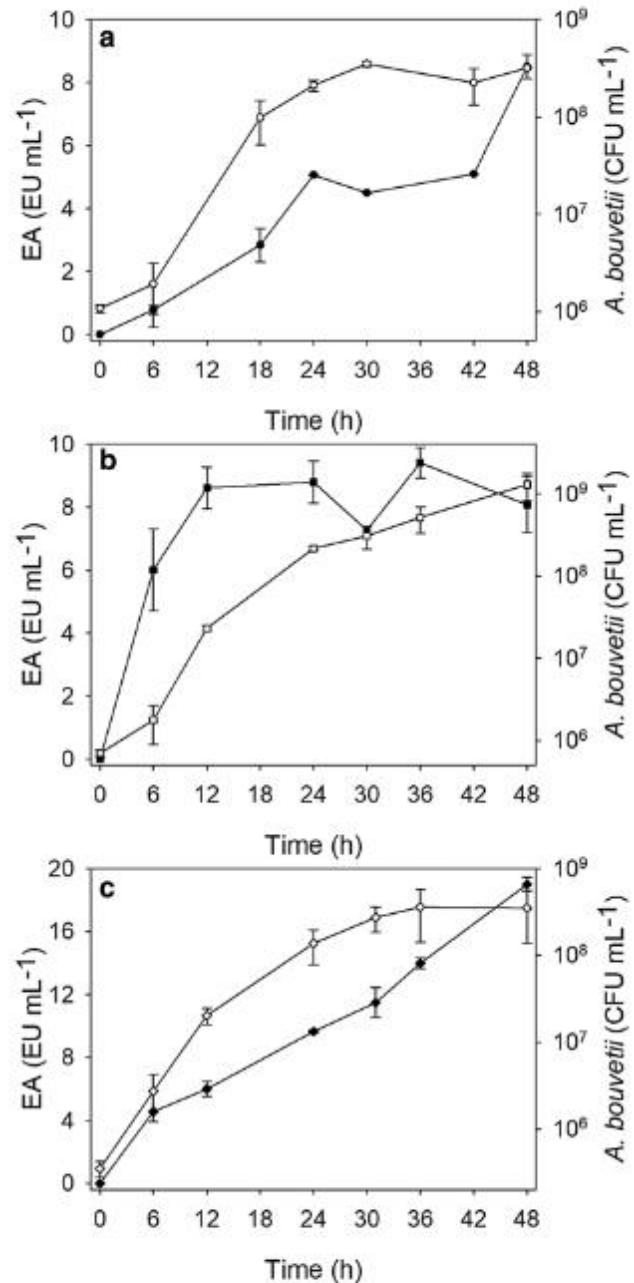


Fig. 1 Bioemulsifier production kinetics (filled circle, filled square, filled rhombus) and growth kinetics (opened circle, opened square, opened rhombus) in airlift bioreactors with three different carbon sources: ethanol (a), a glycerol–hexadecane mixture (b) and waste cooking oil (c). Each point represents the average value of two replicates and bars indicate the standard deviation

glycerol–hexadecane mixture (BE_{GH}). Such differences in EA_{max} could be due to higher production of BE_W over BE_E and BE_{GH} . To prove this, the three BEs were purified and characterised.

Table 1 Kinetic parameters of bioemulsifier production and growth

Carbon source	EA _{max} EU mL ⁻¹	q _p EU (mL h) ⁻¹	CFU _{max} CFU mL ⁻¹	μ h ⁻¹	X mg
Ethanol	8.5 ± 0.4 ^b	0.18 ± 0.01 ^b	3.2 ± 0.1 × 10 ⁸	0.42 ± 0.05	80 ± 25
Glycerol–hexadecane	9.4 ± 0.5 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	12.9 ± 4.7 × 10 ⁸	0.31 ± 0.04	103 ± 5
WCO	19.0 ± 0.4 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	3.5 ± 2.1 × 10 ⁸	0.38 ± 0.04	87 ± 12

Different letters indicate significant differences ($\alpha = 0.05$, Tukey's test)

EA_{max} maximum emulsifying activity, q_p production rate, CFU_{max} maximum growth, μ maximum specific growth rate, X biomass. Results are expressed as the estimate ± SE. Biomass results expressed as the average ± SD

Table 2 Biochemical composition, emulsifying activity and production of bioemulsifiers by *A. bouvetii* UAM25

	Total carbohydrates (mg L ⁻¹)		Soluble protein (mg L ⁻¹)		Emulsifying activity		Purified BE (mg L ⁻¹)
	CFS	Purified BE	CFS	Purified BE	CFS (EU mL ⁻¹)	Purified BE (EU mg ⁻¹)	
BE _E	96 ± 18 ^b	86 ± 19	31 ± 16 ^b	1.5 ± 1.1*	8.0 ± 1.6 ^b	46.6 ± 7.1 ^b	145 ± 15
BE _{GH}	69 ± 2 ^b	62 ± 6	19 ± 1 ^b	9.4 ± 2.7*	9.9 ± 0.2 ^b	49.5 ± 4.2 ^b	151 ± 41
BE _W	287 ± 24 ^a	114 ± 11*	251 ± 43 ^a	12.2 ± 5.6*	18.5 ± 0.6 ^a	76.2 ± 3.5 ^a	225 ± 2

Different letters indicate significant differences between BEs ($\alpha = 0.05$, Tukey's test) and asterisk indicates significant differences between CFS and purified BE ($\alpha = 0.05$, *t* test)

CFS cell-free supernatant, BE bioemulsifier, BE_E BE produced with ethanol, BE_{GH} BE produced with glycerol–hexadecane mixture, BE_W BE produced with waste cooking oil. Results are the average ± SD of two independent airlift bioreactors after 48 h of cultivation

Bioemulsifier characterisation

BE produced by species of *Acinetobacter* could be exopolysaccharides [8] or lipopeptides [27]. To determine the nature of BE produced from *A. bouvetii* UAM25, total carbohydrates and soluble protein were quantified. Table 2 shows biochemical composition and EA of cell-free supernatant and purified BE, plus the amount of purified BE by each ALB (1 L, 48 h of cultivation). In cell-free supernatant (CFS), total carbohydrate concentrations were greater than total soluble protein concentrations with the three carbon sources. Therefore, a carbohydrate purification procedure was applied. Soluble protein in purified BE was less than CFS, but EA did not decrease. This unexpected result suggests an absence of lipopeptides in BEs by *A. bouvetii* UAM25. On the other hand, the highest amount of soluble protein was measured in CFS with WCO, whereas pH (6.18 ± 0.19) was lower than the two other CFS (6.80 ± 0.13 in BE_E and 7.11 ± 0.12 in BE_{GH}). These results suggest the presence of free fatty acids. Probably, free fatty acids were released due to triacyl glyceride enzymatic hydrolysis, the main component of WCO; the enzymes that catalyse triacyl glyceride hydrolysis, known as lipases, are of great importance for their potential application in organic synthesis [28, 29]. Other species of *Acinetobacter* genus, such as *A. baylyi* [28], *Acinetobacter* sp. XMZ-26 [30] and *Acinetobacter* sp. [31], have been reported to be lipase producers. To our

knowledge, this report is the first to suggest that *A. bouvetii* can produce lipases.

On the other hand, BE_W showed the highest EA in CFS (18.5 ± 3.5 EU mL⁻¹) and purified BE (76.2 ± 3.5 EU mg⁻¹). BE_E and BE_{GH} showed similar EAs in CFS and purified BE (Table 2). Significant differences ($P > 0.05$) were not observed in BE production. *A. bouvetii* UAM25 produced an average of 173 mg L⁻¹ BE using three carbon sources (Table 2). Amani and Kariminezhad [6] reported a BE yield of 900 mg L⁻¹ and Su et al. [8] reported a yield of 60 mg L⁻¹. On the other hand, total carbohydrate concentrations were similar after carbohydrate purification procedure for all BEs. This suggests that BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 were mainly composed of exopolysaccharides. *Acinetobacter* species produce exopolysaccharides, such as emulsan and rhamnolipids [32, 33]. Emulsan is a poly-anionic lipo-heteropolysaccharide produced by *A. calcoaceticus* PTCC 1318 [6] and *A. venetianus* RAG-1 [8]. Emulsan and rhamnolipids can decrease the surface tension of culture medium [32, 33]. The expected decrease in surface tension of CFS was not observed, just an average value of 67.9 ± 8.2 mN m⁻¹. Emulsan has been reported to decrease surface tension of supernatants from 70 to 27 mN m⁻¹ [6] and rhamnolipids by *A. junii* BD from 70 to 31 mN m⁻¹ [32]. BEs are high molecular weight biosurfactants able to form stable emulsions with hydrocarbons; unlike low molecular weight biosurfactants, BEs do not reduce surface tension [3].

Table 3 Molecular weights of bioemulsifiers produced by *A. bouvetii* UAM25

	M_{n1} (kDa)	PDI ₁	M_{n2} (kDa)	PDI ₂
BE _E	3999 ± 48 ^a	1.05	352 ± 17 ^b	1.27
BE _{GH}	4320 ± 72 ^a	1.04	485 ± 39 ^{ab}	1.14
BE _W	3279 ± 125 ^b	1.03	551 ± 9 ^a	1.16

Different letters indicate significant differences ($\alpha=0.05$, Tukey's test)

M_n number-average molecular weight, PDI polydispersity index, BE bioemulsifier, BE_E BE produced from ethanol, BE_{GH} BE produced from glycerol-hexadecane mixture, BE_W BE produced from waste cooking oil. Results are the average ± SD of two independent measurements

Therefore, BEs by *A. bouvetii* UAM25 are related to the high molecular weight group, which was corroborated by SEC analyses. Table 3 shows the high molecular weights of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25, with the observation of two bands in the chromatograph. M_{n1} in particular has a narrow polydispersity index (1.04) which might indicate high purity. The determination of two distributions for each sample (M_{n1} and M_{n2}) indicates two main components in the BEs (average molecular weights 4,866 ± 533 and 462 ± 101 kDa, respectively). This is in agreement with that reported for emulsan, with an average molecular weight of 1000 kDa [8], formed as a mixture of two polymers of approximately 80% lipopolysaccharide and 20% as a high molecular weight exopolysaccharide [34]. These results indicate that BEs by *A. bouvetii* UAM25 have a molecular structure with different molecular weight and different surface activity compared to other reported BEs.

On the other hand, the composition of BEs was studied by FTIR analysis and Fig. 2a shows a representative spectrum for BE_E. All spectra displayed a broad band at 3000–3500 cm⁻¹ assigned to hydroxyl groups [35], and another broad band at 1000–1150 cm⁻¹ representative of –C–O and –C–O–C– groups which is a typical spectra of carbohydrates [36]. In addition, bands for C–H assigned to aliphatic chains were observed in the 2800–3000 cm⁻¹ region [37]. The presence of methylene and methyl groups was confirmed at 1300–1480 cm⁻¹ [3, 36]. Another strong absorption band at 1641–1648 cm⁻¹ revealed the presence of carbonyl moieties in the IR absorption frequency characteristic of polysaccharides [38, 39]. The bands observed in the 674–900 cm⁻¹ region denoted the characteristic peak for heteropolysaccharide compounds, according to Rani et al. [39]. An absorption band at 1536–1546 cm⁻¹ was assigned to the stretching of –C–N– bond, and that at 512–529 cm⁻¹ was characteristic of sugar derivatives [3, 39]. The FTIR analyses reveal the presence of carbohydrates and aliphatic chains which substantiate that BEs were lipo-heteropolysaccharides.

¹H NMR of BE_E samples, shown in Fig. 2b as a representative spectrum, presented a characteristic signal between 0.80 and 0.97 ppm for –CH₃ groups and between 1.00 and 1.40 ppm indicative of aliphatic chains [3, 40, 41]. These data corroborated the FTIR, with the presence of aliphatic alkyl chains in the chemical structure of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25. The signal from 1.90 to 2.00 ppm also suggests the presence of –CH₃ groups of *O*-acetyl, while that at 2.00–2.25 ppm indicate –CH₃ in acetamide pendant groups [42]. A broad signal from 3.5 to 4.5 ppm was assigned to protons in a carbohydrate structure where –OH groups of glycolipids that typically occur in the range of 3.3–4.8 ppm could be observed [40, 42, 43]. The polysaccharide structure was confirmed by the signal at 5–5.3 ppm assigned to anomeric protons [42]. Therefore, the analysis of ¹H NMR supported that of FTIR and indicated that all BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 were lipo-heteropolysaccharides.

The FTIR and ¹H NMR analyses also suggest that BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 only differ in their aliphatic chains with respect to other BEs. In this regard, BE_W showed greater hydrophobic character compared to BE_E and BE_{GH}. Previous studies showed that fatty acid composition in aliphatic chains of emulsan varied using different carbon sources [44]. Waste cooking oil was analysed by GC–MS (results not shown) and 18 carbons of unsaturated fatty acids were identified. It could also be possible that *A. bouvetii* UAM25 used free fatty acids of WCO for the synthesis of BE_W. It has been observed that, after entry into the cell, free fatty acids are either catabolised or directly incorporated into complex lipids [45]. This increase in hydrophobic character might explain greater affinity for hydrophobic compounds, and thereby the increase in emulsifying activity of BE_W observed in Table 2. Furthermore, the elemental analysis of BEs (Table 4) revealed the presence of C 43.3 ± 4.1%, H 7.3 ± 0.9%, N 6.4 ± 3.7% and S 0.6 ± 0.1% by weight. It is notable that this is, to the best of our knowledge, the first study that deals with the elemental composition of BEs produced by *A. bouvetii*. BEs showed a similar elemental composition of C, S and O. BE_W showed a higher composition of H and lower N composition than BE_E and BE_{GH}. These data corroborated that BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 only differ in their aliphatic chains. On the other hand, CHN content was similar to that reported for exopolysaccharides produced by *Paenibacillus pabuli* ATSKP (37.5:5.90:8.28) [46] and CHNP content was different to that reported for the exobiopolymer of *A. haemolyticus* MG606 (10.4:2.6:1.7:0.3) [17]. The elemental analysis suggests that all BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 were similar macromolecules of complex high molecular weight lipo-heteropolysaccharides. The above-mentioned BEs, with high molecular weight, might form stable emulsions.

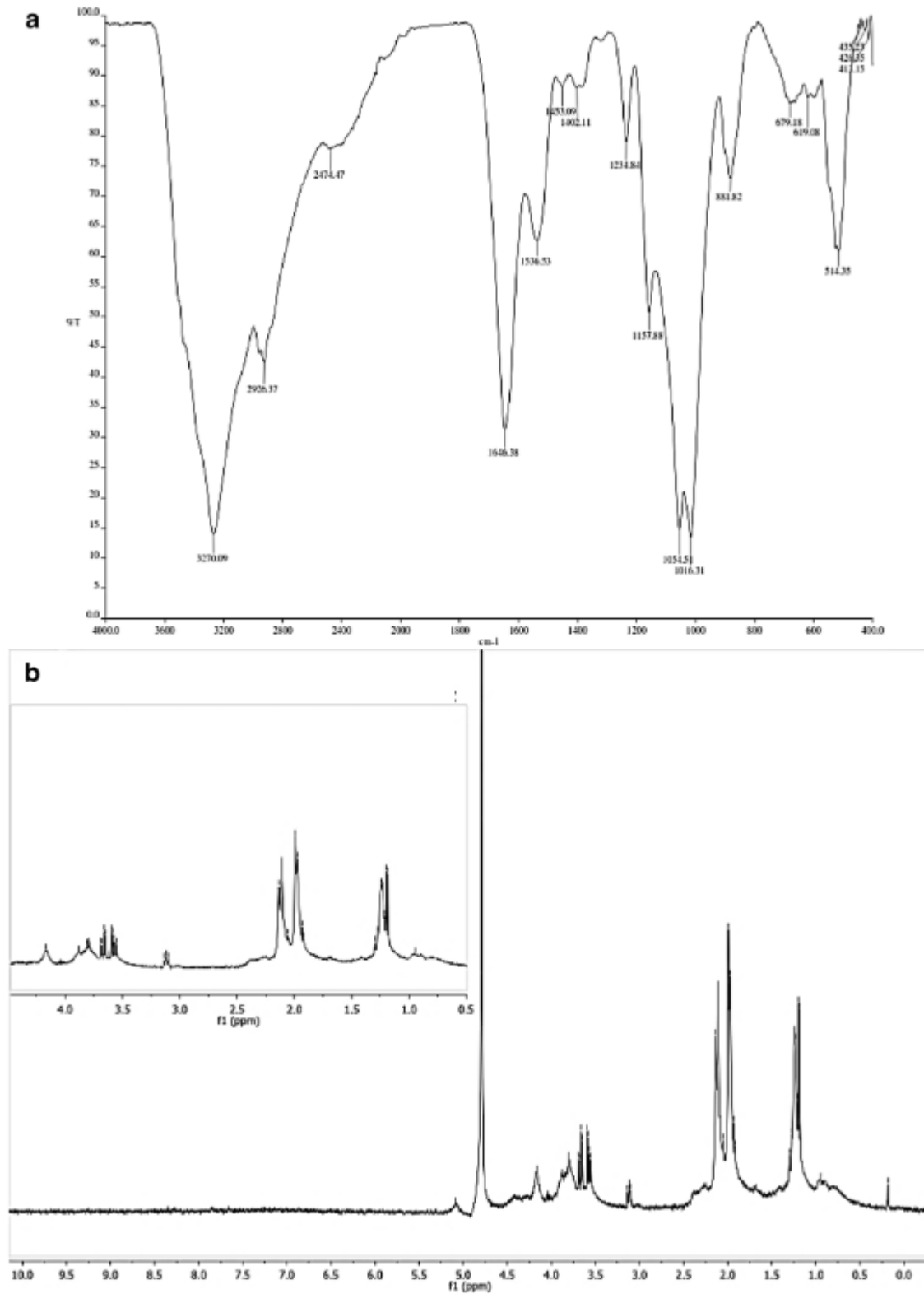


Fig. 2 FTIR spectrum (a) and ¹H NMR spectrum (b) of BE_E

Table 4 Elemental composition (expressed as the mass percentage distribution) of bioemulsifiers produced by *A. bouvetii* UAM25

	C	H	N	S	O
BE _E	40.98 ± 0.69	6.96 ± 0.02 ^b	9.03 ± 1.24 ^a	0.68 ± 0.17	42.34 ± 2.12
BE _{GH}	40.93 ± 0.01	6.63 ± 0.11 ^b	8.04 ± 0.39 ^a	0.54 ± 0.14	43.87 ± 0.41
BE _W	48.02 ± 7.64	8.26 ± 0.51 ^a	2.15 ± 1.21 ^b	0.69 ± 0.10	40.88 ± 9.45

Different letters indicate significant differences ($\alpha=0.05$, Tukey's test)

BE_E BE produced from ethanol, BE_{GH} BE produced from glycerol–hexadecane mixture, BE_W BE produced from waste cooking oil. Results are expressed as the average ± SD of two independent measurements

Bioemulsifier stability

Generally, glycolipid BEs show high stability at extreme conditions of salinity, pH and temperature [1, 2]. Figure 3 shows the effect of salinity (g NaCl L⁻¹), pH and temperature (°C) on relative emulsifying activity (EA_R) of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25. EA_R was calculated from EA of each treatment relative to their respective control (0 g NaCl L⁻¹, pH 7.0, 25 °C). The concentration of NaCl did not decrease EA_R of BEs. Instead, the EA_R of BE_{GH} increased at NaCl concentration of 20 and 50 g L⁻¹ (Fig. 3a). These results were similar to those reported for *Rhizobium tropici* LBMP-C01 exopolysaccharide stability [47] and *Bacillus subtilis* biosurfactant [48]. Ionic surfactants are very sensitive to electrolytes, this phenomenon occurs because the electrolytes directly affect the carboxylate groups by diminishing the EA [47, 49]. In our results, FTIR and NMR analyses indicated that BEs by *A. bouvetii* do not contain carboxylate groups explaining why the concentration of NaCl did not decrease EA_R of BEs. On the other hand, pH did not affect EA_R of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 (Fig. 3b). Similar results were reported for the stability of *A. radioresistens* KA53 alasan [9] and *Rhizobium tropici* LBMP-C01 exopolysaccharide [47]. A small increase in AE_R of BEs was observed at pH 10, probably because in alkaline solutions the biopolymers acquire anionic behaviour, which leads to a reduction in surface tension [47]. The temperature did not decrease EA_R of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 (Fig. 3c). Since BE_{GH} showed heat activation and emulsions are thermodynamically unstable systems, any increase in temperature will result in increasing of droplets' collision rates. However, high molecular weight BEs decrease this phenomenon due to size [49]. BEs of *Acinetobacter* species were reported as thermostable [3, 9]. Therefore, BE_E, BE_{GH} and BE_W were stable under all variations in salinity, pH and temperature. Previous studies have shown that high molecular

weight BEs are usually thermostable and extremely stable molecules [3, 9]. The experimental evidence shows the remarkable stability of BEs produced by *A. bouvetii* UAM25. Even more, the capability of BE produced by *A. bouvetii* UAM25 to emulsifying polycyclic aromatic hydrocarbon was recently demonstrated [19]. Therefore, the potential application in biotechnology for these novel BEs include bioremediation hydrocarbon-contaminated soil and water [3, 4].

This study demonstrated that the BEs generated by *A. bouvetii* UAM25 are produced as primary metabolites (Fig. 1). Furthermore, *A. bouvetii* UAM25 formed a biofilm with the three carbon sources tested. The above findings suggest that *A. bouvetii* UAM25 produces BEs with another purpose as this “non-mobile bacteria” could require a biofilm to access nutrients. Biofilm formation is characterised by a change in cellular hydrophobicity by the production of an exopolysaccharide that encloses the cells. Then, once growth reaches the stationary phase, the exopolysaccharide is released into the medium with emulsifying characteristics [50].

Conclusions

BEs produced by *A. bouvetii* UAM25 with three different carbon and energy sources were investigated with regard to their production form, physical properties, chemical composition, and stability. BE production was characterised as growth associated. BEs were complex biopolymers of high molecular weight and lipo-heteropolysaccharide structure. BEs were stable under extreme changes in salinity, pH and temperature. Stability of BEs is important because it offers a great potential for biotechnological applications, such as bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil and water.

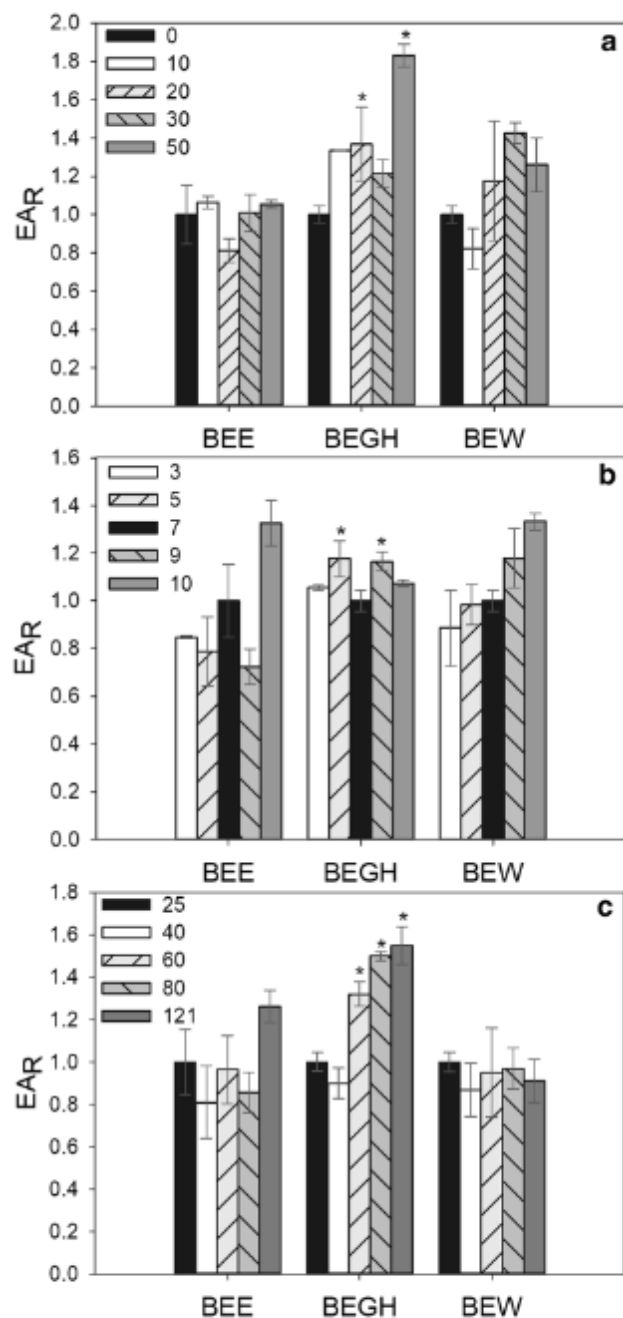


Fig. 3 Effect of salinity (a, g NaCl L⁻¹), pH (b) and temperature (c, °C) on relative emulsifying activity (EAR) of BE of *A. bouvetii* UAM25. Asterisk indicates significant differences ($\alpha=0.05$, Dunnett's method). BE_E BE produced with ethanol, BE_{GH} BE produced with glycerol-hexadecane mixture, BE_W BE produced with waste cooking oil. Results are the average \pm SD of two independent measurements

Acknowledgements This study was conducted with financial support (Scholarship nos. 266,016 and 321,085) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and partial support from Petróleos Mexicanos-Refinación.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This study did not involve experiments with human participants or experiments using animals.

References

- Manivasagan P, Sivasankar P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK (2014) Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:783–797. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1048-6>
- Zambry NS, Ayoib A, Noh NAM, Yahya ARM (2017) Production and partial characterization of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. R1. *Bioprocess Biosyst Eng* 40:1007–1016. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1764-4>
- Zhao Y, Chen L, Tian Z, Sun Y, Liu J, Huang L (2016) Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. *J Basic Microbiol* 56:184–195. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500487>
- Uzoigwe C, Burgess JG, Ennis CJ, Rahman PKSM. (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiol* 6:1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>
- Rosenberg E, Perry A, Gibson DT, Gutnick DL (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. *Appl Environ Microbiol* 37:409–413. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81320-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81320-4)
- Amani H, Karimzadeh H (2016) Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation. *Pet Sci Technol* 34:216–222. <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1118500>
- Jung J, Park W (2015) *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2533–2548. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y>
- Su WT, Chen WJ, Lin YF (2009) Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:271–279. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1957-0>
- Toren A, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E (2001) Emulsifying Activities of Purified Alasnan Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl Environ Microbiol* 67:1102–1106. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1102-1106.2001>
- Pirog TP, Konon AD, Shevchuk TA, Bilets IV (2012) Intensification of biosurfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on a hexadecane-glycerol mixture. *Microbiology* 81:565–572. <https://doi.org/10.1134/S0026261712050128>
- Affandi IE, Suratman NH, Abdullah S, Ahmad WA, Zakaria ZA (2014) Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. *Int Biodeterior Biodegrad* 95:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.009>
- Amodu OS, Ojumu TV, Ntwampe SKO (2016) Kinetic modelling of cell growth, substrate utilization, and biosurfactant production from solid agrowaste (*Beta vulgaris*) by *Bacillus licheniformis* STK 01. 94:2268–2275 <https://doi.org/10.1002/cjce.22631>
- de Jesus SS, Neto JM, Maciel Filho R (2017) Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred

- airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: a comparative study. *Biochem Eng J* 118:70–81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.019>
14. Denis B, Pérez OA, Lizardi-Jiménez MA, Dutta A (2016) Numerical evaluation of direct interfacial uptake by a microbial consortium in an airlift bioreactor. *Int Biodeterior Biodegrad* 119:542–551. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.012>
 15. Tzintzun-Camacho O, Loera O, Ramírez-Saad HC, Gutiérrez-Rojas M (2012) Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad* 70:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.009>
 16. Lizardi-Jiménez MA, Leal-Bautista RM, Ordaz A, Reyna-Velarde R (2014) Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalin Water Treat*. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.876670>
 17. Kaur T, Ghosh M (2015) *Acinetobacter haemolyticus* MG606 produces a novel, phosphate binding exopolysaccharide. *Carbohydr Polym* 132:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.002>
 18. Pirog TP, Korzh IV, Shevchuk TA (2009) Effect of cultivation conditions on the physicochemical properties of exopolysaccharide ethapolan. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 45:58–63. <https://doi.org/10.1134/S0003683809010098>
 19. Vázquez-Vázquez JL, Ortega-de la Rosa ND, Huerta-Ochoa S, Gimeno M, Gutiérrez-Rojas M (2017) Novel exopolysaccharide produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25: production, characterization and PHAs bioemulsifying capability. *Rev Mex Ing Química* 16:721–733
 20. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 6:1875–1881
 21. DuBois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers P, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
 22. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 23. Sivapathasekaran C, Sen R (2017) Origin, properties, production and purification of microbial surfactants as molecules with immense commercial potential. *Tenside Surf Det* 54:92–107
 24. Leth IK, McDonald KA (2017) Growth kinetics and scale-up of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:4895–4903. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8241-5>
 25. Henkel M, Schmidberger A, Vogelbacher M, Kühnert C, Beuker J, Bernard T, Schwartz T, Sylđatk C, Hausmann R (2014) Kinetic modeling of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 including cell density-dependent regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7013–7025. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5750-3>
 26. Kannisto M, Efimova E, Karp M, Santala V (2017) Growth and wax ester production of an *Acinetobacter baylyi* ADPI mutant deficient in exopolysaccharide capsule synthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44:99–105. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1872-1>
 27. Bao M, Pi Y, Wang L, Sun P, Li Y, Cao L (2014) Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environ Sci Process Impacts* 16:897. <https://doi.org/10.1039/c3em00600j>
 28. Uttatree S, Winayanuwattikun P, Charoenpanich J (2010) Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Appl Biochem Biotechnol* 162:1362–1376. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8928-x>
 29. Kar T, Destain J, Thonart P, Delvigne F (2012) Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:483–492. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0614-z>
 30. Zheng X, Wu N, Fan Y (2012) Characterization of a novel lipase and its specific foldase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26. *Process Biochem* 47:643–650. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.005>
 31. Moradi S, Razavi SH, Mousavi SM, Gharibzadeh SMT (2015) Optimization and partial purification of a high-activity lipase synthesized by a newly isolated *Acinetobacter* from offshore waters of the Caspian Sea under solid-state fermentation. *RSC Adv* 5:12052–12061. <https://doi.org/10.1039/C4RA10485D>
 32. Dong H, Xia W, Dong H, She Y, Zhu P, Liang K, Hickey WJ, Fields MW (2016) Rhamnolipids produced by indigenous *Acinetobacter junii* from petroleum reservoir and its potential. *Enhanced Oil Recovery* 7:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01710>
 33. Wu J, Zhang J, Wang P, Zhu L, Gao M, Zheng Z, Zhan X (2017) Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. *Bioprocess Biosyst Eng* 40:1–9. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1817-8>
 34. Mercaldi MP, Dams-Kozłowska H, Panilaitis B, Joyce AP, Kaplan DL (2008) Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromol* 9:1988–1996. <https://doi.org/10.1021/bm800239p>
 35. Santos DKF, Meira HM, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA (2017) Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochem* 54:20–27. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.020>
 36. Peele KA, Ch VRT, Kodali VP (2016) Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. *3 Biotech* 6:1–6. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0494-7>
 37. Balan SS, Kumar CG, Jayalakshmi S (2016) Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochem* 51:2198–2207. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.009>
 38. Chandankere R, Yao J, Choi MMF, Masakorala K, Chan Y (2013) An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem Eng J* 74:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.018>
 39. Rani RP, Anandharaj M, Sabhapathy P, Ravindran AD (2017) Physicochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. *Int J Biol Macromol* 96:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122>
 40. Raza ZA, Rehman A, Hussain MT, Masood R, Ul Haq A, Sadique MT, Javid A, Ahmad N (2014) Production of rhamnolipid surfactant and its application in bioscouring of cotton fabric. *Carbohydr Res* 391:97–105. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.03.009>
 41. Zou C, Wang M, Xing Y, Lan G, Ge T, Yan X, Gu T (2014) Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochem Eng J* 90:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.007>
 42. Barnhart D, Kaplan DL, Winter WT, Panilaitis BJ, Kiemle DJ (2012) Structural details of the polyelectrolytic exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus*

- RAG-I emulsan complex. *Carbohydr Polym* 88:257–262. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.006>
43. Kügler JH, Kraft A, Heißler S, Muhle-Goll C, Luy B, Schwack W, Syldatk C, Hausmann R (2015) Extracellular aromatic biosurfactant produced by *Tsukamurella pseudospumae* and *T. spumae* during growth on n-hexadecane. *J Biotechnol* 211:107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.424>
 44. Kim SY, Deok-Kun OH, Kim JH (1997) Biological modification of hydrophobic group in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-I emulsan. *J Ferment Bioeng* 84:162–164. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82548-2](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82548-2)
 45. Wakelin NG, Forster CF (1997) An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresour Technol* 59:37–43. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00134-4)
 46. Pooja KP, Chandra TS (2009) Production and partial characterization of a novel capsular polysaccharide KP-EPS produced by *Paenibacillus pabuli* strain ATSKP. *World J Microbiol Biotechnol* 25:835–841. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9954-0>
 47. Moretto C, Castellane TCL, Lopes EM, Omori WP, Sacco LP, de Macedo. Lemos EG (2015) Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. *Int J Biol Macromol* 81:291–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2015.07.056>
 48. Amani H, Sarrafzadeh MH, Haghighi M, Mehrnia MR (2010) Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. *J Pet Sci Eng* 75:209–214. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2010.11.008>
 49. Mohamed AIA, Hussein IA, Sultan AS, Al-Muntasheri GA (2018) Use of organoclay as a stabilizer for water-in-oil emulsions under high-temperature high-salinity conditions. *J Pet Sci Eng* 160:302–312. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2017.10.077>
 50. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S (2011) The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ* 26:101–112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00209

Matrícula: 2141801383

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL
BIOEMULSIFICANTE DE
Acinetobacter bouvetii UAM25
PARA SU PRODUCCIÓN Y
APLICACIÓN EN HIDROCARBUROS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 20 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMENEZ
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: NESTOR DAVID ORTEGA DE LA ROSA

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


Aprobar

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



NESTOR DAVID ORTEGA DE LA ROSA
ALUMNO

REVISÓ




DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



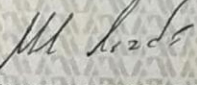
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



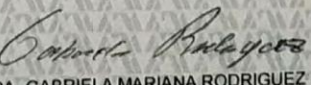
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL




DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMENEZ

VOCAL



DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

SECRETARIO



DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA