



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

"Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por *Bacillus* spp. en fermentación en medios sólido y líquido"

Para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en Biotec. Luisa Marcela Valdés Velasco

Director:

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Dr. Luis Víctor Rodríguez Durán

Ciudad de México a 01, abril 2022

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00260

Matrícula: 2163802544

Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por *Bacillus* spp. en fermentación en medios sólido y líquido.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 14:00 horas del día 1 del mes de abril del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
- DR. LUIS VICTOR RODRIGUEZ DURAN
- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
- DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA




LUISA MARCELA VALDES VELASCO
ALUMNA

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:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: LUISA MARCELA VALDES VELASCO

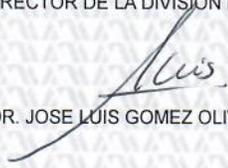
y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

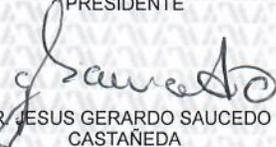
Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO
CASTAÑEDA

VOCAL

DR. LUIS VICTOR RODRIGUEZ DURAN

VOCAL

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

SECRETARIO

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA
BUENDIA

*A mis padres que me han acompañado siempre
Gracias por apoyarme, dejarme soñar, no cortar mis alas y seguir mis
locuras.*

Agradecimientos

Al Dr. Ernesto Favela por su asesoría, disponibilidad, paciencia, escucha, apoyo y confianza en el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Gerardo Saucedo por siempre tener la mejor disposición de escucharme, asesorarme ante mis inquietudes durante mi trabajo doctoral, por su tiempo brindado y paciencia.

Al Dr. Philippe Jacques por brindarme la oportunidad de laborar en su equipo de trabajo, orientación en mi estancia de investigación y artículo, y la confianza en la realización de mis actividades.

Al Dr. Jaime Vernon por colaborar con el uso del equipo texturómetro y al Dr. Gustavo Viniegra por motivarme a involucrarme en otros ámbitos.

A los Dres. Javier Barrios, Héctor Escalona, Gloria Trejo por la asesoría y disponibilidad.

A los Dres. Octavio Loera y Francisco Figueroa por hacerme parte del club de *Bacillus*, el cual fue de gran aprendizaje en todos los sentidos.

A la Dra. Arely Prado y Dr. Sergio Huerta por sus consejos y compartirme sus experiencias de vida.

A los Dres. Alba Cotes, Luis Rodríguez y Oscar Álvarez, por sus sugerencias en el escrito de mi tesis y por aceptar la invitación a ser parte del jurado.

Al Dr. Quentin Carboué por su crítica revisión al artículo publicado como requisito de grado. Al Dr. Darío Zambrano por su asesoría en la estimación del módulo de elasticidad. Al Mtro. Gerardo Santander por su disponibilidad y recomendaciones en el desarrollo de la mutagénesis y al Mtro. Cristian Mora por compartirme su sistema de cultivo en medio sólido.

A Anahí, Octavio, Carlos y William que me apoyaron y enseñaron bastante por medio de su servicio social.

A mis compañeros de la PP4 y TERRA por sus aportaciones, apoyo y momentos de alegría. También a los nómadas por brindarme su linda amistad.

A Sebastien Steels, Gregory Hoff, Ariane Theatre, Anthony Arguelles and Romain Thomas por su atención, orientación y apoyo en mi trabajo cuando estuve en TERRA.

A Nalle, Claris y Pao que me apoyaron mucho en la culminación de esta etapa tan voluble. También, a Dianis, el Coste, Leti, Yuya, Roddi, Fer, Gus, Jeka, Alejita, Brujis, Moni, entre otros amigos y amigas que se encuentran en varios lugares de este mundo, los cuales me han acompañado, escuchado y motivado siempre a seguir en la lucha por este proyecto afortunadamente hoy culminado.

A Pao, Mauro, Clau, Dani, Dianita, Pau, Edguitar, Cami, Ale, Angie y Kary que hicieron inolvidable mi estancia en Bélgica.

A mis hermanos. Uds han sido parte fundamental en la formación de quien soy, han fundado en mí, fortaleza, sueños y confianza.

A Nata Ruano y Cami Valdés por traer a Jose y Celeste a mi vida, dos seres de luz que me llenan de motivación, amor y felicidad.

A Miguel, por su compañía, apoyo, comprensión, amor, tolerancia; escucha y siempre hacerme ver el lado bueno de las situaciones.

Resumen

Los biosurfactantes (BS) lipopeptídicos producidos por *Bacillus* tienen aplicaciones en diferentes áreas de la industria. Los lipopéptidos (LP) se han producido principalmente en fermentación líquida (FML), la cual presenta formación de espuma asociada con la producción de BS y un incremento en la viscosidad del medio debido a la producción de exopolisacáridos, lo que provoca una baja transferencia de oxígeno. Dichas situaciones aumentan los costos de producción y bajan la concentración del producto. Por otro lado, la fermentación sólida (FMS) no presenta dichos problemas y son escasos pero satisfactorios los reportes de producción de LP en este tipo de cultivo, los cuales, en su mayoría han utilizado soportes naturales (no inertes), residuos agrícolas o medios de cultivo complejos, que dificultan la recuperación, purificación y análisis del producto. El objetivo fue desarrollar un bioproceso con alta producción de LP en FMS utilizando un medio definido adsorbido en un soporte inerte como la espuma de poliuretano (PUF) para facilitar el control del bioproceso, recuperación, análisis de los productos y comparación con la FML. De esta forma, identificar y comprender la relación entre los metabolismos primario y secundario; y algunos nutrientes limitantes con el bioproceso, ya que poco se les ha investigado.

En la parte I del trabajo se utilizó *B. subtilis* ATCC 6633 para las experimentaciones las cuales incluyen: mejorar la cepa por mutagénesis inducida, seleccionar el soporte inerte que más beneficia el bioproceso y evaluar el efecto C/N del medio de cultivo en la producción de los LP. Se encontró que la PUF, es el soporte que permitiría producir mayor cantidad de LP y se obtuvo que el nitrato de amonio y la relación C/N=17.1, es la condición que permitió la mayor concentración de LP. En la parte II se estudiaron diferentes cepas en FML y FMS, cuatro silvestres y una mutante (incapaz de desarrollar biopelícula). Las cepas silvestres revelaron una mayor producción de LP y biomasa, consumo de glucosa y una menor síntesis de metabolitos primarios en FMS que FML. Sin embargo, la cepa mutante presentó una producción ligeramente mayor de metabolitos primarios en FMS que FML. El análisis del balance de carbono mostró que el flujo de carbono se dirige principalmente a los LP en FMS, mientras que, en FML, se dirige a la producción de metabolitos primarios.

Se desarrolló un bioproceso en FMS con alta producción de LP de fengicina (2.7 g/L) e iturina (1.2 g/L) utilizando un medio definido adsorbido en un soporte inerte por la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Las concentraciones alcanzadas son mayores a las reportadas en la literatura por cepas silvestres. Este es el primer reporte que utiliza en FMS PUF en la producción de LP, facilitando la recuperación y análisis del producto como de glucosa y biomasa. Además, es el primer estudio que presenta la producción cuantitativa de fengicina por FMS.

Abstract

The lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus*, have applications in different fields of industry. Lipopeptides have been mainly carried out in submerged fermentation which presents foaming associated with biosurfactant production. Besides, some increase in medium viscosity is due to the production of exopolysaccharides by some strains. Foaming and high viscosity decrease oxygen transfer, increasing the production costs and diminishing product concentration. On the other hand, solid-state fermentation does not present such problems and Reports of lipopeptide production in solid-state fermentation are scarce but satisfactory and have mostly used natural supports (non-inert material), agro-industrial residues, or complex culture media, which hinders recovery, purification, and analysis of the product. The aim of the work was to develop a bioprocess with higher LP production in solid-state fermentation with a defined medium adsorbed on an inert support such as polyurethane foam. The above facilitate the control of the bioprocess, recovery, analysis of the products, and comparison with submerged fermentation. In this way, identify and understand the relationship between secondary and primary metabolism and some limiting nutrients with the bioprocess.

Part I of this work used *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for the tests as improvement of the strain, selection of the most favorable solid support, and the effect of C/N on LP production. Polyurethane foam is the support that could allow the greatest lipopeptide production. The ammonium nitrate and C/N 17.1, was the most favorable condition for the bioprocess. For Part II, different strains were studied in solid and submerged fermentation, four wild and one mutant strain (unable to develop biofilm). The wild-type strains revealed a higher production of lipopeptides and biomass, glucose consumption, and a lower synthesis of primary metabolites in solid-state fermentation than in submerged. However, the mutant strain produced a slightly higher production of primary metabolites in solid fermentation than in submerged. The analysis of the carbon balance showed that the carbon flux is directed mainly to lipopeptides in solid-state fermentation, whereas, in submerged fermentation, it is directed to the production of primary metabolites.

In the present work, a bioprocess is developed in solid-state fermentation with high lipopeptide production, mainly fengycin (2.7 g/L) and iturin (1.2 g/L) using a defined medium adsorbed on inert support by the *Bacillus subtilis* ATCC 21332. The concentrations reached are higher than those reported in the literature by wild strains. To the best of my knowledge, this is the first report that uses polyurethane foam in solid-state fermentation for lipopeptide production, facilitating the recovery and analysis of the product, as well as glucose and biomass. Furthermore, this is the first study to present the quantitative production of fengycin by solid fermentation.

Índice de contenido

Introducción	1
1. Revisión bibliográfica	3
1.1 Generalidades de los surfactantes	3
1.2 Generalidades de los biosurfactantes.....	4
1.2.1 Biosurfactantes versus surfactantes químicos	5
1.2.2 Clasificación de los biosurfactantes.....	6
1.3 Lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp.....	7
1.3.1 Familias y variantes.....	8
1.3.2 Aplicaciones	9
1.3.3 Biosíntesis de lipopéptidos	10
1.3.4 Regulación de la biosíntesis	13
1.4 Producción de lipopéptidos y estrategias de su mejoramiento	15
1.4.1 Fermentación en medio sólido versus medio líquido	16
1.4.2 Mejoramiento de cepas	17
1.4.3 Requerimientos nutricionales y operacionales.....	19
1.5 Recuperación y análisis de los lipopéptidos.....	23
2. Justificación.....	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. Estrategia experimental.....	28
<i>ETAPA I</i>	29
6. Mejoramiento de cepa.....	29
6.1 Materiales y métodos	29
6.1.1 Microorganismo.....	29

6.1.2 Conservación de la cepa	29
6.1.3 Radiación con luz ultravioleta y curva de supervivencia	30
6.1.4 Selección de los mutantes sobreproductores	30
6.1.5 Recuperación de lipopéptidos	31
6.1.6 Cuantificación de los lipopéptidos.....	32
6.1.7 Estabilidad de la mutante	32
6.1.8 Análisis estadístico	32
6.2 Resultados y discusión.....	32
6.2.1 Selección de mutantes	33
6.2.2 Estabilidad genética de la mutante	36
6.3 Conclusiones particulares	37
7. Caracterización y selección del soporte sólido	38
7.1 Materiales y métodos	38
7.1.1 Fermentación en medio sólido	38
7.1.2 Recuperación y cuantificación de lipopéptidos.....	39
7.1.3 Humedad y pH.....	39
7.1.4 Caracterización del soporte inerte.....	39
7.1.5 Análisis estadístico	42
7.2 Resultados y discusión.....	42
7.2.1 Comparación de soportes sólidos en la producción de lipopéptidos	42
7.2.2 Caracterización del soporte sólido.....	43
7.3 Conclusiones particulares	48
8. Evaluación del efecto de la relación C/N en la producción de los lipopéptidos	49
8.1 Materiales y métodos	49
8.1.1 Fermentación en medio sólido.....	49
8.1.2 Análisis de espectrometría de masas (UPLC–MS)	51
8.1.3 pH	51

8.1.4 Glucosa	51
8.1.5 Análisis estadístico	51
8.2 Resultados y discusión.....	51
8.2.1 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y C/N en la producción de lipopéptidos ...	51
8.2.2 Efecto de las diferentes concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno a una relación C/N constante.	53
8.2.3 Efecto de diferentes C/N manteniendo la concentración de la fuente de nitrógeno constante	54
8.2.4 Identificación de los lipopéptidos producidos	56
8.3 Conclusiones particulares	56
ETAPA II.....	57
9. Comparación de cepas <i>Bacillus</i> en fermentación sólida y sumergida.....	57
9.1 Materiales y métodos	57
9.1.1 Microorganismos	57
9.1.2 Fermentación sólida y líquida	58
9.1.3 Determinación de biomasa	58
9.1.4 Cuantificación de surfactina, fengicina e iturina	58
9.1.5 Análisis de las estructuras de los lipopéptidos.....	59
9.1.6 Análisis de glucosa y los metabolitos primarios derivados del piruvato.....	59
9.1.7 Análisis estadístico.....	59
9.2 Resultados y discusión.....	59
9.2.1 Producción de lipopéptidos por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633. en fermentación sólida y líquida	59
9.2.2 Producción de lipopéptidos por <i>Bacillus</i> spp. en fermentación sólida y líquida	60
9.2.3 Cinéticas de producción de lipopéptidos, crecimiento de biomasa y consumo de carbono en fermentación sólida y líquida	63
9.2.4 Producción de metabolitos primarios.....	66
9.2.5 Balance de carbono.....	68

9.3 Conclusiones particulares	69
10. Conclusiones generales	71
11. Perspectivas	72
12. Referencias.....	73
13. Anexos.....	94
Anexo A. Evaluación de métodos de selección para los mutantes.	94
Anexo B. Estandarización del método de análisis: Actividad emulsificante.	100
Anexo C. Estandarización del método de recuperación de los lipopéptidos a partir de la espuma de poliuretano.	102
Anexo D. Curvas de secado de diferentes densidades de espuma de poliuretano.....	103
Anexo E. Curvas de tensión-deformación de diferentes densidades de espuma de poliuretano.	104
Anexo F. Sustrato limitante del crecimiento microbiano en FMS y FML.	105
Anexo G. Correlaciones de Pearson.	106

Índice de figuras

Figura 1. Variantes de las familias de lipopéptidos de <i>Bacillus</i> más importantes. a) Surfactina. b) Iturina. c) Fengicina (Inès & Dhouha, 2015).	8
Figura 2. Biosíntesis de surfactina. a) Complejo sintetasa de surfactina tomada de Wu et al. (2017). b) Reacción de lipoiniciación tomada de Kraas et al. (2010).	12
Figura 3. Cascada reguladora de la expresión del operón de surfactina tomada de Jacques, 2011.	14
Figura 4. Estrategia experimental.....	28
Figura 6. Curva de supervivencia. Porcentaje de supervivencia y UFC/mL para cada tiempo de exposición. Se consideró el tiempo cero como el 100%.	33
Figura 7. Índice de potencia de los mutantes. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633; S2: <i>B. subtilis</i> sp. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	34
Figura 8. Producción de LP a las 42 h por 11 mutantes en medio sólido. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633; S2: <i>B. subtilis</i> sp. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	35
Figura 9. Producción de LP durante 60 h en medio sólido. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633; S2: <i>B. subtilis</i> sp.	36
Figura 10. Identificación de la velocidad constante de secado y humedad crítica.	40
Figura 11. Comparación de soportes en FMS y FML	43
Figura 12. Capacidad de retención de agua de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m ³ . Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por quintuplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	44
Figura 13. Porcentaje de a) Medio de cultivo y b) Agua recuperada después del prensado de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m ³ . Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	44
Figura 14. Lipopéptidos recuperados de las densidades de PUF 17 y 27 Kg/m ³ . Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	45
Figura 15. Efecto de la PUF en la a). Tasa específica de crecimiento y b). Tiempo de fase Lag. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).	46

Figura 16. Módulo de elasticidad de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m ³ . Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).....	47
Figura 17. Efecto de la relación C/N y fuente de nitrógeno en la producción de LP. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).....	52
Figura 18. C/N=11.4 bajo diferentes concentraciones de glucosa y nitrato de amonio. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).....	53
Figura 19. Efecto del C/N en la producción de lipopéptidos con 48 h de cultivo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).....	54
Figura 20. Espectros de masas de los lipopéptidos producidos en FMS.....	55
Figura 21. Producción de (A) surfactina, (B) fengicina e (C) iturina por varias cepas de <i>Bacillus</i> bajo FMS y FML. Las muestras se tomaron después de 72 h de cultivo. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).	61
Figura 22. Perfiles de producción de A) surfactina, B) fengicina, C)iturina, D) metabolitos primarios, E) biomasa y F) glucosa por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (rombos), <i>B. velezensis</i> GA1 (cuadrados) y <i>B. subtilis</i> BBG 111 (círculos) en FMS (símbolos negros) y FML (símbolos blancos).	65
Figura 23. Perfiles de producción de A) acetoína, B) 2,3 -butanodiol, C) lactato, D) acetato, y E) metabolitos primarios por <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 (rombos), <i>B. velezensis</i> GA1 (cuadrados) y <i>B. subtilis</i> BBG 111 (círculos) en FMS (símbolos negros) y FML (símbolos blancos).	67
Figura A.1 Tiempo de incubación del hongo. a) 0 h. b) 3 días.....	94
Figura A.2. Efecto de las muestras en el crecimiento del hongo recién inoculado. a) 24 h y b) 48 h después de la adición de las respectivas muestras. Acercamiento a la muestra de Bs a las c)24 h y d) 48 h. Bs: cultivo de <i>B. subtilis</i> con 24 h de crecimiento; 8,8, 17 y 35 son las concentraciones de LP crudos en g/L.....	95
Figura A.3. Efecto de las muestras en el crecimiento del hongo con 3 días de incubación previos. a) 24 h y b) 48 h después de la adición de las respectivas muestras. Acercamiento a la muestra Bs a las c) 24 h y d) 48 h. Bs: cultivo de <i>B. subtilis</i> con 24 h de crecimiento; 8,8, 17 y 35 son las concentraciones de LP crudos en g/L.	96
Figura A.4. Medida del halo de emulsión.	97

Figura A.5. Actividad hemolítica durante 1,2,3,4 y 8 días.....	98
Figura A.6. Actividad hemolítica con diferentes concentraciones de LP crudos (1.1, 2.2, 4.4, 8.8, 17 y 35 g/L).....	99
Figura A.7. Absorbancia de diluciones sin y con el proceso de precipitación ácida.....	100
Figura A.8. Comportamiento lineal de las absorbancias.....	101
Figura A. 9. Curva estándar para estimar los LP en mg Eq SF/mL	101
Figura A.10. Recuperación de lipopéptidos por diferentes técnicas.	102
Figura A.11. Curvas de velocidad de secado de un cilindro de PUF de densidad a)17, b)20, c)24, d)27 y e)35 Kg/m ³ en función del contenido de humedad.	103
Figura A.12. Curva de velocidad de tensión-deformación de PUFs de densidad a)17, b)20, c)24, d)27 y e)35 Kg/m ³ . La zona indicada con un círculo corresponde a la zona elástica del material.	104
Figura A.13. Coeficientes de correlaciones de Pearson entre lipopéptidos y biomasa, lipopéptidos y metabolitos primarios y lipopéptidos y glucosa.....	106

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los BS según su estructura química y origen microbiano.....	6
Tabla 2. Técnicas de extracción y purificación de LP.....	23
Tabla 3. Métodos analíticos de LP.	24
Tabla 4. Medio de cultivo para la FMS.	31
Tabla 5. Efecto de diferentes densidades de PUF en el cambio de pH del agua y en el medio de cultivo	46
Tabla 7. Medios de cultivo con diferentes C/N y fuentes de nitrógeno.	49
Tabla 8. C/N=11.4 bajo diferentes concentraciones de glucosa y nitrógeno.....	50
Tabla 9. Medios de cultivo con diferentes C/N variando la concentración de glucosa.	50
Tabla 10. Asignación de los compuestos homólogos de familias de lipopéptidos producidos por varias cepas de Bacillus en FMS y FML.....	62
Tabla 11. Rendimientos máximos de crecimiento y producción de lipopéptidos y metabolitos primarios por B. subtilis ATCC 21332, B. velezensis GA1 y B. subtilis BBG 111 en FMS y FML.	68
Tabla 12. Balance de carbono del crecimiento y producción de metabolitos por B. subtilis ATCC 21332, B. velezensis GA1 y B. subtilis BBG 111 en FMS y FML.....	69
Tabla A.1. Composición del agar sangre (MCD LAB).....	97
Tabla A.2. Técnicas de recuperación de lipopéptidos propuestas.....	102

Glosario de abreviaturas

AE	Actividad emulsificante
BS	Biosurfactantes
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
CMC	Concentración micelar crítica
CRA	Capacidad de retención de agua
CSF	Factor de competencia y esporulación
E	Módulo de elasticidad
Eq surfactina	Equivalentes de surfactina
FML	Fermentación en medio líquido
FMS	Fermentación en medio sólido
gms	Gramos de materia seca
gmsf	Gramos de materia seca final
GOS	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
IP	índice de potencia
LP	Lipopéptidos
NRPSs	Sintetasas de péptidos no ribosomales
ORF	Fragmento de lectura abierto
PCP	Proteína portadora de peptidilo
PKS	Sintasas de policétido
PUF	Espuma de poliuretano
PUFcu	Unidades cilíndricas de espuma de poliuretano
UE	Unidad emulsificante
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
ε	Deformación
μ_{CO_2}	Tasa específica de producción de CO ₂
μ	Tasa específica de crecimiento
σ	Tensión
4'-PPTasa	4'fopopanteteiniltransferasa

Introducción

La investigación de la producción de biosurfactantes lipopeptídicos ha sido de gran interés en los últimos años debido a la variedad de aplicaciones de estas biomoléculas en la industria farmacéutica, cosmética, biomédica, alimentaria, química, petrolera, de biorremediación, cuidado personal, entre otros (Rangarajan et al., 2015; Slivinski et al., 2012; H. Zhao et al., 2017). Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfífilas producidas por microorganismos; dentro de estos, se encuentran los lipopéptidos (Banat et al., 2021). Los lipopéptidos (LP) producidos por cepas del género *Bacillus* son los más estudiados y se encuentran agrupados en tres familias: surfactina, fengicina e iturina; todas ellas integradas por variantes con diferencias en su cadena peptídica y la estructura del ácido graso (de Souza et al., 2018).

La producción de LP ha sido muy estudiada en fermentación líquida (FML) a partir de medios de cultivo complejos (Datta et al., 2018). Este tipo de procesos presenta baja productividad debido a la formación de espuma, el incremento en la viscosidad del medio y la baja transferencia de oxígeno que genera también un incremento de costos de producción (Thomas et al., 2013). Para solucionar estos problemas, se han evaluado diferentes tipos de biorreactores para la producción de LP; tales como, el de discos giratorios, biopelícula y contactores de membrana de aire/líquido (François Coutte et al., 2017). La fermentación en medio sólido (FMS) también ha sido utilizada ya que presenta coeficiente de transferencia de oxígeno más alto en comparación con la FML debido al bajo contenido de agua (de 40 a 70%) y la mayor área superficial (Raghavarao et al., 2003). Además, en FMS no se favorece la generación de espuma (Piedrahíta-Aguirre & Monte Alegre, 2014).

La FMS ha sido utilizada satisfactoriamente para la producción de LP a partir de subproductos y residuos agroindustriales (Costa et al., 2018); sin embargo, este tipo de materiales dificulta la recuperación y purificación del producto (Lima-Pérez et al., 2019). Por lo tanto, en este trabajo se utilizó como soporte inerte espuma de poliuretano el cual se impregna con un medio de cultivo definido, facilitando la comprensión de la fisiología y bioquímica del microorganismo, el control del bioproceso y la recuperación del producto (Ooijkaas et al., 2000).

Entre las estrategias más utilizadas para incrementar la producción de los lipopéptidos y disminuir costos de producción y separación se encuentran: el uso de cepas sobreproductoras, mutantes o recombinantes y la optimización de las condiciones de cultivo (Mondragón, 2011). Esta tesis se desarrolló en dos etapas: la etapa I comprende la selección y caracterización de los soportes susceptibles de ser utilizados para los estudios de FMS, la evaluación del efecto de la

relación carbono/nitrógeno en la producción de LP por FMS y la mutagénesis inducida con luz ultravioleta para incrementar la producción de LP en FMS. La etapa II presenta la comparación de varias cepas de *Bacillus* para determinar las familias, compuestos homólogos y concentraciones de los LP producidos en FMS y FML; y la caracterización cinética de producción de biomasa, LP, algunos metabolitos primarios (lactato, acetato, acetoína y 2,3-butanodiol) y consumo de glucosa a partir de las cepas que presentaron los mayores y menores niveles de producción de LP en ambos tipos de cultivo. Lo anterior, con el fin de una mejor comprensión de la producción de LP en FMS y FML.

1. Revisión bibliográfica

1.1 Generalidades de los surfactantes

El término surfactante proviene de la contracción de la expresión en inglés SURFace ACTive AgeNT, en español agente tensioactivo. Esto implica que un surfactante reduce la energía libre de una superficie. Por ejemplo, la superficie del agua. Los surfactantes son moléculas anfifílicas, constituidos por dos motivos moleculares: una parte hidrofílica y una lipofílica. La primera es el componente que presenta afinidad hacia medios polares como el agua, mientras que la lipofílica (o hidrofóbica) es el componente que presenta afinidad por medios apolares como las grasas y los aceites. Así, las moléculas son atraídas a interfases entre una fase polar y no polar (Holmberg, 2019). Esta característica les confiere, en primer lugar, la capacidad de reducir la tensión superficial de los líquidos, la tensión interfacial entre interfases líquido-líquido y líquido-sólido y en segundo lugar, formar micelas y microemulsiones entre dos fases diferentes (Banat et al., 2010; Sailatha et al., 2016).

Los surfactantes pueden actuar como emulsificantes, espumantes, detergentes, dispersantes y humectantes. Los emulsificantes pueden diseminar un líquido en otro (como gotitas microscópicas) que conduce a la mezcla moderadamente homogénea de dos líquidos inmiscibles. Los espumantes se concentran en la interfase gas-líquido conduciendo a la formación de burbujas a través del líquido y en la interfase la formación de espuma. Los detergentes son sustancias que tienen la propiedad química de disolver suciedad o impurezas de un objeto sin causar corrosión. Los dispersantes reducen la atracción cohesiva entre partículas similares manteniendo las partículas insolubles en suspensión para prevenir las agregaciones entre sí (Satpute et al., 2010). Los humectantes reducen la tensión superficial del líquido en una superficie haciendo que el líquido se extienda y se adhiera a la superficie (Sailatha et al., 2016).

La concentración micelar crítica (CMC) relacionada con la capacidad de reducir la tensión superficial, se utiliza comúnmente para medir la eficiencia de los surfactantes. La CMC se define como la concentración del surfactante en la cual se forma la primera micela; a partir de esa concentración, más surfactante, solo da más micelas y la tensión superficial se mantiene aproximadamente constante. Una CMC de valor bajo indica que la micela se auto ensambla a una concentración baja, es decir, se requiere de menos surfactante para una aplicación determinada (Holmberg, 2019). Otro parámetro utilizado para caracterizar los surfactantes es el

balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés). El cual refiere a la evaluación del tamaño y longitud de la parte hidrofílica y lipofílica del surfactante. Como resultado, el rango de la escala es de 0 a 20. De 3.5 a 6.0, los surfactantes son más adecuados para emulsiones agua en aceite y de 8 a 18 para emulsiones aceite en agua (Zheng et al., 2015).

Los surfactantes son útiles en la elaboración de diversos productos. Por ejemplo de detergentes de limpieza del hogar, tratamiento del cuero, cuidado personal, textiles, pinturas, polímeros, formulaciones de plaguicidas, farmacéuticos, minería, extracción de petróleo, manufactura de pulpa y fabricación de papel industrial (Sailatha et al., 2016). El consumo mundial de surfactantes ha crecido notablemente en las últimas décadas y su mercado es proyectado en alcanzar 52.4 mil millones de dólares para el 2025 a partir de 42.1 mil millones de dólares en el 2020. Este crecimiento es debido al crecimiento poblacional y de urbanización en el pacífico asiático. Además, siendo los surfactantes componentes en productos como el desinfectante de manos. Su demanda ha aumentado ya que se usa como prevención a la COVID-19 (MarketsandMarkets, 2020).

Los surfactantes según su origen pueden ser químicos o biológicos. Los surfactantes sintetizados químicamente provienen de fuentes petroquímicas u oleoquímicas. Se clasifican principalmente en tres tipos según su carga: aniónicos, no iónicos y catiónicos. Los surfactantes más utilizados son los alquil-bencenosulfonatos lineales, los etoxilatos de alquilfenol y los compuestos de amonio cuaternario. Otros surfactantes menos utilizados son los alquil etoxi sulfatos, alquil sulfatos y alquil etoxilatos (Sailatha et al., 2016). Respecto a los surfactantes biológicos, estos son descritos en la siguiente sección.

1.2 Generalidades de los biosurfactantes

Los surfactantes biológicos o biosurfactantes (BS), son producidos por microorganismos como bacterias y hongos (incluyendo las levaduras). Los BS son compuestos activos de superficie; están constituidos comúnmente de una parte hidrofóbica la cual comprende ácidos grasos o ácidos grasos hidroxilados en cadenas de longitudes entre 8 a 18 átomos de carbono y una región hidrofílica en la que se pueden encontrar grupos éster, hidroxilo, fosfato o carboxilo, o estructuras más complejas como carbohidratos, péptidos o proteínas (Henkel et al., 2017).

Los BS aumentan la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos, mediante el aumento de su solubilidad aparente o por la desorción de los mismos desde las superficies regulando la unión y separación de los microorganismos hacia y desde las superficies (Rosenberg & Ron, 2013). Cada

tipo de BS es producido por un pequeño número de microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Candida* (Singh et al., 2018). Además, su tipo, calidad, cantidad y aplicación, están influenciados por la especie del microorganismo, las condiciones de cultivo y del crecimiento microbiano (Reis et al., 2013). Las cepas silvestres productoras de BS cultivadas por procesos optimizados alcanzan concentraciones máximas de 422 g/L de soforolípidos, 45 g/L de ramnolípidos, 106 g/L de lípidos de manosileritritol, 3.6 g/L de surfactina, 4.4 g/L de iturina y 3.5 g/L de fengicina (Kügler et al., 2015; Li, 2017; Wei et al., 2010; Zohora et al., 2013).

Actualmente, existen empresas que venden BS o los incluye en los productos que comercializan. Algunas empresas son AGAE Technologies, LLC (www.agaetech.com/ consultado el 06 de Mayo 2021), Jeneil Biotech, Inc (www.jeneilbiotech.com consultado el 06 de Mayo 2021), Biotensidon GmbH (www.biotensidon.com consultado el 06 de Mayo 2021), Givaudan (www.givaudan.com consultado el 06 de Mayo 2021), HTSBIO Laboratories (www.htsbio.com consultado el 06 de Mayo 2021), z bioscience (www.zbioscience.com consultado el 06 de Mayo 2021), Natsurfact (www.natsurfact.com consultado el 06 de Mayo 2021), Kao (www.kao.com/global/en/worldwide.html consultado el 06 de Mayo 2021), Lipofabrik (www.lipofabrik.com/#home consultado el 06 de Mayo 2021), entre otras. Adicionalmente, en medio de la crisis de la COVID-19, el mercado global de BS se estimó en 4.5 mil millones de dólares en el año 2020, y se proyecta que alcance 6.5 mil millones de dólares para 2027 (MarketResearch, 2021).

1.2.1 Biosurfactantes versus surfactantes químicos

El aumento de la conciencia ambiental y la necesidad de una industria sostenible han estimulado la producción de BS como posibles sustitutos de los surfactantes químicos ya que presentan ventajas tales como, producirse a partir de materias primas renovables y sustratos agroindustriales, demostrar estabilidad en condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad, ser menos tóxicos, biodegradarse fácilmente y ser menos perjudiciales para el medio ambiente; sin embargo, presentan algunas desventajas; como, dificultades en la optimización del proceso, altos costos de producción y purificación, baja productividad, difícil recuperación y variaciones en las características del producto que inciden en el precio y hacen que estos productos naturales sean menos competitivos en comparación con los surfactantes químicos (Ribeiro et al., 2020)

1.2.2 Clasificación de los biosurfactantes

Los BS se pueden agrupar con base en su peso molecular en BS de bajo peso molecular (< 10 KDa) como los glicolípidos y lipopéptidos y BS de alto peso molecular (> 10 KDa) que están constituidos por polisacáridos o proteínas (Rosenberg & Ron, 2013); también se pueden clasificar según su origen microbiano y su estructura química (Shafiei et al., 2014). Según su estructura química se clasifican en glicolípidos, fosfolípidos, poliméricos, particulados y lipopéptidos. Este último ampliamente estudiado por su variedad de aplicaciones biotecnológicas (Beltran-Gracia et al., 2017). En la Tabla 1, se presentan los diferentes grupos de BS con algunos ejemplos de sus respectivas clases y microorganismos productores (Jacques, 2011; Shafiei et al., 2014; Shekhar et al., 2015).

Tabla 1. Clasificación de los BS según su estructura química y origen microbiano

Estructura química	Clase de BS	Microorganismo productor
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.
	Soforolípidos	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>C. antartica</i> , <i>C. lipolytica</i>
	Cellobiolípidos	<i>Torulopsis apicola</i> , <i>T. petrophilum</i> , <i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>
	Trehalosa dicorynemycoaltos	<i>R. erythropolis</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
	Manosileritritol	<i>C. antartica</i> , <i>Kurtzmanomyces</i> sp., <i>Pseudozyma siamensis</i>
Lipopéptidos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. velezensis</i>
	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. velezensis</i>
	Polimixina	<i>Brevibacterium polymyxa</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>
Fosfolípidos (o Ácidos grasos)	Ácidos grasos	<i>Candida lepus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycococcus</i> sp.
	Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.
Poliméricos	Emulsan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
	Liposán	<i>Candida lipolytica</i>
	Lípido proteína carbohidrato	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Debaryomyces polymorphis</i>
	Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Particulados	Vesículas y fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas marginilis</i> ,
	Células enteras	Variedad de bacterias

1.3 Lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp.

Los LP están entre los BS con mayor diversidad de propiedades y enorme potencial en aplicaciones prácticas (Liu et al., 2020), además sus precios de venta (fengicina: \$US/g 131606 e iturina: \$US/g 130930) son superiores a otros tipos de BS (ramnolípidos: \$US/g 47146 y soforolípidos: \$US/g 130 (consultado en <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es> y <https://www.carbosynth.com/> el 02 de febrero de 2022). Se componen de péptidos cíclicos de composición no homogénea que son acilados con un ácido graso de longitud variada, con el resto peptídico a menudo cíclico y/o neutro o una carga negativa (Henkel et al., 2017). Los LP son metabolitos secundarios; los cuales son productos metabólicos que no presentan funciones esenciales para el crecimiento vegetativo y para el metabolismo reproductivo; son sintetizados a partir de uno o más metabolitos primarios por una variedad mayor de vías que las involucradas en el metabolismo general (Marinelli & Marcone, 2011). No obstante, los metabolitos secundarios se consideran compuestos de diferenciación que confieren roles adaptativos. Por ejemplo, la surfactina en la fisiología bacteriana ayuda a la movilidad de la bacteria, formación de biopelícula, incremento de la biodisponibilidad de sus nutrientes, también influye en la capacidad de unión y desprendimiento de los microorganismos en los sustratos de crecimiento y presenta actividad antiviral y antibacteriana (Cossus et al., 2021; Wu et al., 2017).

Los metabolitos secundarios normalmente no se producen durante la fase de crecimiento rápido (trofofase), sino en una fase posterior (idiofase) cuando el crecimiento se limita por el agotamiento de uno o más nutrientes claves; estos nutrientes limitantes pueden ser la fuente de carbono, de nitrógeno o de fósforo (Barrios-González, 2012). La identificación del nutriente limitante es muy importante para la optimización de la producción de muchos metabolitos secundarios.

Los BS lipopeptídicos son secretados en el medio de crecimiento por bacterias gram positivas como *Bacillus*, el cual es un género de rápido crecimiento, seguro para los humanos y animales, presente en la rizósfera de diversos cultivos, posee diversos mecanismos para asegurar su supervivencia ante condiciones físicas desfavorables y si estos fallan se induce la esporulación (Zhao et al., 2017). También, las bacterias del género *Bacillus* se pueden adaptar a cambios bruscos de temperatura, solubilizan el fosfato del ambiente rizosférico, son aerobias facultativas y se desarrollan en un amplio rango de temperaturas (10 a 70 °C) y pH (2 a 9.3) (Calvo & Zúñiga, 2010; Jiménez-Delgadillo et al., 2018).

1.3.1 Familias y variantes

Los diferentes LP producidos por *Bacillus* spp. se clasifican de acuerdo a su cadena peptídica y a su estructura del ácido en familias: surfactina, iturina, fengicina o plipastatina, kurstaquina y locilomicina (Abdellaziz et al., 2018). La surfactina contiene un heptapéptido unido a un ácido graso beta-hidroxi de 13 a 15 átomos de carbono. La iturina es un heptapéptido unido por un residuo beta-aminoácido a una cadena de ácido graso de 14 a 17 átomos de carbono. La fengicina está compuesta de un decapéptido unido a un ácido graso hidroxilo con 15 a 19 átomos de carbono (Zhao et al., 2017). La kurstaquina es un lipoheptapéptido que contiene una secuencia de péptido lineal o cíclica unida a una cadena de ácido graso que puede ser beta-hidroxilado, de 11 a 14 átomos de carbono. La locilomicina es un nonapéptido cíclico

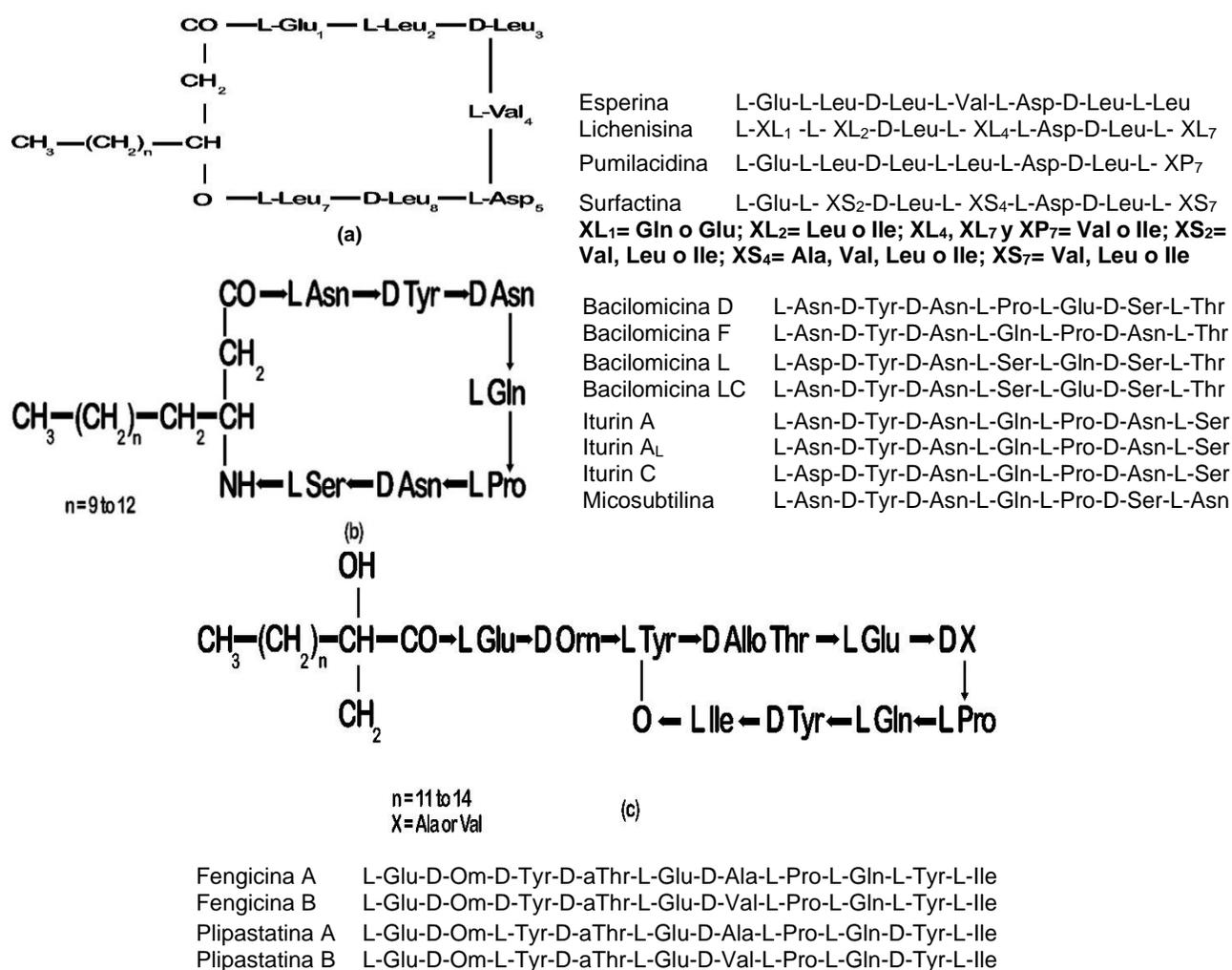


Figura 1. Variantes de las familias de lipopéptidos de *Bacillus* más importantes. a) Surfactina. b) Iturina. c) Fengicina (Inès & Dhouha, 2015).

parcialmente unido a un ácido graso de 13 a 15 átomos de carbono (Abdellaziz et al., 2018). Estas familias de LP están compuestas de variantes los cuales difieren en el tipo y posición de los aminoácidos (isoformas), el número de átomos de carbono en la cadena del ácido graso (compuestos homólogos) y su isomerización. Las familias más caracterizadas son la surfactina, iturina y fengicina (Figura 1) (Inès & Dhouha, 2015; Jacques, 2011). Las cepas de *Bacillus* coproducen familias diferentes de LP. Por ejemplo, especies de *B. velezensis* como GA1 o FZB42 coproduce surfactina, fengicina e iturina, mientras que especies de *B. subtilis* como ATCC 21332 o 168 tienen el potencial de coproducir solo surfactina y fengicina (Arguelles-Arias et al., 2009; Tapi et al., 2010). La ingeniería metabólica puede promover modificaciones en la proporción de las isoformas producidas (Dhali et al., 2017). Asimismo, las condiciones nutricionales y ambientales influyen en el tipo y proporciones de las diferentes familias como de los compuestos homólogos dentro de la misma familia que dependen también de la cepa (Akpa et al., 2001; Bartal et al., 2018; Rangarajan et al., 2015). Por ejemplo, *B. subtilis* BBG21, ATCC 21332, BBG111, y *B. velezensis* FZB42 fueron comparadas bajo las mismas condiciones ambientales y nutricionales, encontrando que el perfil de producción de los LP fue diferente por cada cepa (Yaseen et al., 2016).

1.3.2 Aplicaciones

Las variantes de los LP difieren en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas; por ello, presentan diversas bioactividades, como interacción con membranas y biopelículas, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiplaquetaria y antitumoral (Zhao et al., 2017). La variedad de bioactividades ha estimulado un gran interés en explotar los LP en la industria alimentaria, agrícola, médica, de cuidado personal, cosmética, detergente, petrolera y de aditivos en la alimentación animal (Drakontis & Amin, 2020).

En la industria de alimentos son prometedores por sus propiedades emulsificante, estabilizante, antiadherente, antioxidante y de tolerancia a condiciones adversas de temperatura, pH y salinidad; en formulaciones para aderezo de salsas, productos horneados, entre otros (Ribeiro et al., 2020). También se ha reportado la importancia de los LP como aditivos de alimentos para animales, ya que mejora el ambiente microecológico intestinal, calidad ósea y la inmunidad sistémica a los lechones destetados y pollos de engorde (Cheng et al., 2018; Zhao et al., 2017).

Los LP en formulaciones para detergentes han mejorado el rendimiento del lavado de detergentes comerciales para eliminar eficazmente las manchas de sangre y aceite en ropa. Por ejemplo, la surfactina se ha encontrado poco tóxica y no irritante en la piel. Respecto a productos

de cuidado personal y cosméticos, los LP producidos por *B. methylotrophicus* fueron evaluados en formulaciones de un enjuague bucal, y su presencia generó menor toxicidad que la de uno comercial y ningún efecto irritante (Drakontis & Amin, 2020).

En la agricultura y biorremediación, los LP producidos por *B. subtilis* han reportado aumentar la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en un aceite de motor en más del 100% y ser 85% su potencial de recuperación de aceite en arena contaminada en 24 h (Drakontis & Amin, 2020). Por su actividad antimicrobiana, los LP son de importancia como biopesticidas en el control biológico y para promover la salud de las plantas, por ejemplo, Zhang & Sun, 2018 reportan que la fengicina producida por *B. subtilis* BS155 muestra una actividad fuerte contra el hongo *Magnaporthe grisea*, agente causal de la enfermedad del añublo del arroz. El arroz es el cultivo más importante y la principal fuente de alimento para más de la mitad de la población mundial. Algo semejante ocurre con la fengicina producida de *B. subtilis* NCD-2, la cual reduce hasta el 50% la enfermedad de la hernia de la col, causada por el parásito obligado *Plasmodiophora brassicae* (Guo et al., 2019).

En el campo de la medicina, los LP han demostrado actuar como agentes antitumorales en las líneas de cáncer evaluadas. Un ejemplo, es la patente que menciona la aplicación de fengicina en la preparación de un fármaco antineoplásico; en particular, para el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de mama y cáncer de colon. Además los LP pueden ser agentes terapéuticos trombolíticos, sistemas de administración de fármacos y antibióticos prometedores debido a su espectro antimicrobiano amplio, dificultando que los microorganismos generen resistencia (Zhao et al., 2017).

1.3.3 Biosíntesis de lipopéptidos

Generalmente, los LP resultan de la condensación de partes peptídicas con lipídicas sintetizadas independientemente. Los péptidos son sintetizados independientemente de los ribosomas con megaenzimas llamadas sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs). Esta producción no requiere solo de inducción transcripcional y traduccional sino también modificaciones postraduccionales y de ensamblaje (Inès & Dhouha, 2015).

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

particular que lidera a la incorporación del aminoácido (Inès & Dhouha, 2015). Cuatro dominios principales están presentes en la mayoría de los NRPSs: adenilación, tiolación, condensación y tioesterasa. El dominio de la adenilación ATP dependiente selecciona el aminoácido afín y lo activa como adenilato de amino acilo. El aminoácido activado es transferido al dominio tiolación, también llamado proteína portadora de peptidilo (PCP), es la unidad transportadora del intermediario activado. En tal dominio, el residuo de aminoácido activado está unido covalentemente a su cofactor 4'fosfopanteténico (4'-PP) como tioéster. Esta reacción es catalizada por una fosfopanteteinil transferasa (codificada en *Bacillus subtilis* por el gen *sfp*), que por tanto es esencial para transformar una apoforma de NRPS en su holoforma y actúa como aceptora del crecimiento de la cadena peptídica y donadora de los péptidos al siguiente aminoácido ligado a un tioéster en la secuencia molde. El dominio condensación cataliza la formación del enlace peptídico entre el sustrato aminoacil unido a las PCPs de módulos adyacentes. La terminación es llevada a cabo en el dominio tíoesterasa, que permite la liberación del péptido y está relacionado con la formación de productos macrocíclicos (lactonas y lactamas) o la oligomerización de unidades peptídicas (Jacques, 2011).

Después de la biosíntesis del lipopéptido, este puede ser sometido a modificaciones como glicosilación o halogenación realizadas por enzimas específicas asociadas a las sintetetasas (Inès & Dhouha, 2015). La biosíntesis de la parte lipídica es llevada a cabo por numerosos módulos consecutivos que permiten el acople, la activación y la unión del ácido graso al resto peptídico (Kraas et al., 2010). Uno de los genes necesarios para la biosíntesis de surfactina es un gran operón de 25 kb, llamado *srfA*, que también es responsable de la esporulación y la competencia para el desarrollo (Figura 2.a). El operón contiene cuatro marcos de lectura abierta (ORF) modulares, ORF1 (*srfA-A*), ORF2 (*srfA-B*), ORF3 (*srfA-C*) y ORF4 (*srfA-D*), los tres primeros de ellos codifican las tres enzimas respectivas *srfA-A*, *srfA-B* y *srfA-C* necesarias para hacer la secuencia del heptapéptido. *srfA-A* reconoce el ácido glutámico y leucina, *srfA-B* reconoce valina, ácido aspártico y leucina y *srfA-C* reconoce leucina (Peypoux et al., 1999).

En la biosíntesis de la surfactina la transferencia de lípidos es el primer paso (Figura 2.b). La proteína *srfA-D* es responsable de la reacción de iniciación de la surfactina; media la transferencia del sustrato de ácido graso β -hidroxi al módulo activador de L-Glutamato N-terminal de la sintetasa de surfactina para inducir la formación de β -hidroxiacil-glutamato (Wu et al., 2017). En otras palabras, el dominio de condensación cataliza la transferencia de ácidos grasos 3-hidroxiCoA activados con alta especificidad por el sustrato en su sitio donante a la PCP unida al aminoácido glutamato (posición 1 del heptapéptido de la surfactina). Además, dos ligasas

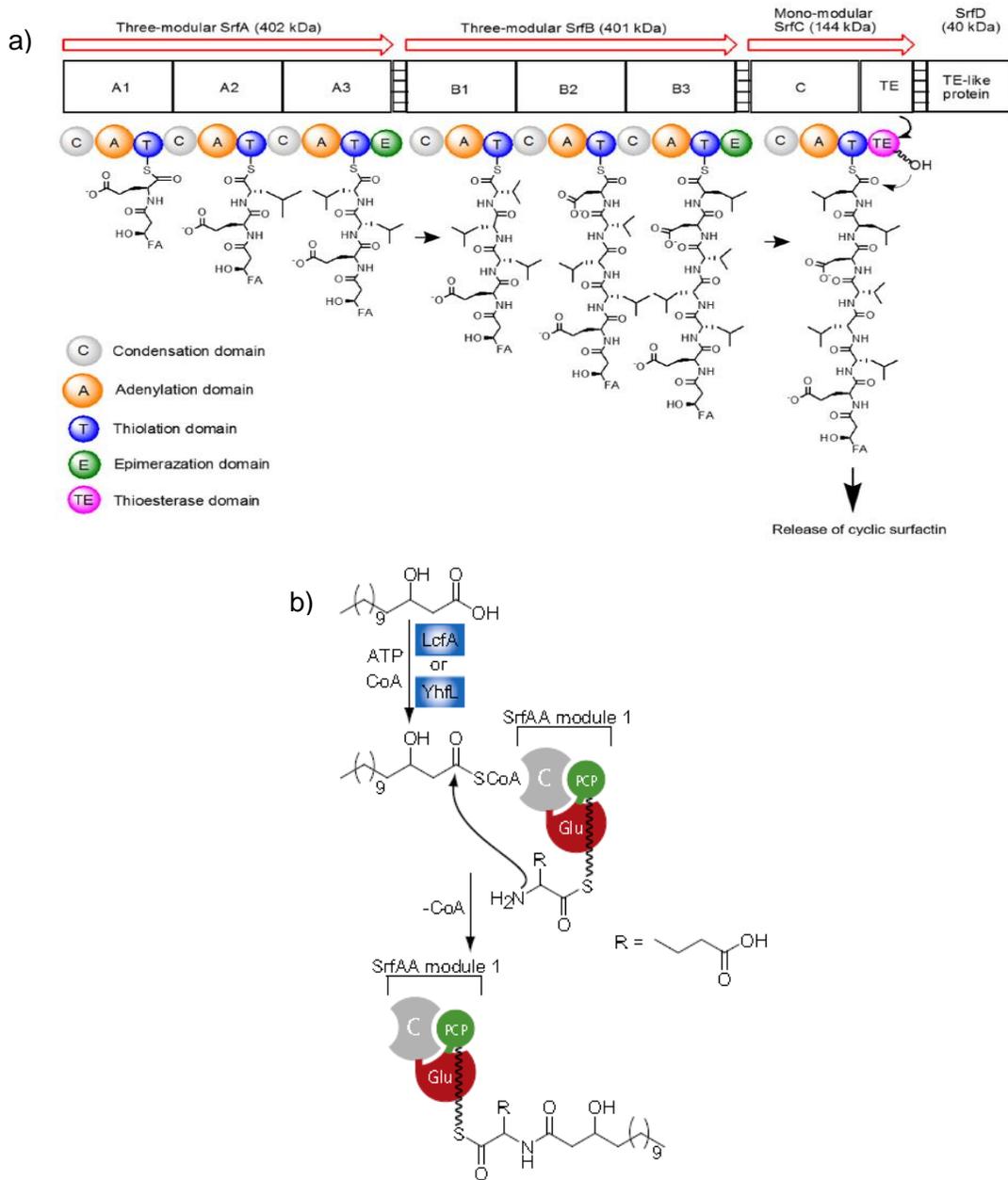


Figura 2. Biosíntesis de surfactina. a) Complejo sintetasa de surfactina tomada de Wu et al. (2017). b) Reacción de lipoiniciación tomada de Kraas et al. (2010).

acilCoA putativas en *Bacillus subtilis*, LcfA y YhfL, son las que activan los ácidos grasos 3-hidroxi para la biosíntesis de surfactina. Dichas enzimas son codificadas en otros grupos de genes. Los ácidos grasos activados provienen de enzimas de las vías biológicas del metabolismo primario (Kraas et al., 2010). La surfactina es posible que sea excretada por difusión pasiva a través de la membrana citoplasmática (Wu et al., 2017).

La síntesis de fengicina o plipastatina se debe a cinco NRPSs (Fen 1 a Fen5) codificados por un operón con cinco ORFs: *fenA*, *fenB*, *fenC*, *fenD*, *fenE* (o *ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD*, *ppsE*). Las primeras tres enzimas, Fen1, Fen2 y Fen3 contienen dos módulos, la cuarta presenta tres módulos y la última enzima un módulo (Jacques, 2011). Contrario a la surfactina y fengicina, la iturina es sintetizada por un complejo híbrido PKS (sintasas de policétido)-NRPS. El operón consiste de cuatro ORFs llamados *fenF*, *mycA*, *mycB* y *mycC* para micosubtilina; *ituD*, *ituA*, *ituB* y *ituC* para iturina y *bmyD*, *bmyA*, *bmyB* y *bmyC* para bacilomicina D. Los últimos tres genes codifican para los tres NRPSs, los cuales son responsables de la incorporación de los primeros cinco residuos de aminoácido y los últimos dos (Jacques, 2011). Para la síntesis de la kurstaquina, la sintetasa está constituida de tres genes, *krsA*, *krsB*, *krsC*, los cuales codifican tres proteínas multifuncionales, KrsA, KrsB, y KrsC (Béchet et al., 2012).

1.3.4 Regulación de la biosíntesis

La regulación de la síntesis de LP aún sigue siendo poco comprendida. Estudios futuros son necesarios y de esa forma encontrar los posibles elementos claves para poder mejorar su biosíntesis. La regulación de la surfactina ha sido la más estudiada y esclarecida. *B. subtilis* regula la producción de surfactina por un mecanismo sensible a la densidad celular no basado en homoserina lactona sino utilizando feromona de péptidos, tales como ComX o el factor de competencia y esporulación (CSF); donde, ComX y CSF actúan mediante vías de señalización convergentes para activar la inducción de genes (*srfA*) que responden al quórum, el punto más importante de la regulación de la producción de surfactina (Jung et al., 2012). Su regulación implica varias feromonas ComX, PhrC, PhrF, PhrG y PhrH junto con varios reguladores pleiotrópicos tales como CodY, DegU y AbrB. Estos forman una cascada compleja que gobierna múltiples vías de diferenciación. La expresión de la surfactina sintetasa también depende del pH y su expresión es más alta al final de la fase logarítmica (Jacques, 2011).

Las bacterias son capaces de comunicarse entre sí a través de la producción de feromonas del "quorum sensing". La acumulación de estas feromonas en el medio de cultivo indica la presencia de un número suficiente de congéneres (un quórum) y desencadena varios procesos dependientes de la densidad celular. La expresión del operón surfactina es uno de estos procesos (Figura 3). La primera feromona es ComX, un péptido modificado de 9 a 10 aminoácidos, que es secretada con la ayuda de ComQ en el medio de cultivo (Solomon et al., 1995). ComP detecta la acumulación del ComX y al alcanzar una cierta densidad de células en el inicio de la fase estacionaria, la histidina quinasa ComP membranosa se activa y fosforila el factor de transcripción ComA (Willenbacher et al., 2016). Posteriormente, ComA-P activa la

expresión del operón de surfactina y ComS, que es un ORF codificado dentro del ARNm de *srfA*. ComS conduce a la autoactivación de ComK. Además, varios activadores tales el mismo ComK y DegU y represores incluyendo CodY, AbrB y Rok están implicados en la activación de ComK (Jacques, 2011).

El segundo tipo de feromonas es el grupo de péptidos Phr correspondientes al CSF: PhrC, PhrF, PhrG y PhrH. Probablemente se sintetizan primero como pequeñas proteínas, que son secretadas, procesadas en pentapéptidos y luego internalizadas por una permeasa de oligopéptido (Opp o Spo0K) (Jung et al., 2012). El gen *phrH* constituye un operón con un gen *rapH*. Ambos genes son activados por ComK. Los productos de los genes *phr* y *rap* son factores reguladores interactivos que modulan el estado de fosforilación o reguladores de respuesta específicos del ADN. Los genes *phrC*, *phrF* y *phrH* necesitan la forma σ^H (Spo0H) del ARN polimerasa para ser transcritos. RapC, RapF y, en ciertas circunstancias, RapG y RapH, son inhibidores de la unión al ADN de ComA-P. ComA-P activa *rapC* y *rapF*. PhrC, PhrF, PhrG y PhrH inhiben sus proteínas de Rap cognadas. RapG y RapH inhiben la unión al ADN de DegU. RghR es un represor de *rapG*, *rapH* y *phrH* (Jacques, 2011).

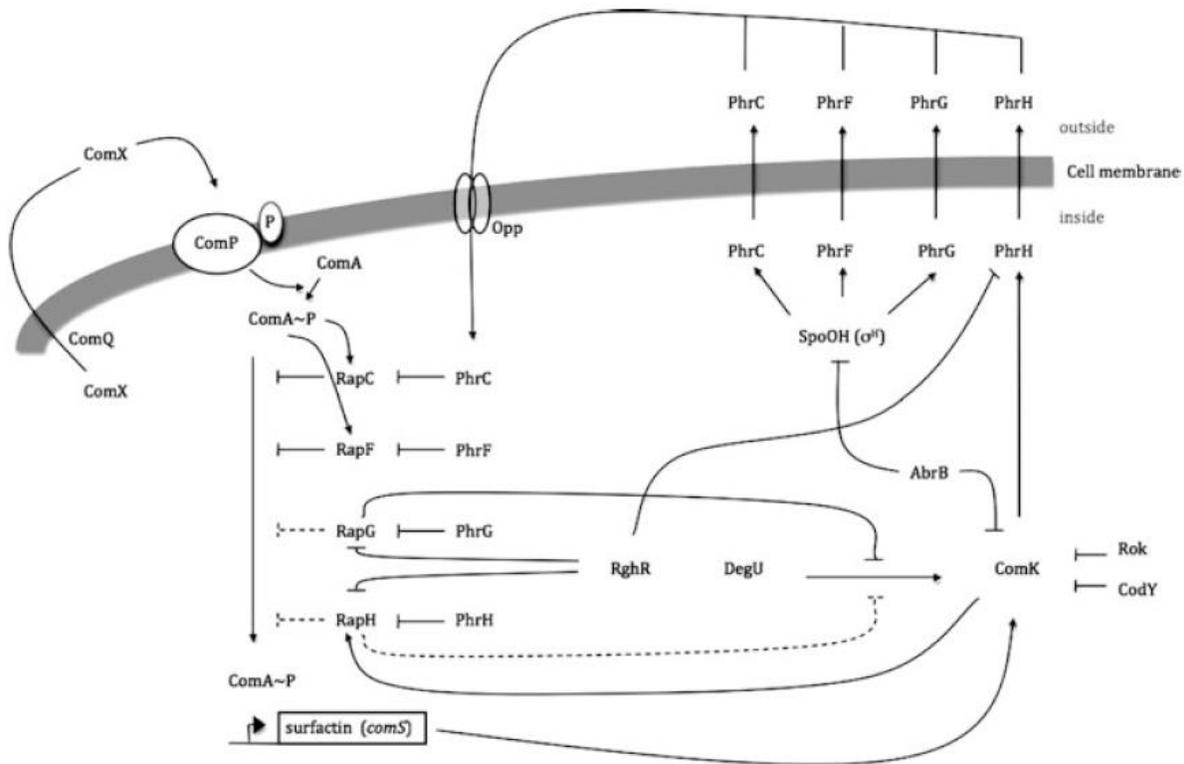


Figura 3. Cascada reguladora de la expresión del operón de surfactina tomada de Jacques, 2011.

Respecto a la regulación de la iturina, se ha reportado que es influenciada por la expresión del factor sigma (sigma A) y el factor de transcripción ComA (factor regulatorio del gen en estado tardío). La sobreexpresión de *sigA* y *comA* separadamente y en la secuencia de *comA-sigA* puede incrementar el rendimiento del LP. La sobreexpresión del gen *DegQ*, gen codificante de proteína reguladora multipotente pequeña, localizada corriente arriba de *comA*, puede también incrementar la producción de la iturina (Yang et al., 2020). Además, se ha mostrado que la expresión de la sintetasa de la micosubtilina está bajo la influencia de una cascada de regulación dependiente de *AbrB*, uno de los principales reguladores de estado de transición en *B. subtilis* (Jacques, 2011).

La regulación de la fengicina puede ser afectada por factores endógenos como ComA/ComP, sigma A y proteínas señal *DegY*, *DegQ*. La regulación del gen *sigA* puede incrementar el rendimiento de la fengicina (Jacques, 2011; Yang et al., 2020). Además, bajo condiciones de bajo fósforo, *PhoR/PhoP* puede regular la producción de dicho LP mediante el control de su expresión. También, la PNPasa (polinucleótida fosforilasa) quizás controle la expresión de la fengicina regulando *ComS*, *srfA*, *sigB*, *DegQ* y *ComK* (Yang et al., 2020)

Con base en lo anterior, se observa que las rutas de síntesis de los diferentes LP interactúan entre ellas. Sin embargo, los mecanismos sinérgicos y antagonistas de dicha interacción no se han aclarado. Hasta la fecha se ha reportado que, la eliminación del gen *sfp* puede aumentar significativamente la producción de plipastatina y aumentar simultáneamente la producción de surfactina, quizás es que comparten los mismos precursores y vías de síntesis. La ausencia de *srfAB* dificulta la producción de surfactina, pero aumenta significativamente el rendimiento de iturina. La alteración del gen *fenA* conduce a una mejora del 30% en la producción de surfactina. La mutación de *fenC* aumenta la producción de iturina hasta 2 veces, mientras que, la mutación de *ituC* duplica el rendimiento de fengicina. Sin embargo, la producción de fengicina no se ve afectada por las mutaciones de *srfAB*, *srfAC* y *srfAD*. La mutación de *srfAA* bloquea la producción de surfactina y regula la producción de iturina (Yang et al., 2020).

1.4 Producción de lipopéptidos y estrategias de su mejoramiento

Existen diferentes estrategias para incrementar la producción de LP; como son, el mejoramiento de cepas, optimización de las condiciones nutricionales y operacionales, uso de diferentes tipos de biorreactores o de cultivos y desarrollo de procesos de purificación efectiva y rentable (Mondragón, 2011). Con base en ello, en esta sección se describen algunas de estas estrategias.

1.4.1 Fermentación en medio sólido versus medio líquido

La producción de BS se lleva a cabo comúnmente en fermentación en medio líquido (FML), pero esta presenta algunos de los siguientes problemas: al utilizar aireación y agitación forzada, se genera espuma, la cual puede generar el desprendimiento indeseable del producto, nutrientes y células en la espuma (Davis et al., 2001). Además, presenta baja transferencia de masa; característica poco deseable bajo las condiciones de alta demanda de oxígeno que el bioproceso requiere. También, hay un aumento de la viscosidad del medio debido a la formación de exopolisacáridos (Thomas et al., 2013). Dichos problemas se ven reflejados en el aumento de costos de producción y baja productividad. Agentes antiespumantes han sido utilizados para resolver los problemas de generación de espuma. Sin embargo, ellos reducen la transferencia de masa (oxígeno), afectan la fisiología de las cepas y complican la separación y purificación de los productos (Chtioui et al., 2012; Rangarajan & Clarke, 2015). Así, diferentes tipos de biorreactores o cultivos han sido propuestos como los de discos de rotación, biopelícula, contactores de membrana aire/líquido y fermentación sólida (François Coutte et al., 2017).

La fermentación en medio sólido (FMS) ha sido evaluada como una alternativa para evitar los problemas asociados con la generación de espuma y la limitación de la transferencia de oxígeno. La fermentación es un cambio químico provocado por el uso de microorganismos, por ejemplo, en la industria de la biotecnología para la producción de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y alimentos para animales (Wright, 2005). La FMS involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas húmedas en situaciones en las que los espacios entre las partículas contienen una fase gaseosa continua y un mínimo de agua libre. Aunque puede haber gotas de agua entre las partículas y existan delgadas películas de agua sobre las partículas, la fase acuosa entre partículas es discontinua y la mayoría del espacio interpartículas está ocupado por la fase gaseosa. La mayoría del agua presente en el sistema está adsorbido dentro de las partículas húmedas (Mitchell et al., 2006).

La FMS puede llevarse a cabo ya sea con un soporte inerte o con uno biodegradable (Chen, 2013). El soporte inerte normalmente es poroso, insoluble y está impregnado de un medio de cultivo, son ejemplos, espuma de poliuretano, resinas macroporosas, perlita y vermiculita. El soporte biodegradable puede ser utilizado como fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano, hace referencia a cultivos de salvado de trigo, harina de soja, residuos agrícolas y forestales como paja, bagazo y aserrín. Este tipo de soporte funciona como una estructura física para el crecimiento de microorganismos además de proporcionar una fuente de carbono y de nitrógeno y factores de crecimiento para los microorganismos (Chen, 2013).

La FMS imita el hábitat natural para el crecimiento de hongos filamentosos, levaduras y bacterias formadoras de biopelículas (Lima-Pérez et al., 2019). La FMS tiene como ventajas respecto a la FML más altos coeficientes de transferencia de masa asociados con el bajo contenido de agua (de 40 a 70%) y una alta área superficial (Raghavarao et al., 2003). Además, baja inversión de capital, bajos costos operativos, bajo consumo de energía, tecnología más simple, altos rendimientos de producción de metabolitos secundarios, transferencia de oxígeno mejorada y no generación de espuma (Piedrahíta-Aguirre & Monte Alegre, 2014).

Los estudios en FMS para producción de LP son escasos y en su mayoría utilizan sustratos complejos, como residuos de arroz, harina de soya, bagazo de caña de azúcar, cascara de papas, entre otros (Costa et al., 2018). Sin embargo, el uso de un medio de cultivo definido adsorbido en un soporte inerte permite un mejor entendimiento de la fisiología y bioquímica de los procesos microbianos, facilita el control del bioproceso y la recuperación del producto (Ooijkaas et al., 2000). Este sistema ha sido utilizado satisfactoriamente para la producción de BS glicolipídicos (Gong et al., 2020; Jiménez-Peñalver et al., 2018).

La FMS presenta algunos desafíos, como la selección del tipo de biorreactor que permita la eliminación de calor metabólico, el uso de sustratos con propiedades físicoquímicas y nutricionales adecuadas, el método para el control del proceso de cultivo y la recuperación de los BS desde el sólido fermentado. Si se logra resolver estos desafíos, se puede aprovechar las ventajas de la FMS para la producción de BS a gran escala.

1.4.2 Mejoramiento de cepas

El mejoramiento de cepas en los procesos de fermentación ha sido clave para la sobreproducción de productos industriales. Convencionalmente, las estrategias utilizadas son la mutación inducida y la recombinación genética (Parekh et al., 2000). A continuación, se mencionan algunos estudios de mejoramiento de cepas realizados con el fin de aumentar la producción de los LP producidos por *Bacillus*, especialmente los que corresponden a la surfactina, que ha sido la más estudiada:

Nakano et al. (1992) sobreexpresan la enzima *sfp* en *B. subtilis* y encuentran que no causa la generación de mayor cantidad de surfactina, pero si genera la represión de la fusión transcripcional *lacZ* del operón *srfA*, que codifica enzimas que catalizan la síntesis del LP. Con base en ello, proponen que *sfp* es esencial en el sistema de síntesis del péptido y tiene algún rol en la regulación de la biosíntesis de la surfactina. Sun et al. (2009) reemplazan el promotor nativo del operón de la surfactina por el promotor inducible *Pspac* en *B. subtilis* *fmbR*. El *Pspac* es

inducible con β -D-tiogalactopiranosido. La producción de surfactina de la recombinante fmbR-1 es 5 veces mayor que la cepa silvestre sin inducción y 10 veces mayor cuando fue inducido con β -D-tiogalactopiranosido.

Jung et al. (2012) sobreexpresan ambos factores de señalización codificados por comX y phrC. En consecuencia, la producción de surfactina incrementa 6.4 veces respecto a la cepa silvestre. Li et al. (2015) determinan que el flujo de salida de la surfactina en *Bacillus subtilis* THY-7 es principalmente dependiente de la fuerza protón motriz, no de la hidrólisis del ATP. Por ello, sobreexpresan algunos transportadores lipopeptídicos putativos que utilizan como fuente de energía una fuerza protón motriz como YcxA, KrsE y YerP. Los cuales generan aumento en la producción de la surfactina. Siendo YerP, el que presenta mayor incremento en comparación con los otros transportadores y 2.1 veces más que la cepa control.

Zhao et al. (2012) por medio de la técnica barajado del genoma (Genome shuffling en inglés) mejoran el rendimiento de la surfactina producida por *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2-4, obteniendo una cepa recombinante F2-38 que exhibe 3.5 y 10.3 veces más producción del LP en matraz de agitación y fermentador respectivamente. También, Yoneda et al. (2002) por medio de la técnica barajado del genoma combinada con la mutagénesis inducida, utilizando N-metil-N9-nitro-N-nitrosoguanidina, describe en una patente, un rendimiento de producción de hasta 50 g/L de surfactina.

Li et al. (2014) exponen a mutagénesis química de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a la silvestre *B. subtilis* XF-1 y obtienen algunos mutantes con mayor actividad de inhibición contra *Fusarium gsolani* que la *Bacillus* silvestre. Debido a que, dichos mutantes producen más variedad de estructuras de surfactina, fengicina e iturina respecto a la silvestre. Afsharmanesh et al. (2014) aplican mutagénesis inducida a la cepa silvestre *B. subtilis* UTB1, utilizando dosis diferentes de irradiación gamma (0.1-3K Gy), y encuentran en algunos de los mutantes generados, un aumento en la producción de surfactina, fengicina y especialmente iturina. Lo anterior, se refleja en un incremento en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus* R5, productor de aflatoxinas.

Meng et al. (2016) aplican diferentes métodos físicos de mutagénesis. Primero, somete la cepa silvestre *B. subtilis* HSO 121 a luz ultravioleta (20 W) hasta alcanzar la tasa de supervivencia de 10%. Posteriormente, los mutantes generados son irradiados con rayos gamma con una dosis de 2500 Gy/h, determinando una tasa de supervivencia del 10%. Consecuentemente, algunos mutantes incrementan hasta 2 veces el rendimiento de producción de LP y alteran los compuestos homólogos producidos de surfactina.

Willenbacher et al. (2016) sustituyen el promotor del *srfA* por el promotor endógeno y constitutivo *Pveg* de *B. subtilis* en dos cepas de diferente nivel de producción de surfactina, *B. subtilis* 3A38 y DSM 10^T. La sustitución del promotor conduce a un aumento de 3.7 veces la concentración del LP de la cepa 3A38. Sin embargo, en la mutante generada a partir de DSM 10^T hay una disminución de producción de 15.5 veces. Es decir que la síntesis de surfactina es regulada de forma diferente en cepas con diferente nivel de producción del LP o al menos integrada de manera diferente en la red de detección de quórum.

Zhang et al., (2017) sobreexpresan los genes regulatorios *comA* y *sigA*. Como resultado, la producción de iturina A por la mutante generada incrementa 43 veces comparada con la cepa silvestre *B. subtilis* ZK0 y se inhibe la formación de biopelícula. Xu et al., (2020) reemplazan el promotor del cluster iturina A sintetasa de *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12 por diferentes promotores: *P43*, *PbacA*, *Psrfa* y *Pylb*. De allí, se encuentra que *PbacA* es el más eficiente en incrementar la producción del LP. Posteriormente, el gen regulador *abrB* es eliminado para liberar el efecto de represión sobre *PbacA* y este proceso se complementa con la optimización del medio de cultivo alcanzando 2 g/L de iturina. Lo anterior, permite mejorar 5 veces la producción del LP en comparación con la cepa silvestre.

1.4.3 Requerimientos nutricionales y operacionales

A continuación, se va a describir los parámetros operacionales y posteriormente los componentes del medio y los elementos traza que se han evaluado con el fin de incrementar la producción de los LP.

Las condiciones de cultivo como la temperatura de incubación, el pH inicial, el tamaño del inóculo, la concentración del oxígeno disuelto y el grado de aireación influyen en la producción de LP porque afectan el crecimiento celular. En lo concerniente a la temperatura, *B. subtilis* produce eficientemente surfactina a temperaturas de 20 a 37 °C, iturina de 27 a 30 °C y fengicina a los 30 °C (Chen et al., 2015; Dang et al., 2019; Hmidet et al., 2017). Jacques (2011) reporta que a temperaturas altas (37 °C) la síntesis de surfactina se favorece para ciertas subespecies de *B. subtilis* como RB14 y ATCC 6633 pero no para *B. subtilis* S499.

Respecto al efecto del pH, Abdel-Mawgoud et al. (2008) evalúan su efecto entre 6.5 a 9.0 y encuentran que a pH inicial 6.8 el rendimiento de surfactina es mayor. Hmidet et al. (2017) hallan que a pH 7.0 se incrementa más la producción de surfactina y fengicina. Yeh et al. (2006) reportan que a pH ácidos (pH<5) la surfactina se precipita. Sidorova et al., (2020) encuentran que la temperatura y el pH generan un efecto diferente en la síntesis de surfactina e iturina a las cepas

B. subtilis BZR 517 y *B. subtilis* BZR 336, a causa de que la mejor condición del cultivo para el bioproceso por BZR 336 es a temperatura de 25 °C y pH 8.0 mientras que por BZR 517 es a 30 °C y pH de 7.0 a 8.0. En referencia al tamaño y edad del inóculo, están correlacionados con la producción del BS ya que afecta el período de fase lag, la tasa específica de crecimiento y la esporulación del microorganismo (Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011; Sen & Swaminathan, 2004).

La síntesis de LP cambia en función de la superficie de contacto gas-líquido interfacial y suministro de oxígeno (Fahim et al., 2012). Fahim et al. (2012) demuestran que el parámetro K_La es clave en controlar la orientación de la producción ya sea hacia un solo tipo de LP o combinados. Sheppard y Cooper citados en Chen et al., (2015) identifican que la transferencia de oxígeno es uno de los parámetros críticos para la optimización y escalado del bioproceso. Yeh et al. (2006) indican que el aumento del oxígeno disuelto a velocidades de agitación altas tiene un efecto positivo en la producción de surfactina ($K_La = 0.01 \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, una alta agitación (más de 250 rpm) reduce la producción de surfactina por acumulación de espuma; que disminuye la transferencia de oxígeno y el rendimiento. En otro estudio, el flujo de aire se optimiza utilizando reactores agitados (3 L); se encuentra que con 1.5 L/min aumenta la concentración de surfactina en la espuma de 1.8 a 3.5 g/L, pero a un flujo más alto de 3 L/min, ocurre un arrastre de líquido y la concentración de la surfactina disminuye (Shaligram & Singhal, 2010). Contrariamente, Kim et al. (1997) logran con la limitación de oxígeno, que se redirige el flujo de energía a la síntesis del LP, dando lugar a una alta producción de surfactina (7 g/L). De igual forma, condiciones limitadas de oxígeno para la bacteria marina *Bacillus megaterium* incrementan la selectividad hacia la producción de fengicina, $K_La = 0.01 \text{ s}^{-1}$ (Rangarajan et al., 2015)

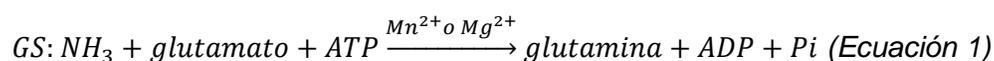
En cuanto a las condiciones nutricionales, la producción de surfactina se favorece con el uso de fuentes de carbono como manitol, sacarosa, melaza, o glucosa (Chen et al., 2015); la iturina con maicena, inulina, polipeptona o glucosa (Dang et al., 2019; Mizumoto & Shoda, 2007; Xu et al., 2020); y la fengicina con manitol o glucosa (Hmidet et al., 2017; Wei et al., 2010). Sin embargo, las concentraciones excesivas por ejemplo de glucosa, afectan negativamente al comportamiento de crecimiento de *B. subtilis* en FML y además puede generar represión catabólica (Willenbacher et al., 2015). Las fuentes de nitrógeno más adecuadas para la producción de surfactina son las inorgánicas tales como nitrato de amonio, nitrato de sodio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, bromuro de amonio, carbonato de amonio y sulfato de amonio (Chen et al., 2015); para la producción de iturina, L-sodio glutamato (Dang et al., 2019)

y la fuente orgánica, harina de soya (Mizumoto & Shoda, 2007; Xu et al., 2020); y para la síntesis de fengicina, harina de soya, ácido glutámico junto con extracto de levadura, urea mezclado con carbonato de amonio y nitrato de sodio (Hmidet et al., 2017; Wei et al., 2010; Yaseen et al., 2017). Davis et al. (1999) reportan que cuando se utiliza nitrato de amonio, los iones amonio son utilizados como fuente de nitrógeno, favoreciendo el crecimiento del *Bacillus*, mientras que el ion nitrato se consume durante la producción del BS por la bacteria y parece que participa en la activación del metabolismo secundario.

La producción de LP en FML y FMS como metabolitos secundarios, también depende del tipo de nutriente limitante del crecimiento microbiano, ya sea carbono, nitrógeno o fósforo (Barrios-González, 2012; Onwosi & Odibo, 2012). No obstante, pocos estudios relacionados se han reportado. Algunos de ellos son, el de Fonseca et al., (2007) que evalúan en *B. subtilis* YRE207 diferentes fuentes de nitrógeno (NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea y residuos de levadura de cerveza), rangos de agitación (50, 150 y 250 rpm) y C/N (3, 6 y 9) utilizando sacarosa como fuente de carbono. En dicho estudio, la mejor condición para una mayor actividad de reducción de la tensión superficial por parte del LP es NH_4NO_3 , 250 rpm y C/N=3. Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011 usan cloruro de amonio y glucosa como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente; y evalúan varios C/N de 3 a 9 en *B. subtilis* SPB1, hallando un incremento en la producción de los LP hasta C/N=7 y posteriormente una disminución. Ghazala et al. (2017) comparan el efecto de diferentes C/N desde 8 a 122 y encuentran que la relación 17 es la más favorable en la producción de LP para *B. mojavensis* I4. Por el contrario, Guimarães et al. (2019) mencionan que en *B. velezensis* H2O-1 el efecto de diferentes C/N (3 a 23) y la agitación no genera cambios en la producción de la surfactina pero si la temperatura.

Además de la fuente de nitrógeno y carbono, la adición de sales minerales en el medio de cultivo afecta la concentración, tipo y propiedades de los LP, además de la actividad antimicrobiana. Algunos iones metálicos son cofactores de enzimas involucradas en la sobreproducción de LP (Chen et al., 2021). Los elementos Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} y Mn^{2+} son elementos claves en la producción de la surfactina por *B. subtilis* (Wei et al., 2007). Valdés-Velasco, 2016 encuentra que los nutrientes Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} y Mn^{2+} son significativos en la producción de LP para *B. subtilis* ATCC 6633 en FMS en un medio definido. Yang et al., 2020 incrementan 1.5 veces la producción de surfactina con la adición de 5 g/L de nanopartículas de Fe^{2+} , debido a que este elemento incrementa la permeabilidad de la membrana celular, mejorando la ingesta de la fuente de carbono y la secreción del producto.

Huang et al., 2015 mencionan que el Mn^{2+} es el elemento de metal traza más importante para el crecimiento de algunas especies de *Bacillus* y hongos, y puede funcionar como un cofactor para muchas enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno. Cuando *B. subtilis* se cultiva en medios con NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno, la asimilación de nitrógeno incluye el uso de NH_4^+ y NO_3^- . Antes de la asimilación de NO_3^- , se debe transformar en NO_2^- y luego en NH_4^+ . Este proceso está limitado por la reacción de primer paso, que es catalizada por nitrato reductasa. Para *B. subtilis*, la asimilación y transformación de NH_4^+ en una forma orgánica se produce principalmente a través de las reacciones acopladas catalizadas por glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOS), representadas en la Ecuación 1 y 2 respectivamente.



Por medio de dichas reacciones es la única vía para la síntesis de glutamina y glutamato y la asimilación de amonio en las células de *B. subtilis*. Por lo tanto, las tres enzimas son cruciales para el metabolismo del nitrógeno, el crecimiento y la reproducción de *B. subtilis*. Huang et al. (2015) encuentran que cuando la concentración de Mn^{2+} es superior a 0.05 mmol/L, el nitrato se convierte en la principal fuente de nitrógeno, en lugar de amonio, lo que indica que también se cambia el patrón de utilización de nitrógeno. Hay un aumento en la actividad de nitrato reductasa y el aumento de la dosificación de Mn^{2+} tiene una correlación positiva con el uso de nitrato, y como consecuencia se estimula la actividad metabólica secundaria y la síntesis de surfactina. Por otro lado, el Mn^{2+} potencia la actividad de glutamato sintasa, que aumenta la absorción y transformación de nitrógeno y proporciona más aminoácidos libres para la síntesis de surfactina. Es por ello que se recalca la importancia del $MnSO_4$ en el medio de cultivo para la producción de LP (Abushady et al., 2005; Gudiña et al., 2015; Wei & Chu, 2002).

El Mg^{2+} es esencial en el crecimiento de las bacterias y es un cofactor que se acomoda en el sitio activo de la proteína Sfp de *B. subtilis*. El ión forma un complejo con el pirofosfato CoA, las cadenas laterales de tres aminoácidos ácidos y una molécula de agua. La Sfp activa los dominios de PCP de la surfactina sintetasa cuando transfiere la parte 4'-fosfopanteteinil de la CoA a un residuo de serina que se encuentra en las PCPs (Reuter, 1999; Wei et al., 2007). Por su parte, el K^+ posiblemente estimula la secreción de la surfactina, sin embargo, falta determinar el mecanismo que se lleva a cabo para dicha función (Chen et al., 2015) y el P^{3-} probablemente incrementa la producción de fengicina a una baja concentración en el medio de cultivo (Guo et al., 2018).

La adición de hidrocarburos o ácidos grasos y aminoácidos han sido evaluados en la producción de los LP. Ghribi & Ellouze-Chaabouni (2011) suplementan el medio de cultivo con diferentes fuentes lipofílicas; queroseno, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, parafina, diésel, heptano y benceno. Los autores encuentran que el queroseno incrementa la producción de surfactina y el benceno inhibe el bioproceso. Chinmay Hazra et al. (2014) utilizan un medio mineral de sales junto con pasta de jabón de aceite de girasol y producen hasta 2.6 g/L de LP. Respecto a la suplementación de aminoácidos libres, cuando se añaden aquellos que hacen parte de la estructura de la surfactina, por separado o una mezcla de ellos al medio de cultivo, no generan un efecto notable en la producción de surfactina (Abdel-Mawgoud et al., 2008). Sin embargo, Wu et al. (2018) encuentran que al adicionar una mezcla de aminoácidos (L-prolina, L-glutamina, L-asparagina y L-serina) al medio de cultivo incrementa el rendimiento de iturina en *B. amyloliquefaciens* BPD1, y aún más la adición de solamente L-serina; no obstante, la presencia de solo tirosina disminuye la síntesis del LP.

1.5 Recuperación y análisis de los lipopéptidos

Las técnicas de extracción y purificación de LP a partir de un medio o extracto acuoso sin biomasa más comunes son: la precipitación ácida con HCl 6 M, la extracción con solventes orgánicos, la precipitación con sulfato de amonio, el fraccionamiento de espuma y las técnicas basadas en membrana. En la Tabla 2 se muestra algunas características de las técnicas mencionadas (Chen et al., 2015; Coutte et al., 2017; Inès & Dhouha, 2015).

El análisis de LP es complejo debido a que en un cultivo se puede presentar una o más familias de LP incluyendo la variedad de isoformas y los compuestos homólogos de las mismas (Inès & Dhouha, 2015). En la Tabla 3 se muestran algunos métodos de análisis cuantitativos y cualitativos que se han utilizado para los LP.

Tabla 2. Técnicas de extracción y purificación de LP.

Proceso de Recuperación	Propiedad aprovechada del LP	Configuración necesaria para el proceso	Ventaja	Desventaja
Fraccionamiento de espuma	Formar y crear particiones en la espuma	Biorreactores que faciliten la recuperación de espuma durante la fermentación	Alta pureza	Requiere acondicionar el sistema respecto a la tasa de alimentación y agitación

Extracción con disolvente orgánico	Soluble en disolventes orgánicos por presencia extrema hidrófobo	No se requiere configuración	Eficiente recuperación y purificación parcial	Alta selectividad de solubilidad debido a la hidrofobicidad y la naturaleza del solvente, toxicidad y alto costo
Precipitación con ácido	Insolubles a valores de pH bajos	No se requiere configuración	Bajo costo, eficiente recuperación	Pureza aproximadamente de 55%
Precipitación con sulfato de amonio	Rico en proteína	No se requiere configuración	Eficiente aislamiento de cierto BS poliméricos	Debe ser seguido por diálisis para eliminar pequeños contaminantes y sales
Técnicas basadas en membrana	Formación de micelas	Membrana	Alta recuperación y pureza	No reportada
Adsorción	Interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas	Una columna o alguna configuración acoplada al biorreactor	Eficiente recuperación y alta pureza	No reportada

Tabla 3. Métodos analíticos de LP.

Método analítico	Metodología/ Instrumento	Variable respuesta
HPLC ^{a,b}	Flujo:0.5-1.5 mL/min, temperatura: 30 °C, detector: U.V, columna:C18 de fase reversa; fase móvil: ácido trifluoroacético/acetoniitrilo	Sumatoria del área de los diferentes picos basados en curvas estándar
Tensión superficial (γ) ^{b,c}	Tensiómetro Du-Nouy a 25 °C	Medida de tensión superficial y CMC*
Índice de emulsificación (E_{24}) ^{d,e}	Se mezcla un volumen de hidrocarburo a un volumen igual de solución lipopeptídica en un tubo de ensayo y se lleva a vórtex a alta velocidad por 2 min y se mide a las 24 h.	Porcentaje de la altura de la capa emulsionada respecto a la altura total de la columna de líquido
Análisis de espectro infrarrojo ^{d,f}	Espectrómetro FT-IR en un rango de longitudes de onda entre 500-4000 cm^{-1}	Transmitancia o absorbancia respecto a la longitud de onda. Identificar la composición de una muestra por medio de las bandas resultantes
Análisis de espectrometría de masas ^{a,g}	Espectrómetro de masas	Espectrograma de masa/carga vs abundancia relativa. Elucidar la estructura de un compuesto

UPLC-MS ^h	UPLC-MS, temperatura columna: 65 °C, detector: QDA, columna: C18 de fase reversa, fase móvil: ácido fórmico al 0.1% en agua y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, volumen de inyección: 5 µL, temperatura de la muestra: 10 °C, elución: gradiente a 0.4 mL/min	Picos (áreas) y espectro de masas de cada pico. Se utiliza curvas estándar
Actividad hemolítica ^c	El microorganismo se cultiva en un medio suplementado con sangre y se incuba por 48h o más tiempo.	Zona limpia alrededor de una UFC
Caída de la gota ^c	En un pozo de una microplaca se adiciona un volumen de hidrocarburo y posteriormente la muestra a evaluar	Colapso de la gota sobre el hidrocarburo
Actividad surfactante ^c	En una caja Petri se adiciona agua destilada, luego un volumen de hidrocarburo y finalmente el mismo volumen de la muestra a evaluar	Diámetro o área de desplazamiento del hidrocarburo
Actividad emulsificante ^{c,i}	Se realiza una mezcla de hidrocarburo, buffer y muestra a evaluar, luego se somete a vórtex y se mide la absorbancia entre 400-600 nm. Se considera una unidad emulsificante a la absorbancia multiplicada por el factor de dilución.	Absorbancia o unidad emulsificante
PCR ^a	Reacción de PCR con primers diseñados para regiones conservadas de NRPS	Bandas en un gel de agarosa por electroforesis

Nota. ^aBiniarz et al. (2017). ^bSlivinski et al. (2012). ^cSatpute et al. (2010). ^dDe Faria et al. (2011). ^eZhu et al., 2013. ^fValdés-Velasco (2016). ^gBrück et al. (2019). ^hde Souza et al. (2018). ⁱOrtega-de la Rosa et al. (2018). CMC corresponde al punto donde hay un cambio de pendiente abrupto de la tensión superficial contra la concentración del BS.

El reto de la producción de los LP a gran escala está en resolver problemas de rendimientos de producción, costos, y procesos para la recuperación y purificación del producto (lo que representa alrededor de 60% de los costos); especialmente para el uso en aplicaciones terapéuticas que requieren alta pureza (François Coutte et al., 2017).

2. Justificación

Los biosurfactantes lipopeptídicos producidos por *Bacillus* presentan aplicaciones farmacológicas, médicas, ambientales, agrícolas, alimentarias, detergente, cosméticas, de biorremediación y cuidado personal (Drakontis & Amin, 2020). Por ende, el número de investigaciones sobre ellos sigue aumentando cada año (Henkel et al., 2017). Sin embargo, aún no son producidos comercialmente en grandes cantidades debido a su alto costo de producción, recuperación, purificación y baja productividad (François Coutte et al., 2017).

La mayoría de los estudios sobre producción de LP se han realizado en FML. Este tipo de cultivo presenta algunas dificultades como la formación de espuma asociada con la producción del BS y un incremento en la viscosidad del medio debido a la producción de exopolisacáridos, lo que provoca una baja transferencia de oxígeno (Thomas et al., 2013). Dichos problemas se ven reflejados en el aumento de costos de producción y baja concentración del producto. Por otro lado, la FMS no presenta dichos problemas y son escasos los reportes de producción de LP en este tipo de cultivo, los cuales en su mayoría han utilizado soportes naturales (no inertes), residuos agrícolas o medios de cultivo complejos.

Es importante entender la fisiología del microorganismo en el bioproceso, para poder incrementar la producción de los LP. Estudios previos han evaluado las condiciones nutricionales y ambientales y mejorado las cepas buscando favorecer el bioproceso, pero poco se ha investigado sobre el efecto del C/N del medio de cultivo, la relación del metabolismo primario y el uso de un tipo de cultivo prometedor como la FMS en la producción de LP.

En este trabajo se analiza la producción de LP en FMS usando un medio líquido definido adsorbido en un soporte inerte que permite controlar las condiciones nutricionales de la fermentación, facilitar la recuperación del producto, y comparar con la FML, utilizando cepas de diferentes especies de *Bacillus*, silvestres y mutantes. Lo anterior, con el fin de comprender la fisiología de las cepas *Bacillus*, la relación con el metabolismo primario y algunos nutrientes limitantes claves, como el nitrógeno y el carbono del bioproceso. Asimismo, incrementar la producción de los LP aprovechando los beneficios de la FMS.

3. Hipótesis

El uso de un medio definido adsorbido en un soporte inerte permite obtener procesos con mayor producción de lipopéptidos generados por *Bacillus* spp. en FMS que en FML y una mejor descripción de la fisiología y del metabolismo del bioproceso.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Obtener una alta producción de lipopéptidos por *Bacillus* en cultivo en medio sólido utilizando un medio definido adsorbido en un soporte inerte e identificar la relación entre los metabolismos primario y secundario relacionados con la síntesis de lipopéptidos.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener al menos una cepa mutante sobreproductora de lipopéptidos por mutagénesis inducida.
2. Seleccionar y caracterizar el soporte inerte.
3. Estandarizar un método de recuperación y análisis de lipopéptidos.
4. Determinar el efecto de la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de lipopéptidos por *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
5. Determinar el efecto del tipo de cultivo sobre la producción de lipopéptidos y metabolitos primarios derivados de la síntesis del piruvato para diversas cepas de *Bacillus*.

5. Estrategia experimental

La estrategia experimental consistió en dos partes (Figura 4). En la parte I se utilizó *B. subtilis* ATCC 6633 para las experimentaciones las cuales incluyen: mejorar la cepa por mutagénesis inducida, seleccionar el soporte inerte que más beneficia el bioproceso y evaluar el efecto C/N del medio de cultivo en la producción de los LP.

En la parte II se compararon cepas de diferentes especies de *Bacillus* en FMS y FML. Se evaluó y relacionó la producción de LP con la biosíntesis de metabolitos primarios, crecimiento de biomasa y consumo de glucosa.

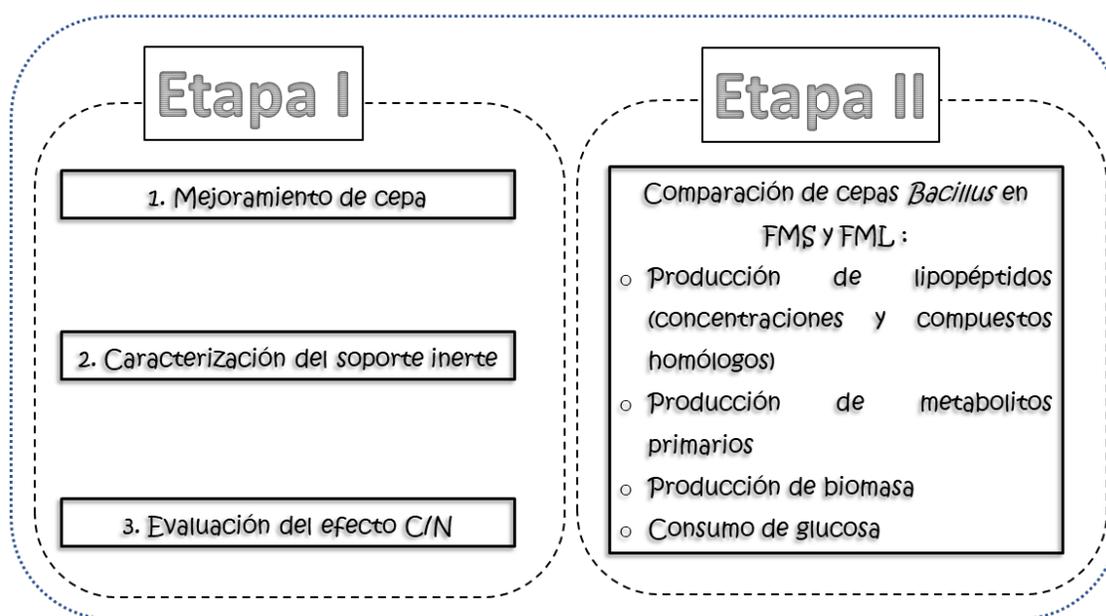


Figura 4. Estrategia experimental.

ETAPA I

6. Mejoramiento de cepa

Dentro de las estrategias para el mejoramiento de cepas utilizadas para incrementar la producción de los metabolitos microbianos se encuentra la mutación inducida. Este tipo de mutación requiere del uso de un agente mutagénico ya sea físico o químico. Además, involucra dos etapas, la exposición del microorganismo al mutágeno y luego el aislamiento de los mutantes para su posterior ensayo y selección. Así, para el proceso de mejoramiento de la cepa se usó el agente físico luz ultravioleta (UV), ya que no requiere de gran experiencia en el método, ni una infraestructura amplia (Santander-Rodríguez, 2017). Se realizó una curva de supervivencia respecto al tiempo de exposición al agente, y para la selección de los microorganismos mejorados se usaron diferentes criterios, los cuales resultaron los más convenientes a partir de una comparación previa de diferentes posibles formas de selección (Anexo A). Los mutantes se fueron descartando poco a poco por no satisfacer los criterios de selección hasta elegir una posible cepa sobreproductora, a la cual se evaluó la estabilidad genética.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa de la colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares del CINVESTAV (México) con número CDBB 555 correspondiente a la silvestre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 reportada como productora de surfactina e iturina y como cepa control una *Bacillus subtilis* caracterizada por su producción baja de LP.

6.1.2 Conservación de la cepa

A corto plazo, se propagó la cepa por estría en tubos inclinados con agar nutritivo (Bioxon). Después de la inoculación, se incubaron los tubos a 30 °C durante 24 h, posteriormente se conservaron a 4 °C por un periodo no mayor a 2 semanas. A mediano plazo, la cepa se conservó en tubos crioprotectores (Yeast & Mould - Protect) a -20 °C.

6.1.3 Radiación con luz ultravioleta y curva de supervivencia

A partir de un tubo inclinado de agar nutritivo con la cepa silvestre e incubado al menos 24 h, se inocularon 2 tubos de ensayo con 3 mL de caldo nutritivo (Bioxon) con tapón de algodón. La inoculación se realizó con asa microbiológica. Se incubaron los tubos a 30 °C por 24 h a 200 rpm. Posteriormente, se vació el contenido de cada tubo en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de caldo nutritivo (Bioxon). Se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 16 h. Posteriormente, el inóculo se centrifugó, el sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 29 mL de glicerol estéril al 20% (p/v) y se homogenizó la suspensión.

Se vertió la suspensión de bacterias en glicerol al 20% (p/v) en una caja Petri estéril (15x100 mm) y se colocó bajo una lámpara de luz ultravioleta 6 W (300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 254 nm) a una distancia de 30 cm durante 60 segundos (Zhang, 2012). La suspensión se mantuvo a una agitación de 30 rpm y el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad y en completa oscuridad. Se tomaron muestras de 1 mL cada 10 segundos, que se guardaron en viales protegidos con papel aluminio para mantenerlas en oscuridad y se almacenaron a 4 °C para su análisis y posteriormente a -20 °C. Para el análisis de las muestras, se tomaron 100 μL de cada una de ellas, las cuales se diluyeron en secuencia 1:10 v/v en solución fisiológica estéril para determinar su viabilidad mediante el método de recuento en placa. Para ello, se usaron 100 μL de cada muestra diluida y se inocularon cajas Petri con agar nutritivo (pH 7.0) por duplicado. Las cajas se incubaron en oscuridad a 30 °C por 48 horas y se contaron las UFC de las diluciones que las tenían entre 30 y 300 UFC (Xu et al., 2011). Se realizó una curva de tiempo de exposición al mutágeno contra el porcentaje de supervivencia. La supervivencia se estimó dividiendo las UFC sobrevivientes de un tiempo muestreado entre las UFC del tiempo cero y multiplicando por cien. El tiempo cero se consideró en el resultado de UFC que se obtuvo con base en la cepa no irradiada.

6.1.4 Selección de los mutantes sobreproductores

Para la selección de los posibles mutantes sobreproductores se les realizaron tres filtros. La selección primaria, fue la actividad hemolítica, la secundaria, la producción de LP en FMS a las 48 h de cultivo y la terciaria, cinéticas de producción de LP durante 60 h por FMS. Se utilizó como testigo la cepa no irradiada.

Actividad hemolítica

A partir de las muestras obtenidas a los 10 y 20 s de exposición a la luz UV, se inocularon 100 μL por extensión en placa en cajas con agar sangre (MCD LAB, Anexo A), las cuales se

incubaron por 3 días a 30 °C (Zhao et al., 2012). Aquellas colonias que tuvieron una muy alta y baja actividad hemolítica se enumeraron aleatoriamente y se les estimó el índice de potencia (IP) el cual se definió como $IP = \text{Diámetro de hemólisis} / \text{Diámetro de la colonia}$.

Fermentación en medio sólido

A partir de un tubo inclinado de agar nutritivo con la cepa silvestre o mutante incubada por 24 h, se inocularon con asa microbiológica 2 tubos de ensayo con 3 mL de caldo nutritivo (Bioxon) con tapón de algodón. Se incubaron los tubos a 30 °C por 24 h a 200 rpm (medio semilla 1). Posteriormente, se vació el contenido de cada tubo en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de caldo nutritivo (Bioxon) respectivamente. Se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 24 h (medio semilla 2). Al final de este tiempo, los cultivos fueron usados para inocular el medio de cultivo utilizado para los estudios de FMS.

Para la FMS se usó agrolita (Agrolita ®, Minerales Expandidos S.A. de C.V.) como soporte sólido, la cual se impregnó con un medio de cultivo mineral definido suplementado con glucosa como fuente de carbono, pH 7.0 (Tabla 4), resultado del trabajo de maestría de Valdés-Velasco, 2016. Al medio se le adicionó inóculo correspondiente al 10% del volumen de medio final, se agitó y se adicionaron 2.35 mL a frascos ámbar de 30 mL que contenían 1 g de agrolita seca. Se homogeneizaron y se incubaron a 30 °C. La humedad inicial del medio sólido fue de 60%.

Tabla 4. Medio de cultivo para la FMS.

Componente	g/L
Glucosa	120
NH ₄ NO ₃	12
Na ₂ HPO ₄	12.78
KH ₂ PO ₄	16.33
CaCl ₂ (x10 ³)	3.09
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.77
Na-EDTA (x10 ³)	3.50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.56
MnSO ₄ ·H ₂ O (x10 ²)	16.06

Nota: (x10³) indica que el valor presentado en g/L esta multiplicado por dicho valor. Lo mismo aplica para (x10²).

6.1.5 Recuperación de lipopéptidos

Para recuperar los LP producidos, se tomó 1 g de materia húmeda (agrolita + caldo de cultivo+ biomasa + LP) al cual se le adicionaron 10 mL de agua destilada, se agitó con vórtex 2

minutos, se tomaron 8 mL del extracto resultante (extracto crudo) evitando la agrolita y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min (Valdés-Velasco, 2016).

6.1.6 Cuantificación de los lipopéptidos

La cuantificación de los LP se realizó de forma indirecta por medio de la actividad emulsificante (Anexo B). La actividad emulsificante (AE) se determinó del extracto crudo. A 400 μ L de muestra se agregaron 2.6 mL de una mezcla de buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O, pH 7.0) y 40 μ L de mezcla n-hexadecano: 2-metilnaftaleno 1:1 (v: v) (Ortega-de la Rosa et al., 2018). Se agitó en vórtex por 2 min y se leyó la densidad óptica a los 5 min a 600 nm. Una unidad emulsificante (UE/mL) se define como la cantidad de producto necesaria para incrementar la absorbancia en 0.1 unidades bajo las condiciones de ensayo.

Se estimó la actividad emulsificante de los LP como equivalentes a surfactina (Eq SF), para ello se basó en una curva estándar de concentraciones conocidas de surfactina (Sigma Aldrich) y posteriormente, se relacionó con los gramos de materia seca final (gmsf) (Anexo B). En la curva estándar se presenta concentraciones de surfactina conocidas y su equivalente actividad emulsificante expresada como UE/mL. Se encuentra la relación de 48.78 UE/mg SF. La pendiente calculada sin intercepto respecto a la que considera el intercepto presenta un error del 12.8 %.

6.1.7 Estabilidad de la mutante

Para la evaluación de la estabilidad, la posible mutante sobreproductora se sembró en estría por duplicado en agar nutritivo, se incubó a 30 °C por 24 h y se identificó como la primera generación. Luego, a partir de la primera generación, se propagó repitiendo el mismo procedimiento, esto se realizó hasta obtener la quinta generación. Después, utilizando cada generación se realizó una FMS por 48 h y se estimó la producción de LP (Meng et al., 2016).

6.1.8 Análisis estadístico

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

6.2 Resultados y discusión

Para seleccionar los posibles mutantes sobreproductores, primero, se realiza una curva de supervivencia para conocer el tiempo de radiación UV adecuado a exponer al microorganismo y

generar mutaciones sin dosis letales. En la Figura 6 se observa que el porcentaje de supervivencia decae de una manera drástica en los primeros 10 s de la radiación UV. Este comportamiento es diferente a lo descrito por Xu et al. (2011) y Zhang (2012), quienes utilizando una lámpara de 15 W y condiciones similares a las de este trabajo, a los 10 s presentaron una tasa de supervivencia entre 45 a 70 %. Es posible que esta diferencia se deba a que ellos suspenden las bacterias en agua salina o un medio de cultivo con sales, los cuales posiblemente pueden refractar la luz U.V y no irradiar de manera eficiente a las bacterias (Kieser et al, 2000). Miller, 1985 reporta que entre 3 y 5% de supervivencia es el intervalo donde se esperaría que la mutación sea de tipo puntual. Si se usan dosis más prolongadas de radiación, aumenta mucho la probabilidad de obtener mutaciones múltiples, las cuales no son deseadas (Baños, 2010). Por esta razón, para las siguientes etapas de selección se evalúan las muestras obtenidas en los tiempos de exposición 10 y 20 s que corresponden a 7 y 1.4 % de supervivencia, respectivamente.

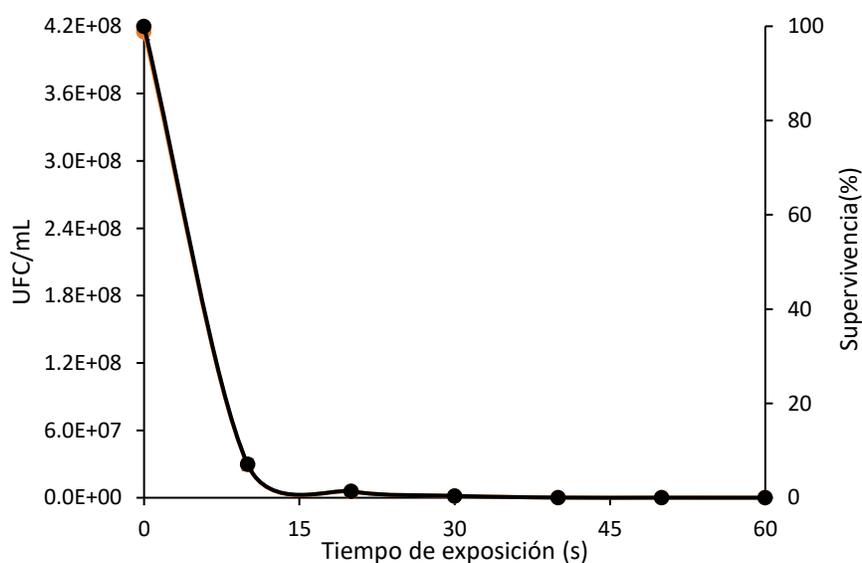


Figura 5. Curva de supervivencia. Porcentaje de supervivencia y UFC/mL para cada tiempo de exposición. Se consideró el tiempo cero como el 100%.

6.2.1 Selección de mutantes

A partir de las muestras obtenidas en los tiempos de exposición de 10 y 20 s, se realiza un rastreo de UFC sobre agar sangre para observar la actividad hemolítica de los mutantes. La hemólisis es provocada por la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los glóbulos rojos del medio a causa de algunos tipos de BS secretados, como los LP (Becerra & Horna, 2016). Existen 3 tipos de hemólisis: gamma, alfa y beta. Gamma es la

ausencia de hemólisis, alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce coloración verde oscura, esto resulta de la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina verde por el peróxido de hidrógeno secretado por las bacterias, o debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina; y beta se refiere a la lisis completa de las células de la sangre que rodea a la colonia, se presenta como un color transparente, de color amarillo en el medio de agar sangre (Tomado de <https://microbiologyinfo.com/haemolysis-of-streptococci-and-its-types-with-examples/> el 06 de Mayo 2021). El tipo de hemólisis que genera los LP no se ha especificado.

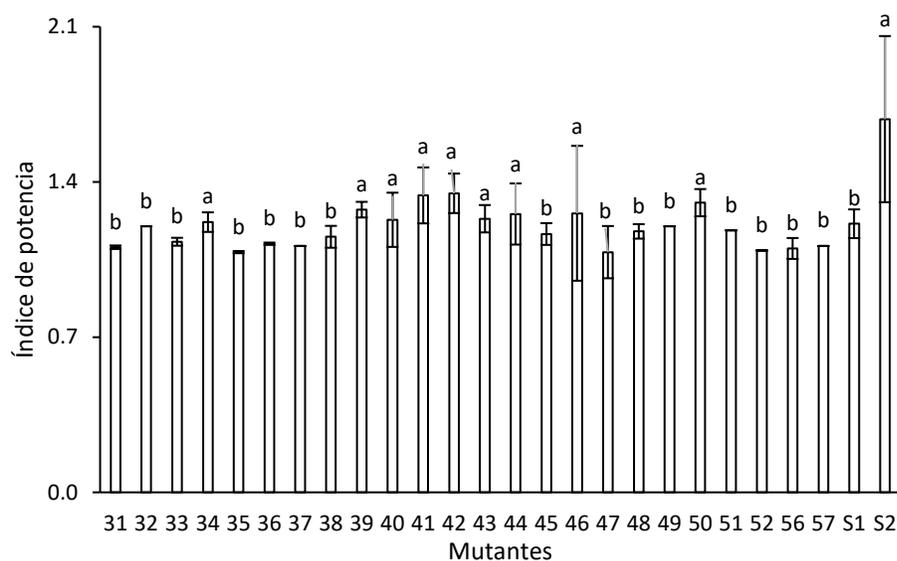


Figura 6. Índice de potencia de los mutantes. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: *B. subtilis* ATCC 6633; S2: *B. subtilis* sp. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

En la primera búsqueda de mutantes se seleccionan 24 UFC (mutantes) ya que presentan los halos de hemólisis más grandes de todas las que crecieron. Luego, se etiqueta a cada mutante con un número que va desde el 31 hasta el 57 y se les estima el IP. En el análisis del IP se observa que la cepa *B. subtilis* sp. presenta el valor más alto en comparación con los de las mutantes y de la *B. subtilis* ATCC 6633 (Figura 7). Es un resultado inesperado ya que *B. subtilis* sp se caracteriza por producir niveles más bajos de LP que la cepa ATCC 6633. A pesar de ello, varios mutantes procedentes de ATCC 6633 presentan IP más altos que su parental. Así, de este primer filtro se eligen 11 mutantes; por un lado, los etiquetados como, 41, 42, 50, 39 y 46 ya que presentan los primeros cinco valores más altos de IP; por el otro lado, 35, 52, 57, 56 y 47 porque

son las que alcanzan los cinco valores más bajos en comparación con ATCC 6633 y el mutante 51 por mostrar un valor similar a la cepa parental.

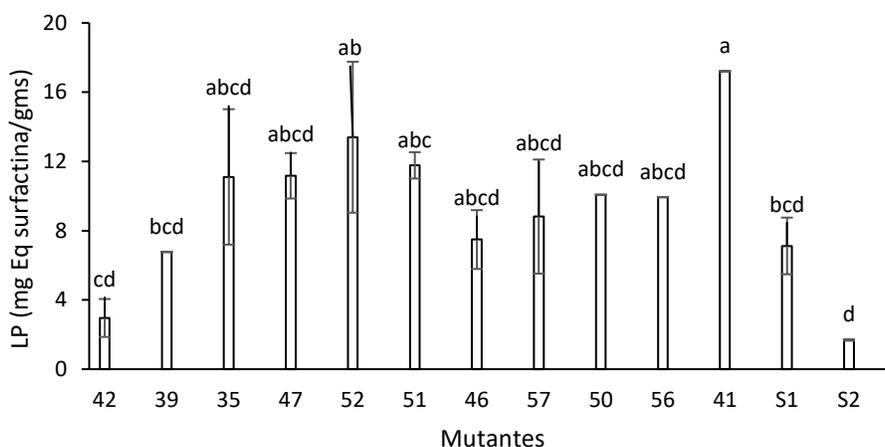


Figura 7. Producción de LP a las 42 h por 11 mutantes en medio sólido. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: *B. subtilis* ATCC 6633; S2: *B. subtilis* sp. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

Posteriormente, para el siguiente paso de selección se realiza una FMS durante 42 h con los 11 mutantes (Figura 8). El mutante 41 presenta el valor más alto de LP y el más bajo el 42. Este es un resultado inesperado ya que 41 y 42 presentan producción de LP no proporcional al IP que mostraron, los cuales eran similares y por encima del de ATCC 6633. Además, la cepa *B. subtilis* sp. exhibe la producción más baja de LP en contraste con el IP más alto obtenido. Por lo tanto, relacionando los IP con las concentraciones de LP que se obtienen de cada mutante, se encuentra que el grado de lisis de los glóbulos rojos no es proporcional con el nivel de producción de LP como lo menciona Mulligan et al. (1989) y Desai & Banat, 1997. La razón puede ser que el grado de formación de la zona hemolítica en las placas de agar con sangre no depende únicamente de las concentraciones de LP, sino que puede haber restricción de la difusión del BS a través del agar, también haber producción de enzimas líticas o producción de factores de virulencia que lisa los eritrocitos, generando falsos positivos (Jain et al., 1991; Lin et al., 1998). Por ello, la actividad hemolítica requiere ser apoyada por otras técnicas basadas en mediciones de la actividad superficial o de la concentración de LP (Becerra & Horna, 2016).

Se observa que de los 11 mutantes, 8 alcanzan concentraciones más altas que la cepa parental. Sin embargo, para el siguiente paso de selección que consiste en llevar a cabo con cada mutante una cinética en FMS por 60 h tomando muestra cada 12 h, por cuestiones prácticas

para el desarrollo de las experimentaciones se escogen los tres mutantes que presentan en la FMS las concentraciones más altas de LP, 41, 51 y 52 y una cepa con producción mayor que la cepa parental, 35. En la FMS, *B. subtilis* sp. y el mutante 41 muestran la menor y mayor producción de LP respectivamente (Figura 9). La cepa 41 alcanza la máxima concentración a las 24 h, *B. subtilis* sp. a las 36 h, ATCC 6633 y 35 a las 48 h y 51 y 52 a las 60 h. Los mutantes 41 y 35 son los que alcanzaron 1.4 y 1.2 veces más producción que la cepa parental respectivamente, mostrando el 41 más alta concentración 1.2 veces que el 35. Si bien, el mutante 41 incrementa la producción y productividad (0.27 mg Eq SF/gms h) de los LP en comparación con los demás mutantes obtenidos, los valores que alcanza se encuentran por debajo de los más altos reportados en FMS (Das & Mukherjee, 2007; Z. Zhu et al., 2014; Zouari et al., 2014). A continuación, con el fin de utilizar el mutante 41 para las experimentaciones futuras, se verifica su estabilidad genética.

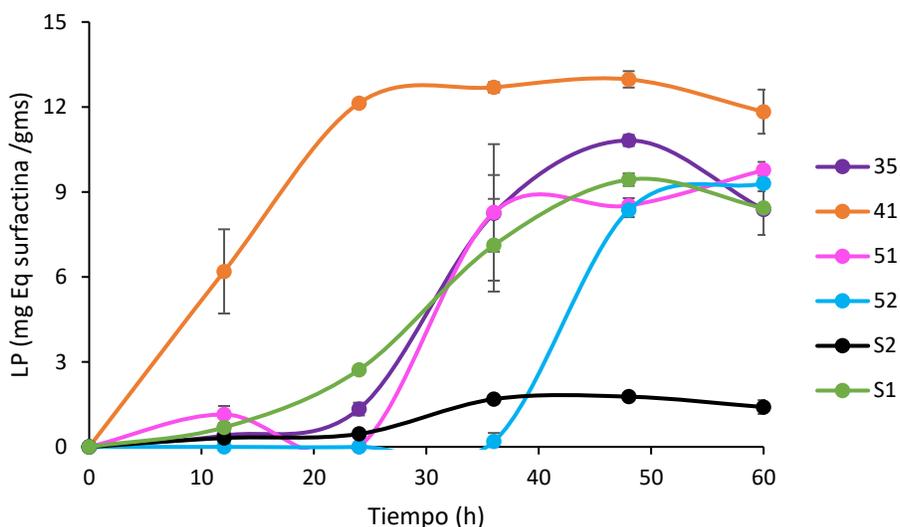


Figura 8. Producción de LP durante 60 h en medio sólido. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. S1: *B. subtilis* ATCC 6633; S2: *B. subtilis* sp.

6.2.2 Estabilidad genética de la mutante

Se selecciona la mutante 41 para realizar los estudios de producción de LP. Para determinar la estabilidad de la cepa mutante, se evalúa la producción de lipopéptidos de la cepa de 1 a 5 generaciones; para ello, se realizan 5 subcultivos y cada uno de ellos se incuba bajo las condiciones de producción de LP. Después de 48 h de cultivo se encuentra que en ninguna de

las generaciones hubo producción de LP; por lo que, la cepa mutante 41 pierde la capacidad de producir lipopéptidos desde la primera generación.

6.3 Conclusiones particulares

Se obtuvieron dos cepas mutantes sobreproductores de LP por mutagénesis inducida, las cepas 41 y 35, presentando 1.4 y 1.2 veces más alta su producción respecto a la cepa silvestre *B. subtilis* ATCC 6633, respectivamente. Sin embargo, la cepa 41 en la prueba de estabilidad genética, pierde la capacidad para producir LP bajo las condiciones de estudio, por lo tanto, no se considera utilizarla para las experimentaciones siguientes.

Además, se encontraron algunas limitaciones, la primera, en el proceso de selección de los mutantes ya que no se cuenta con técnicas rápidas, prácticas, fiables y de alta reproducibilidad para la identificación de la producción de LP en este tipo de estrategia. La segunda limitación, el hallazgo de la no estabilidad genética por parte de la que era la cepa candidata sobreproductora.

7. Caracterización y selección del soporte sólido

En la sección anterior, las FMS se realizan utilizando como soporte sólido agrolita, que es una roca volcánica, inerte y ligera (Tomado de <http://www.dicamex.com.mx/agrolita.html> el 07 de mayo 2021). Sin embargo, la agrolita es un material frágil, con poca resistencia mecánica, por ende, se quiebra fácilmente, formando impurezas (polvo) que dificultan la recuperación y purificación del producto. Por lo tanto, se considera cambiar el soporte sólido para las futuras FMS. En esta sección inicialmente se presenta la comparación de diferentes soportes sólidos en beneficio de la producción de los LP, y posteriormente la caracterización del soporte seleccionado como más favorable para el bioproceso.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Fermentación en medio sólido

A partir de un tubo inclinado de agar nutritivo con *Bacillus subtilis* ATCC 6633, incubada al menos 24 h antes, se inocularon con asa microbiológica 2 tubos de ensayo con 3 mL de caldo nutritivo (Bioxon) y tapón de algodón. Se incubaron los tubos a 30 °C por 24 h a 200 rpm (medio semilla 1). Posteriormente, en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de caldo nutritivo (Bioxon) se vació el contenido de cada tubo, respectivamente. Se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 24 h (medio semilla 2). Al final de este tiempo, los cultivos fueron usados para inocular el medio de cultivo utilizado para los estudios de FMS.

La FMS se desarrolló utilizando como soportes agrolita (tamaño de partícula entre 0.85 y 1.0 mm), aserrín de pino (tamaño de partícula entre 0.42 y 3.3 mm) y espuma de poliuretano (PUF), en frascos ámbar de 30 mL, separadamente. Los soportes se lavaron con agua caliente y agua destilada y posteriormente se secaron a 100 °C hasta peso constante. El medio de impregnación en el soporte sólido fue el medio mineral definido que se presenta en la Tabla 4. Se adicionó inóculo correspondiente al 10% del volumen de medio final al medio de cultivo. Para la agrolita y aserrín, se agitó el medio inoculado y se tomaron 2.35 mL que se vertieron a los frascos que contenían 1 g del soporte correspondiente y para la PUF, se adicionaron 5 mL del medio inoculado a frascos que contenían 1 lámina cilíndrica (1 cm de alto, 3.5 cm diámetro) del soporte de densidad 27 Kg/m³. También, se llevó a cabo FML, en la cual se utilizaron matraces de 250 mL y se les adicionaron 50 mL de medio de cultivo con 10 % inóculo y se agitaron constantemente

las unidades experimentales a 200 rpm. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 84 h.

7.1.2 Recuperación y cuantificación de lipopéptidos

Para recuperar los LP producidos en las FMSs, en el caso de la agrolita y el aserrín se utilizó la misma metodología descrita en la sección 6.1.5. En la FML, se centrifugó el contenido de cada matraz a 10000 rpm por 5 min y se tomó el sobrenadante para el análisis cuantitativo. En las fermentaciones con PUF, se adicionaron 10 mL de agua destilada al frasco que contenía el soporte sólido, se abolló con un embolo de jeringa varias veces, consecutivamente se tomó la suspensión (extracto 1), después se introdujo la lámina en una jeringa de 60 ml, se presionó con el émbolo y se recuperó el líquido extraído (extracto 2). Se mezclaron los extractos 1 y 2, recuperando aproximadamente 15 ml de suspensión (Anexo C). Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento de recuperación que se realizó para la FML. El sobrenadante libre de células se le denominó extracto crudo. En referencia a la cuantificación de los LP, se siguió la misma metodología presentada en la sección 6.1.6.

7.1.3 Humedad y pH

La humedad se midió con 1 g de muestra fermentada en una termobalanza (Ohaus MB45) a 105 °C hasta peso constante. El extracto crudo se utilizó para el análisis de pH mediante el uso de un potenciómetro. La humedad y el pH se midieron al inicio y final del tiempo de incubación de cada fermentación.

7.1.4 Caracterización del soporte inerte

Se caracterizó y comparó las propiedades de diferentes densidades de espuma de poliuretano (PUF, por sus siglas en inglés PolyUrethane Foam), en forma de cilindros de 3.5 cm de diámetro y 1 cm de alto. Las siguientes características de las densidades 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³ fueron evaluadas:

Capacidad de retención de agua (CRA)

Se utilizaron 5 cilindros de PUF por cada densidad. Se adicionaron 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL, se agregó 1 cilindro de PUF previamente pesado, se presionó con una superficie plana hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejó hidratar durante 10 min. Se retiró con una pinza, se dejó escurrir y se pesó en la balanza (Nuñez-Reyes, 2012). La CRA se estimó con la siguiente Ecuación 3.

$$\text{CRA} = (\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso de la muestra seca}) / \text{Peso de la muestra seca}$$

(Ecuación 3)

Efecto de la PUF sobre la retención y pH del medio de cultivo

Se utilizaron 2 cilindros de PUF por cada densidad. Se adicionaron 50 mL de medio de cultivo (Tabla 4) en un vaso de precipitado de 250 mL y se agregó 1 cilindro de PUF previamente pesado en la balanza, se presionó con una superficie plana hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejó hidratar durante 10 min. Se retiró con una pinza, se dejó escurrir y se pesó en la balanza. Treinta segundos, se prensó dentro de una jeringa de 60 ml y se pesó nuevamente. Se estimó la cantidad del medio de cultivo en la PUF que se impregnó y también el que mantuvo retenido después de prensar. También, se midió el pH inmediatamente después de prensar la PUF.

Velocidad constante de secado y humedad crítica

Se utilizó 1 cilindro de PUF por cada densidad. Se adicionaron 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL y se agregó 1 cilindro de PUF previamente pesado en la balanza, se presionó con una superficie plana, hasta retirar el aire contenido en los poros y se dejó hidratar durante 10 min (Nuñez-Reyes, 2012). Se retiró con una pinza, y se colocó en la termobalanza (OHAUS) a 130 °C y se midió el peso húmedo cada 15 s hasta 90 s de peso constante. Con los datos recolectados se construyeron gráficas de velocidad de secado en función de la humedad, como se ejemplifica en la Figura 10. La humedad crítica se estimó de la intersección de la línea correspondiente a la velocidad constante de secado con la de velocidad de secado decreciente.

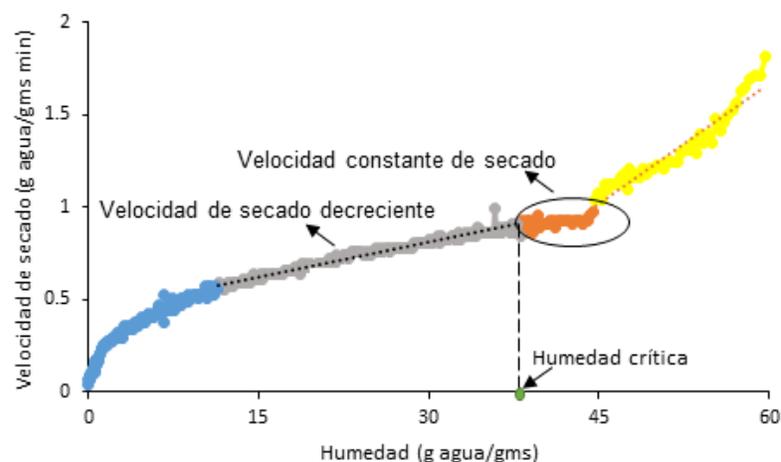


Figura 9. Identificación de la velocidad constante de secado y humedad crítica.

Ensayo de la compresión

Para estimar el módulo de elasticidad o módulo de Young (Smith & Hashemi, 2006), se utilizó un texturómetro Stable Micro Systems, modelo TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, EUA), equipado con una celda de carga de 4.5 kg (25.4 mm diámetro x 35 mm altura). La detección automática del contacto de la sonda cilíndrica de acrílico con la lámina de PUF se realizó a una fuerza de contacto de 0.039 N. Cada cilindro de PUF se comprimió un 70%, usando 1 ciclo de compresión a una velocidad constante del cabezal de 1.0 mm/s. El Software del equipo fue Texture Expert Windows Version 3.2. Este ensayo se realizó por duplicado para cada densidad de PUF con dos repeticiones técnicas. A partir de los datos recolectados se construyeron gráficas de tensión vs deformación, en las cuales se estimó la pendiente en la zona de la recta elástica del material (zona lineal) que corresponde al módulo de elasticidad (Ecuación 4). Siendo E el módulo en pascal, σ fuerza uniaxial por superficie de la unidad, en pascal y ϵ deformación o deformación proporcional (esto quiere decir el cambio de longitud dividido por la longitud original).

$$\text{Módulo de elasticidad (E)} = \text{Tensión } (\sigma) / \text{Deformación } (\epsilon) \text{ (Ecuación 4)}$$

Retención de lipopéptidos

Se utilizaron 18 tubos de vidrio (diámetro x altura: 16 x 10 mm), en los cuales a seis de ellos se les adicionaron un pedazo de PUF (15 mg peso aproximadamente) de densidad 17 Kg/m³, luego a partir de los seis tubos, a dos tubos se le adicionaron 45 μ L de LP crudos de 16 g/L, a otros dos 20 g/L y los dos restantes 24 g/L. De igual forma, a otros seis tubos de los 18 se les agregaron PUFs de 27 Kg/m³ y se realizó el mismo procedimiento que a los tubos con PUF 17 Kg/m³. A los seis tubos restantes de los 18 no se les adicionaron PUF, pero si se adicionaron 45 μ L de LP crudos de 16 g/L a dos de ellos, a otros dos 20 g/L y a los dos sobrantes 24 g/L. Después, los tubos se mantuvieron por 36 h a 4 °C. Para la recuperación de los LP, se adicionaron 405 μ L de agua destilada a cada tubo, se llevó a vórtex por 30 s y al extracto se midió la AE comparando el efecto de la presencia o ausencia de la PUF en la retención de LP.

Efecto de la PUF en el crecimiento de la bacteria

El crecimiento se estimó indirectamente mediante respirometría (Torres-Mancera, 2013). A 6 matraces de 250 mL se adicionaron 50 mL de medio de cultivo (Tabla 4), a 3 de ellos se adicionaron 200 mg de PUF molida de densidad 17 Kg/m³. Los matraces se conectaron a un metabolímetro a un flujo de aire de 20 a 30 mL/min por matraz durante 45 h a 30 °C y 200 rpm (Saucedo-Castañeda et al., 2016).

Se realizaron los cálculos con los datos experimentales obtenidos por el metabolímetro y la ayuda de una hoja de cálculo. Los datos de producción de CO₂ se integraron y se graficaron vs tiempo y la curva obtenida se ajustó a un modelo logístico usando la herramienta “Solver” del programa Excel (Microsoft). Con base en el ajuste se determinó la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) y el tiempo de fase lag (Favela-Torres et al., 2001).

7.1.5 Análisis estadístico

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

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Comparación de soportes sólidos en la producción de lipopéptidos

La comparación de diferentes soportes y la FML en la producción de LP se realizó utilizando el mismo medio de cultivo (Tabla 4). Los soportes evaluados, aserrín de pino, agrolita y PUF son de origen y composición distinta. El aserrín es un residuo de la madera y es un material orgánico mientras que la agrolita es de origen volcánico y es inorgánica, y la PUF es un material sintético y poroso. En la Figura 11 se observa que el aserrín es el soporte que menos favorece la producción, una de las posibles razones es que el material presenta actividad antibacteriana, la cual no permite el desarrollo adecuado de la cepa y por ende una alta producción de LP (Tomado de <https://www.forestmaderero.com/articulos/item/el-pino-es-el-horror-de-una-bacteria-hospitalaria.html> el 10 de mayo 2021). También, se aprecia que desde el tiempo cero el aserrín muestra ya presencia de LP, la cual no es conveniente ya que interfiere con la estimación de los productos generados una vez inicia la fermentación. Esta interferencia puede ser debida a que la madera contiene BS naturales y uno de los principales componentes de la resina de pino es la colofonia (rosin o resina de goma) que se utiliza como materia prima para producir surfactantes de tipo aniónico, catiónico y zwitteriónico (Pichardo-Sánchez, 2019). Así que el aserrín es descartado como soporte para el desarrollo del bioproceso. Por otro lado, la mayor concentración de LP se obtiene en FMS con agrolita y PUF, y es similar a la obtenida en FML. La duración de la fase de adaptación es mayor en el medio sólido con PUF (24 h) y en FML (30 h). La productividad de LP con agrolita y PUF es mayor (100 mg/L h) que las obtenidas con aserrín y en FML (41 y 67 mg/L h respectivamente).

Con base en los resultados, la agrolita y PUF son buenos candidatos como soporte inerte para el bioproceso. Sin embargo, como se menciona en el inicio de esta sección, el uso de la agrolita genera algunas dificultades en la recuperación y análisis de LP. Por lo tanto, se propone

como alternativa de soporte la PUF, que ha reportado una capacidad de retención de agua 12 veces mayor que la agrolita, la cual permite producir mayor cantidad de LP (Juárez-Cárdenas, 2015; Nuñez-Reyes, 2012). No obstante, al material seleccionado se evalúan más características consideradas necesarias para el desarrollo del bioproceso que a continuación se van a describir.

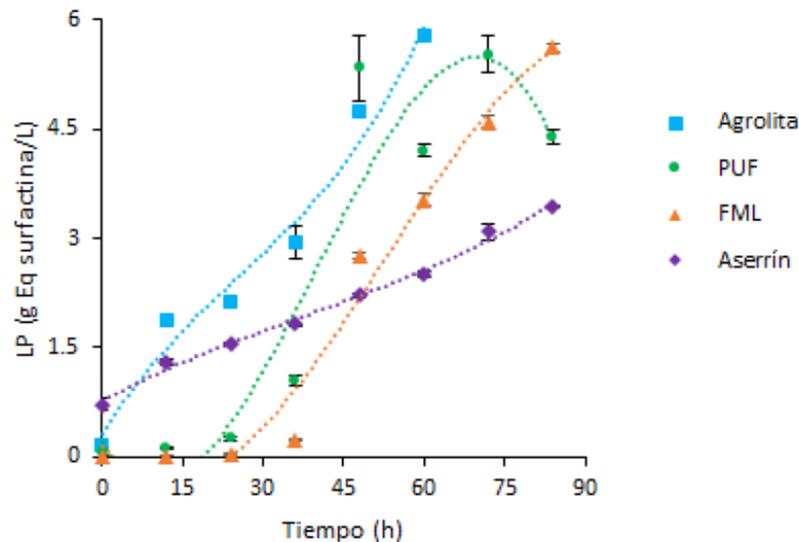


Figura 10. Comparación de soportes en FMS y FML

7.2.2 Caracterización del soporte sólido

La PUF es un material con alta capacidad de retención de agua, no es costoso, no se deteriora con el agua, presenta resistencia mecánica y es un soporte inerte. Existe gran variedad de PUFs, las cuales dependen de su composición química, estructura y morfología de la microfase resultante (Yilgor et al., 2006). Por ello, se comparan 5 densidades de PUF para caracterizarlas y posteriormente seleccionar la densidad que presenta las cualidades deseadas para la producción de LP en medio sólido como alta CRA, no generación de cambios en el pH del medio de cultivo, no inhibición de crecimiento de la bacteria, no retención de LP, resistencia mecánica (a la compresión) y a perder fácilmente el agua contenida. Las densidades evaluadas son 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³ en forma de cilindros de 3.5 cm de diámetro por 1 cm de alto.

Capacidad de retención de agua

En la Figura 12 se muestra la CRA de las diferentes densidades de PUF evaluadas. Se observa que a medida que incrementa la densidad del soporte existe una menor CRA. Este comportamiento se debe a que va disminuyendo los espacios vacíos del soporte que ocupa el agua a medida que va aumentando la masa respecto al volumen del sólido (Burés et al., 1997). La CRA de la densidad más baja (17 Kg/m³) respecto a la más alta evaluada (35 Kg/m³) es 2.6

veces mayor. Un soporte con una mayor CRA permite impregnar más medio de cultivo y de esa forma producir quizás más cantidad de producto. Sin embargo, un soporte muy saturado en agua posiblemente bloquea los poros de la PUF obstruyendo la difusión del oxígeno a través de la matriz del material (Jiménez-Peñalver et al., 2018).

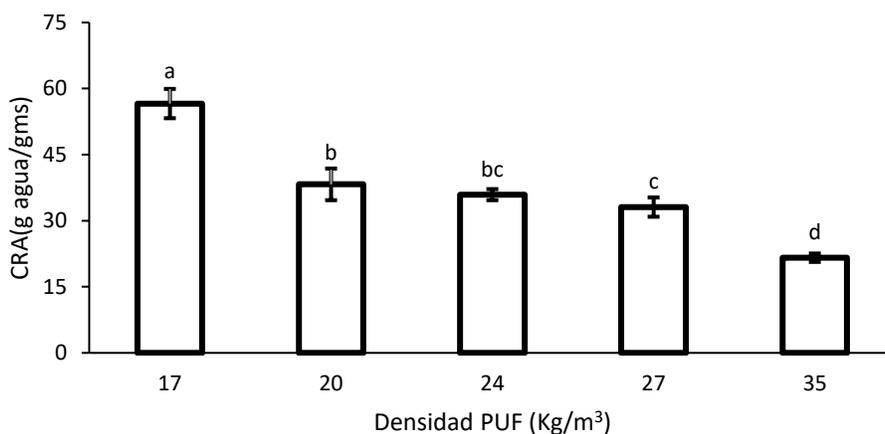


Figura 11. Capacidad de retención de agua de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por quintuplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

Efecto de la PUF sobre la recuperación del medio de cultivo

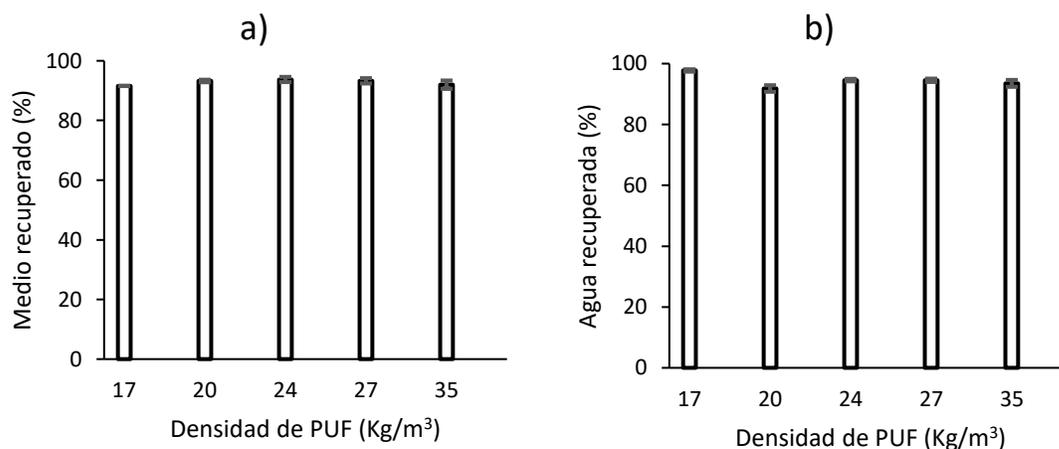


Figura 12. Porcentaje de a) Medio de cultivo y b) Agua recuperada después del prensado de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

En la Figura 13, se presenta el porcentaje de recuperación del medio de cultivo y el agua después saturar el soporte con cada líquido y prensarlo. A partir de las diferentes densidades de PUF se recupera entre el 90-95% del medio de cultivo y agua impregnada y más de 98% del agua impregnada en la PUF 17 Kg/m³. Este resultado demuestra que el uso de la PUF facilita los procesos de recuperación de los LP.

Porcentaje de retención de lipopéptidos

Se realiza la evaluación de la retención en el soporte de los LP crudos bajo diferentes concentraciones (16, 20 y 24 g/L) una vez se impregnan a ciertas densidades de PUF (17 y 27 Kg/m³) y posteriormente se recuperan. En la Figura 14 se observa que los LP crudos se recuperan 100% independiente de la concentración utilizada y la densidad de la PUF. Esta característica es imprescindible para considerar la PUF como un soporte sólido para llevar a cabo el bioproceso en FMS, el cual debido a que no retiene LP, no dificulta la recuperación y análisis de estos productos.

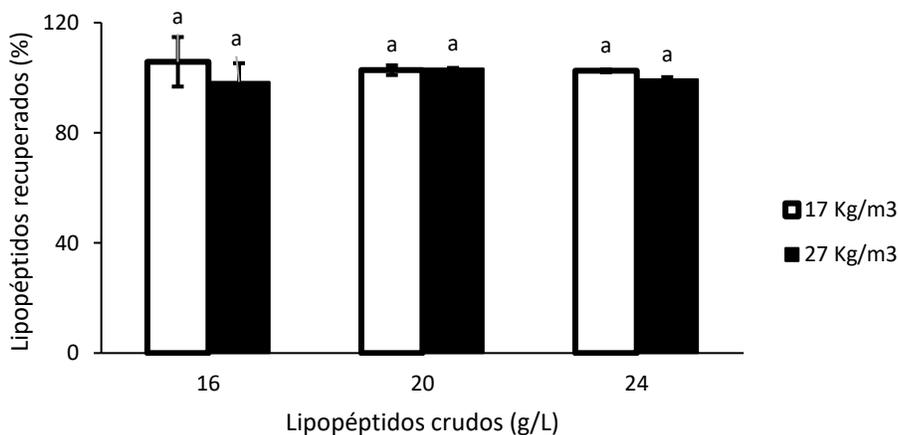


Figura 13. Lipopéptidos recuperados de las densidades de PUF 17 y 27 Kg/m³. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

Efecto de la PUF en el pH del medio de cultivo y agua

El pH es un parámetro importante ya que a pH ácidos (pH<5) los LP se precipitan (Yeh et al., 2006). En la Tabla 5, se muestra el efecto de las diferentes densidades de PUF sobre el pH del agua y el medio de cultivo que se impregnan y luego se recuperan por prensado de los soportes. El pH inicial del agua evaluada y el medio de cultivo es de 7.0. Las diferentes densidades generan en el agua un incremento de pH de a lo mucho media unidad y en el medio de cultivo menor a

una centésima de unidad. Se infiere que las PUF no presentan interacciones químicas con los líquidos evaluados que generen cambios grandes en el pH. En el caso del medio de cultivo, es posible que el efecto amortiguador sobre el pH es debido al alto contenido de fosfatos (Tabla 4). Por lo tanto, se descarta la influencia de las PUFs en generar variación de pH en el medio de cultivo.

Tabla 5. Efecto de diferentes densidades de PUF en el cambio de pH del agua y en el medio de cultivo

Densidad de PUF (Kg/m ³)	17	20	24	27	35
Agua	0.18 ± 0.06	0.39 ± 0.13	0.41 ± 0.18	0.28 ± 0.08	0.45 ± 0.09
Medio de cultivo	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01

Efecto en el crecimiento de la bacteria

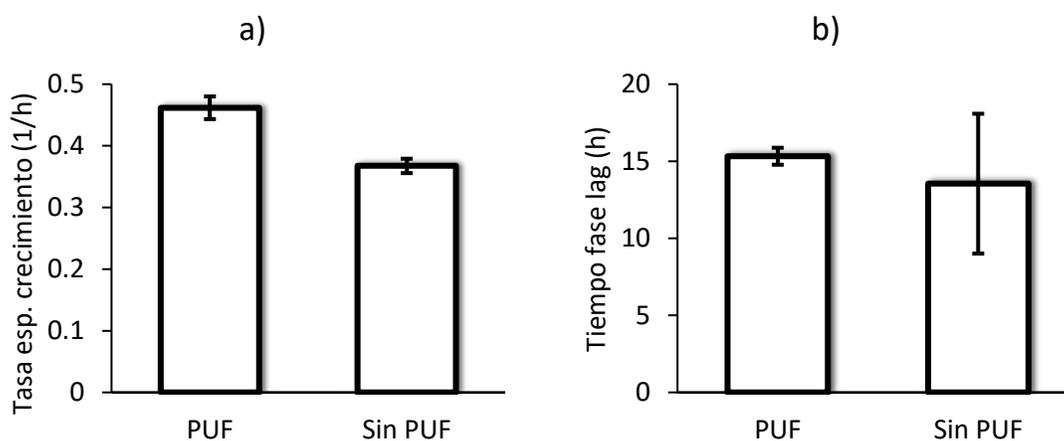


Figura 14. Efecto de la PUF en la a). Tasa específica de crecimiento y b). Tiempo de fase Lag. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

Se compara el efecto de la presencia y ausencia de PUF en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria. De acuerdo a lo reportado por Saucedo-Castañeda et al. (1994), la producción de CO₂ es una medida indirecta del crecimiento y en la fase exponencial la μ_{CO_2} equivale a la tasa específica de crecimiento (μ). Por lo tanto, se estima los parámetros μ_{CO_2} y tiempo de fase Lag, a partir de los valores de concentración de CO₂ obtenidos en las fermentaciones. En la Figura 15.a se aprecia que no hay un efecto negativo de la PUF presente en el medio de cultivo sobre la μ del microorganismo. De hecho, μ aumenta 1.3 veces respecto a la fermentación sin presencia de PUF. En cuanto al tiempo de fase Lag (Figura 15.b), no hay

diferencias importantes entre los cultivos con y sin PUF. Con base en estos parámetros, se comprueba que la presencia de PUF no afecta de forma negativa el crecimiento del microorganismo y en cambio parece favorecerlo como lo reportan Lima-Pérez et al. (2019) y Pérez Sánchez (2014).

Resistencia a la compresión

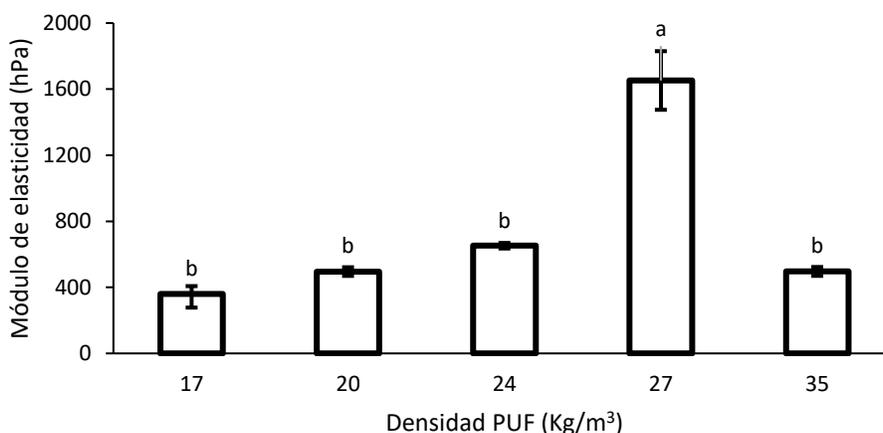


Figura 15. Módulo de elasticidad de las densidades de PUF 17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

La resistencia de un material a la compresión se determina por el módulo de elasticidad o módulo de Young. A mayor resistencia, el valor del módulo es mayor, es decir que requiere aplicar una mayor compresión para la deformación del material. En la Figura 16 se muestra el módulo de elasticidad correspondiente a cada densidad, estimado a partir de la pendiente de la recta en la zona lineal correspondiente a la recta elástica del material (Anexo E). Se encuentra que a medida que aumenta la densidad, el módulo también hasta la densidad 27 Kg/m³ ya que posteriormente disminuye abruptamente. La resistencia a la compresión no solo depende de la densidad sino de otros factores tales como la composición química, morfología y microestructura, por ejemplo el tamaño y forma de las celdas, porosidad, cristalinidad, polimerización, entre otros (Serrano et al., 2017; Yilgor et al., 2006), así que para comprender mejor dicho resultado será necesario realizar pruebas complementarias a los materiales que para el objetivo de este trabajo no fueron indispensables.

Particularmente, la densidad de 27 Kg/m³ presenta una mayor resistencia a la compresión de hasta 4.6 veces mayor en comparación con las otras densidades. Esta característica del material

es importante a futuro para el diseño del biorreactor en FMS, ya que previene el escurrimiento del líquido fermentado.

7.3 Conclusiones particulares

La FMS frente a la FML aumentó la productividad de los LP. Por ende, se compararon diferentes soportes como el aserrín de pino, la agrolita y la PUF para seleccionar aquel que permite la mayor producción de LP. El aserrín se descartó por presentar BS y presuntamente acción antibacteriana. La producción y productividad de LP en agrolita y PUF fueron similares, aunque este último es un material que presenta resistencia mecánica y tiene una CRA mucho mayor que el de la agrolita, por lo que, el uso de PUF permitiría obtener mayor cantidad de LP que con la agrolita, ya que se puede adicionar mayor proporción de medio de cultivo. Adicionalmente, facilita el proceso de recuperación y análisis de los productos porque no genera impurezas, se puede recuperar hasta el 95% del medio de cultivo por simple prensado del material y 100% los LP impregnados en el soporte. También, no genera cambios en el pH del medio de cultivo y no inhibe el crecimiento bacteriano. Es por ello, que la PUF se seleccionó como el soporte más adecuado para el bioproceso.

Adicionalmente, diferentes densidades de PUF (17, 20, 24, 27 y 35 Kg/m³) se compararon presentando similares características. Sin embargo, la PUF de 27 Kg/m³ a diferencia de las otras densidades, presentó una velocidad constante de secado baja que no permite que el agua retenida se evapore tan fácilmente y la mayor resistencia a la compresión (mayor resistencia mecánica); importante para las perspectivas en el diseño del bioproceso, de esta manera se asegura que la evaporación y escurrimiento del medio de cultivo sea poco. Como consecuencia, en los siguientes experimentos se utilizará como soporte sólido la PUF 27 Kg/m³.

Se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para las experimentaciones. La cepa se conservó y la FMS se desarrolló utilizando PUF como se describe en la sección 6.1.1 y 7.1.1, respectivamente. A partir del medio de cultivo de la Tabla 4 que presenta un C/N=11.4 se evaluaron diferentes relaciones C/N (5.7, 8.6 y 11.4). Para ello, se modificaron las fuentes y concentraciones de nitrógeno. Las fuentes evaluadas fueron nitrato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de sodio (Tabla 7). También, se comparó el efecto de mantener constante el C/N=11.4 pero variando las concentraciones de glucosa y de nitrógeno (Tabla 8). Además, se evaluaron cinco diferentes C/N pero variando únicamente la concentración de la fuente de carbono, los medios se presentan en la Tabla 9. Para la recuperación y cuantificación de los LP producidos en las FMSs, se utilizó la misma metodología descrita en la sección 7.1.2.

Tabla 7. C/N=11.4 bajo diferentes concentraciones de glucosa y nitrógeno.

Medio (g/L)	120 C-12 N	90 C-9 N	60 C-6 N
Componente	g/L	g/L	g/L
Glucosa	120	90	60
NH₄NO₃	12.03	9.03	6.03
Na ₂ HPO ₄	12.78	12.78	12.78
KH ₂ PO ₄	16.33	16.33	16.33
CaCl ₂ (x10 ³)	3.09	3.09	3.09
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.77	1.77	1.77
Na-EDTA (x10 ³)	3.50	3.50	3.50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.56	0.56	0.56
MnSO ₄ ·H ₂ O (x10 ²)	16.06	16.06	16.06

Tabla 8. Medios de cultivo con diferentes C/N variando la concentración de glucosa.

C/N	5.7	8.5	11.4	14.2	17.1
Componente	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Glucosa	30	45	60	75	90
NH ₄ NO ₃	6.03	6.03	6.03	6.03	6.03
Na ₂ HPO ₄	12.78	12.78	12.78	12.78	12.78
KH ₂ PO ₄	16.33	16.33	16.33	16.33	16.33
CaCl ₂ (x10 ³)	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.77	1.77	1.77	1.77	1.77
Na-EDTA (x10 ³)	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
MnSO ₄ ·H ₂ O (x10 ²)	16.06	16.06	16.06	16.06	16.06

8.1.2 Análisis de espectrometría de masas (UPLC–MS)

El extracto crudo de una FMS con 48 h de cultivo se analizó mediante UPLC-MS de fase reversa (AQUITY UPLC H-Class, Waters). La muestra recién filtrada (10 µL) se inyectó en una columna C18 (AQUITY UPLC BEH C-18, 2,1 × 50 mm, 1,7 µm, Waters) acoplada a un cuadrupolo simple MS (Detector AQUITY SQ, Waters) con interfaz de ionización por electrospray que permitió la detección simultánea de las tres familias de LP. El flujo fue de 0.6 mL/min durante 7 min con un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía ácido fórmico al 0.1% como sigue: la elución se inició con un 30% de acetonitrilo; después de 2.43 min, se llevó el acetonitrilo al 95% y luego se redujo de nuevo al 30% a los 5.1 min hasta el final. Para la ionización de la muestra, la temperatura de la fuente se estableció en 130 °C con una temperatura de desolvatación de 400 °C, un flujo de nitrógeno de 1000 L/h y un voltaje de cono de 120 V (Brück et al., 2019).

8.1.3 pH

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

8.1.4 Glucosa

La determinación de glucosa se llevó a cabo mediante el kit enzimático SPINREACT. Se utilizó el estándar original del kit el cual se diluyó 1:10 quedando a una concentración final de 0.1 g/L. En un tubo de ensayo se adicionaron 100 µl de la muestra a evaluar, luego se agregaron 900 µl del reactivo. Se agitó en vórtex y se incubó a 37 °C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800) a 505 nm. Las muestras se diluían para llevarlas a una concentración de glucosa menor a 5 g/L por sugerencia del kit.

8.1.5 Análisis estadístico

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

8.2 Resultados y discusión

8.2.1 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y C/N en la producción de lipopéptidos

Se evalúan tres fuentes de nitrógeno inorgánicas: nitrato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de sodio, las cuales se seleccionan porque potenciaron la producción de LP cuando se compararon con otras fuentes en estudios previos. Por ejemplo, el nitrato de amonio es la mejor fuente para Fonseca et al. (2007) y Guimarães et al. (2019); cloruro de amonio para Li et al. (2012) y Nair et al. (2020) y nitrato de sodio para Abdel-Mawgoud et al. (2008) y Swastika et al. (2013). Las fuentes de nitrógeno se evaluaron junto con tres relaciones C/N: 5.7, 8.6 y 11.4 (Tabla 7). Se eligieron relaciones por debajo de 11.4 tomando como referencia que la surfactina presenta en su composición C/N= 6.5, Fonseca et al. (2007) reportan que C/N=3 es la condición que permite la mayor producción de LP de las relaciones comparadas (C/N=9 y 15), mientras Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011 la encuentra a C/N=7 y Mejía Farfán, 2008 a C/N=11.6. Las discrepancias en las relaciones C/N que se encuentran en los mencionados estudios pueden relacionarse con las diferentes condiciones nutricionales y ambientales que utilizaron y la genética y el origen de las cepas estudiadas (Sun et al., 2010).

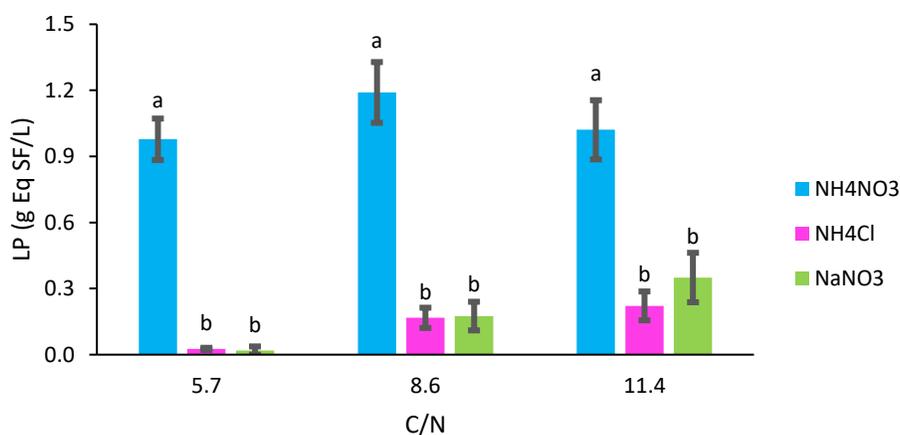


Figura 16. Efecto de la relación C/N y fuente de nitrógeno en la producción de LP. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

En la Figura 17 se muestra el efecto de las fuentes de nitrógeno y las C/N evaluadas en FMS a las 48 h de cultivo. Se observa que nitrato de amonio permite una mayor producción de LP en comparación con las demás fuentes. Por medio de un análisis estadístico se obtiene que la fuente de nitrógeno es significativa ($\alpha=0.05$), y la relación C/N, pero no la interacción entre los factores. Además, el análisis presenta dos grupos homogéneos, C/N 11.4 junto 8.6, y 8.6 con 5.7, siendo el primer grupo el más favorable para el bioproceso. En consecuencia, las mejores condiciones para la producción de LP es el uso de nitrato de amonio y C/N=11.4 y se utilizan para las próximas

experimentaciones. Nitrato de amonio también se ha elegido como la más favorable entre otras fuentes de nitrógeno en FMS para producción de LP (Das & Mukherjee, 2007). Davis et al. (1999) reportan que, al utilizar nitrato de amonio, los iones amonio favorecen el crecimiento del *Bacillus*, mientras que el ion nitrato se consume durante la producción del BS por la bacteria y parece que participa en la activación del metabolismo secundario.

Por otro lado, se quiere ver el efecto de la concentración de los componentes carbono y nitrógeno en el medio mineral sobre la producción de los LP. Por ende, se evalúan diferentes concentraciones de glucosa y nitrato de amonio, manteniendo relación C/N=11.4 constante (Tabla 8).

8.2.2 Efecto de las diferentes concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno a una relación C/N constante.

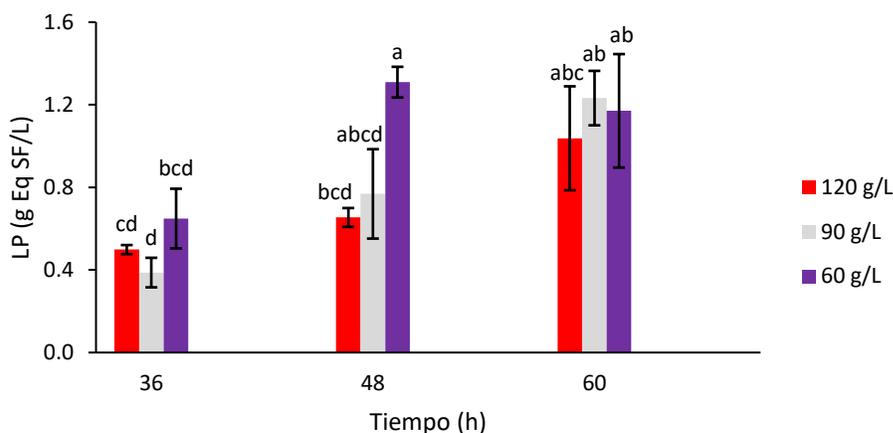


Figura 17. C/N=11.4 bajo diferentes concentraciones de glucosa y nitrato de amonio. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

Se elige evaluar tres concentraciones de glucosa-nitrato de amonio por debajo del medio inicial (120-12 (Tabla 4), 90-9 y 60-6 g/L) para evitar generar efectos negativos en el desarrollo del bioproceso debido a las altas concentraciones que se usarían, manteniendo C/N=11.4 y tomando muestras a los 36, 48 y 60 h. En la Figura 18 se ve la tendencia de a menor concentración de glucosa-nitrato de amonio, mayor producción de LP, es posible que las altas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno estén generando inhibición por sustrato. La concentración de glucosa-nitrato de amonio y el tiempo de cultivo son factores significativos ($\alpha=0.05$) pero no la interacción entre ellos. La condición que permite la más alta producción es a las 48 h con 60 g/L de glucosa y 6 g/L de nitrato de amonio. Fonseca et al. (2007) hallan que la

concentración 4 g/L de nitrato de amonio es aquella que más favorece la producción de los LP por *Bacillus subtilis* YRE207, siendo una concentración cercana a la que se obtiene con la mejor condición. Así que una vez seleccionada la relación de concentraciones glucosa-nitrato de amonio se evalúan diferentes C/N por encima y por debajo de 11.4 a las 48 h de cultivo.

8.2.3 Efecto de diferentes C/N manteniendo la concentración de la fuente de nitrógeno constante

En la comparación de las C/N se toma como referencia la relación 11.4 que contiene 60 g/L de glucosa y 6 g/L de nitrato de amonio y de ahí se evalúan dos C/N por encima y por debajo de ella, respectivamente, manteniendo la concentración de la fuente de nitrógeno constante (Tabla 9). En la Figura 19, se presenta que al incrementar el C/N, mayor es la producción del LP. Este resultado es similar al que se encuentra en la sección 8.2.1. Sin embargo, difiere de la tendencia que obtienen Fonseca et al. (2007). Ghribi & Ellouze-Chaabouni, 2011 hallan con *B. subtilis* SPB1 que a medida que el C/N aumenta, la producción de LP de igual forma, hasta alcanzar C/N=7, posteriormente la biosíntesis del producto disminuye. Nair et al. (2020) presentan similarmente este comportamiento, pero el cambio se da en C/N=20 con *B. velezensis* ASN1. A partir de estos reportes y el resultado que se obtiene, se infiere que el factor limitante clave entre el nitrógeno y el carbono, es este último debido a que se requiere de más carbono que de nitrógeno para generar un incremento en la producción de LP.

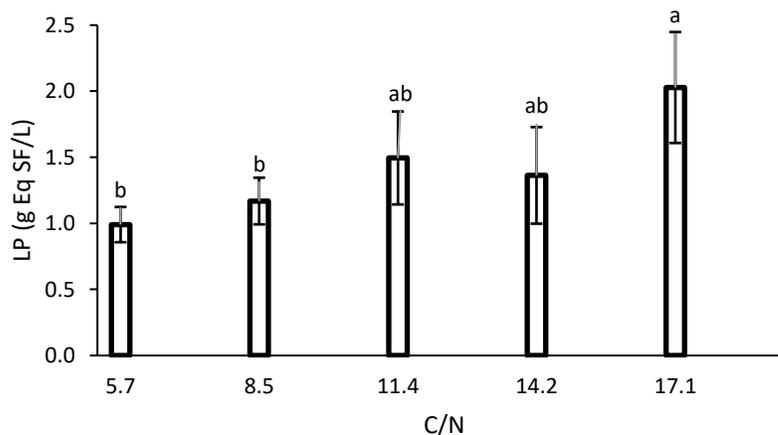


Figura 18. Efecto del C/N en la producción de lipopéptidos con 48 h de cultivo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$, prueba Tukey).

El C/N= 17.1 es el que lidera la mayor producción de LP y es la misma relación que Ghazala et al., 2017 encuentra dentro de la comparación de C/N entre 8-122 utilizando *B.*

mojavensis I4, fuente de carbono glucosa y de nitrógeno ácido glutámico. Sin embargo, Guimarães et al., 2019 mencionan que el cambio de C/N no influye en la producción del LP

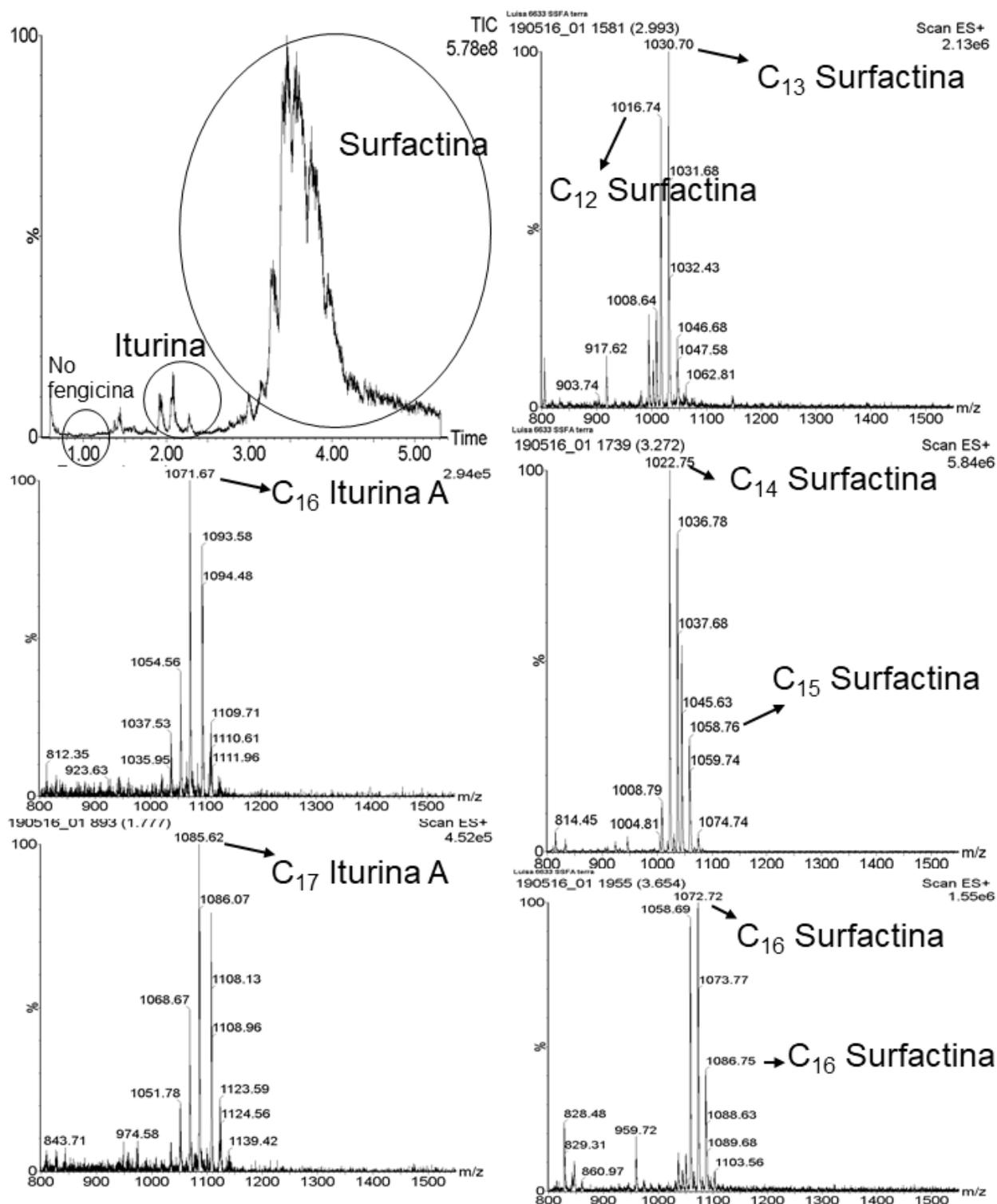


Figura 19. Espectros de masas de los lipopéptidos producidos en FMS.

surfactina. A mi conocimiento, al día de hoy no hay reportes de evaluación del efecto C/N en FMS sobre la producción de LP por *Bacillus* spp. Así, este sería el primer estudio reportado, aunque en el sistema evaluado en este trabajo, sería importante encontrar en qué C/N se observa el punto de flexión entre el incremento y decremento de la producción del producto. Este ensayo no se pudo llevar a cabo debido a la contingencia mundial por el SARS-CoV-2.

8.2.4 Identificación de los lipopéptidos producidos

En la Figura 20 se describe en los espectros de masas los compuestos homólogos que se obtienen de la FMS con el medio de la Tabla 4 por *B. subtilis* ATCC 6633. Se observa producción de surfactina e iturina pero no de fengicina, lo cual es característico de esta cepa (Fickers et al., 2008). Además, producción de surfactina desde 12 a 17 átomos de carbono en su cadena del ácido graso y de iturina con 16 y 17 átomos de carbono en su ácido graso.

8.3 Conclusiones particulares

Aprovechando las ventajas que ofrece utilizar un medio definido adsorbido en un soporte inerte como la espuma de poliuretano, se logró comparar diferentes relaciones C/N y diferentes fuentes de nitrógeno. La fuente de nitrógeno que benefició en mayor medida la producción de LP es el nitrato de amonio en comparación con cloruro de amonio y nitrato de sodio. Se encontró que, al disminuir las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno a la mitad, manteniendo la misma relación C/N=11.4, se incrementa la concentración de los LP; este comportamiento es quizás porque se generó inhibición por sustrato debido a las altas concentraciones de la glucosa y el nitrato de amonio. En adición, se encontró que cuando aumentaba la relación C/N, se obtenía mayor producción de LP, siendo C/N=17.1 aquella que permitió la mayor concentración del producto. Así que el carbono puede ser el nutriente limitante clave en el bioproceso. Finalmente, a partir del análisis por UPLC-MS se identificó que *B. subtilis* ATCC 6633 coproducía surfactina e iturina.

ETAPA II

9. Comparación de cepas *Bacillus* en fermentación sólida y sumergida

La FMS se presenta como una alternativa para resolver las dificultades que presenta la FML en la producción de LP ya que mejora la transferencia de oxígeno, evita la formación de espuma e imita el hábitat natural para el crecimiento de bacterias formadoras de biopelícula (Lima-Pérez et al., 2019). Generalmente, las cepas de tipo silvestre desarrollan biopelículas que promueven positivamente la producción de LP, pero la mutante *B. subtilis* BBG111 no puede producir biopelículas (Brück et al., 2019). Por tanto, el estudio de cepas de tipo salvaje y la mutante BBG11 sobre la producción de LP en FMS y FML es muy significativo. Pocos estudios han comparado en ambos tipos de cultivo el nivel de producción y el perfil de compuestos homólogos de LP generados, la captación de glucosa, el crecimiento de la biomasa y la producción de metabolitos primarios utilizando diferentes cepas bajo las mismas condiciones nutricionales con el fin de evidenciar y comprender las diferencias en el bioproceso. Por ello, se evalúan cuatro cepas de tipo silvestre y la mutante BBG11 (incapaz de desarrollar biopelícula) en FMS y FML utilizando un medio definido y soporte inerte.

9.1 Materiales y métodos

9.1.1 Microorganismos

Cepas *B. subtilis* ATCC 21332 (Chtioui et al., 2012), *B. velezensis* FZB42 (Borriss et al., 2011), *Bacillus velezensis* GA1 (Zune et al., 2014) y *Bacillus velezensis* S499 (Jacques et al., 1999) son organismos residentes del suelo que protegen a las plantas (Fan et al., 2018; Nagórska et al., 2007), mientras que *B. subtilis* BBG111 es un derivado de *B. subtilis* 168 (*trpC2*, *sfp*⁺, *epsC*⁰) con baja producción de exopolisacáridos (Coutte et al., 2010). Tanto *B. subtilis* ATCC 21332 como BBG111 coproducen surfactina y fengicina, mientras que *B. velezensis* FZB42, GA1 y S499 producen surfactina, fengicina e iturina (Yaseen et al., 2016; Zune et al., 2014). Las cepas se transfirieron de placas de agar Luria-Bertani al medio Luria-Bertani (Motta Dos Santos et al., 2016) y se cultivaron durante la noche a 30 °C y 200 rpm; luego, se utilizaron como inóculos para FMS y FML.

9.1.2 Fermentación sólida y líquida

Se utilizaron unidades cilíndricas de espuma de poliuretano (PUFcu) (4 cm de diámetro y 1 cm de altura, aproximadamente 0.4 g de peso seco) con una densidad de 27 kg/m³ como soporte inerte para FMS. Las PUFcu se lavaron con agua caliente y agua destilada y posteriormente se secaron a 100 °C hasta peso constante. Luego, fueron individualmente colocadas en matraces de 50 mL y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min. El medio de cultivo utilizado es el de la Tabla 4. El pH de cada componente del medio se ajustó a 7.0 con NaOH (10% p/v) y se esterilizó por separado. Las cepas se cultivaron durante la noche en medio líquido Luria-Bertani a 30 °C y 200 rpm. Luego, se usó 1 mL de una suspensión bacteriana con una DO_{600nm} alrededor de 2 para inocular 9 mL de medio de cultivo para FML y FMS. El medio inoculado se transfirió a los matraces sin (FML) y con (FMS) PUFcu. Además, los matraces se incubaron a 30 °C en condiciones estáticas (FMS) y 200 rpm (FML). Las fermentaciones se realizaron durante 72 h. Las unidades experimentales se retiraron por triplicado a las 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Los ensayos tuvieron dos réplicas experimentales.

9.1.3 Determinación de biomasa

Para la FML, se centrifugó (Universal 320 / 320R, Hettich) todo el medio de cultivo del matraz a 5000 rpm durante 20 min. El pellet se lavó dos veces con agua destilada y se secó hasta peso constante a 100 °C. Para FMS, PUFcu se lavaron dos veces con 10 mL de agua destilada. Se obtuvo una suspensión celular de cada PUFcu (suspensión A), y las PUFcu se colocaron individualmente en una jeringa de 60 mL y se comprimieron (suspensión B). Las suspensiones de células A y B se mezclaron y centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min y se conservaron los sobrenadantes. Los pellets se lavaron dos veces con agua destilada, se secaron hasta peso constante a 100 °C y se pesaron. Los PUFcu se secaron hasta peso constante a 100 °C para cuantificar la biomasa retenida en ellos. El contenido de biomasa en el PUFcu se estimó gravimétricamente. La biomasa bacteriana se expresó como g/L del medio de cultivo. Los sobrenadantes de FML y FMS se filtraron con filtros de PTFE (0.22 µm, Rocc) y se utilizaron para determinar LP, glucosa y metabolitos extracelulares.

9.1.4 Cuantificación de surfactina, fengicina e iturina

Los sobrenadantes libres de células se analizaron mediante HPLC de fase inversa (Agilent 1100 Series HPLC Value system, Agilent Technologies) a 214 nm. Cada muestra recién filtrada (10 µl) se cargó en una columna C18 a 30 °C (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2,1 x 150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies) y se eluyó con un caudal constante de 0.4 mL/min durante 60 min con acetonitrilo (acidificado con ácido trifluoroacético al 0.1%) y agua de grado HPLC (acidificada

con ácido trifluoroacético al 0.1%). La elución se inició con un 40% de acetonitrilo; después de 45 min, se llevó el acetonitrilo al 95% y luego se redujo de nuevo al 45% a los 54 min hasta el final. Surfactina (2 g/L), fengicina (2 g/L) e iturina (1 g/L) se utilizaron como estándares con una pureza superior al 98% (Lipofabrik, Villeneuve d'Ascq, Francia).

9.1.5 Análisis de las estructuras de los lipopéptidos

Los compuestos homólogos de cada familia de LP se analizaron por UPLC-MS como se describe en la sección 8.1.2.

9.1.6 Análisis de glucosa y los metabolitos primarios derivados del piruvato.

La glucosa y los metabolitos extracelulares se analizaron mediante HPLC (Agilent 1200 series HPLC system, Agilent Technologies), utilizando un detector de índice de refracción. Cada muestra recién filtrada (10 μ L) se inyectó en una columna de intercambio iónico a 65 °C (Aminex HPX-87H, 300 \times 7.8 mm, 9 μ m, Laboratorios Bio-Rad N.V) y se eluyó con un caudal constante de 0.5 mL/min durante 30 min de un gradiente isocrático 5 mN H₂SO₄. Se utilizaron como estándares glucosa, acetoína, lactato, acetato y 2,3-butanodiol (>pureza 95%, Sigma-Aldrich, Overijse, Bélgica).

9.1.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante pruebas post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron con IBM-SPSS 18.

9.2 Resultados y discusión

*9.2.1 Producción de lipopéptidos por *Bacillus subtilis* ATCC 6633. en fermentación sólida y líquida*

La cepa *B. subtilis* ATCC 6633 se evalúa en FMS y FML y se encuentra que produce 0.01 ± 0.02 y 0.24 ± 0.02 g/L de surfactina en FML y FMS, correspondientemente y 0.04 ± 0.01 y 0.74 ± 0.07 g/L de iturina en FML y FMS, respectivamente, a las 72 horas de cultivo. Así que, la producción total de LP alcanzados en FMS es 0.98 g/L, el cual es un valor similar al que se obtiene bajo las mismas condiciones en la sección 8.2; verificando que el método de análisis AE utilizado en la Etapa I es válido. Por otro lado, las concentraciones de surfactina e iturina alcanzadas en FMS están aproximadamente 21 veces por encima de las alcanzadas en FML. Aun así, la producción de surfactina en FMS está por debajo de otros reportes en FML por la misma bacteria (Jokari et al., 2012, 2013), mientras que la síntesis de la iturina está 14 veces

más alta que la obtenida por Guez et al. (2008) usando la misma cepa. A mi conocimiento, no hay estudios en los que se utilice ATCC 6633 para producción de LP en FMS excepto en mi trabajo de maestría (Valdés-Velasco, 2016). Sin embargo, los valores alcanzados tanto en FMS y FML por esta cepa no son competitivos en comparación con los generados por otras *Bacillus*. Es por ello que se descarta el uso de ATCC 6633 para las próximas experimentaciones y se usan otras *Bacillus* con mayor potencial de producción de LP.

9.2.2 Producción de lipopéptidos por *Bacillus* spp. en fermentación sólida y líquida

La producción de LP de estas cepas de *Bacillus* bajo SSF y SmF muestran diferentes perfiles (Figura 21). La producción de surfactina y fengicina por las cepas ATCC 21332 y GA1 en FMS es significativamente mayor que en FML (Figura 21A y 21B). La producción de iturina por GA1 fue dos veces mayor en FMS que en FML (Figura 21C). Sin embargo, la producción de surfactina y fengicina por las cepas BBG 111, S499 y FZB42 es similar en ambos tipos de cultivos. La producción de iturina por la cepa S499 es mayor en FML que en FMS. Así, el tipo de cultivo influye en la producción de LP, dependiendo de las cepas. Estudios anteriores apoyan esta afirmación. Por ejemplo, Zhu et al. (2013) reportan una producción de lipopéptidos casi dos veces mayor en FML versus FMS usando *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 y harina de soja como sustrato. En contraste, Das & Mukherjee, 2007 no encuentran diferencias en la producción de lipopéptidos por cepas de *Bacillus subtilis* (DM-03 y DM-04) bajo FMS y FML usando cáscaras de papa como fuente de carbono.

La producción de LP por las cepas GA1 y ATCC 21332 en FMS es mayor que los estudios obtenidos en FML por Chtioui et al. (2012); Toure et al. (2004) y Zune et al. (2014). Por el contrario, la producción de LP de FZB42, S499 y BBG111 tanto en FMS como en FML es menor que los reportes por Al-Ali et al. (2018); Dhali et al. (2017) y Jacques et al. (1999). Las diferencias obtenidas en este estudio y dichos reportes pueden asociarse con el uso de diferentes condiciones nutricionales y ambientales y la genética y origen de las cepas (Sun et al., 2010). En particular, hasta donde sabemos, las cepas seleccionadas para este estudio no se han cultivado antes en condiciones FMS.

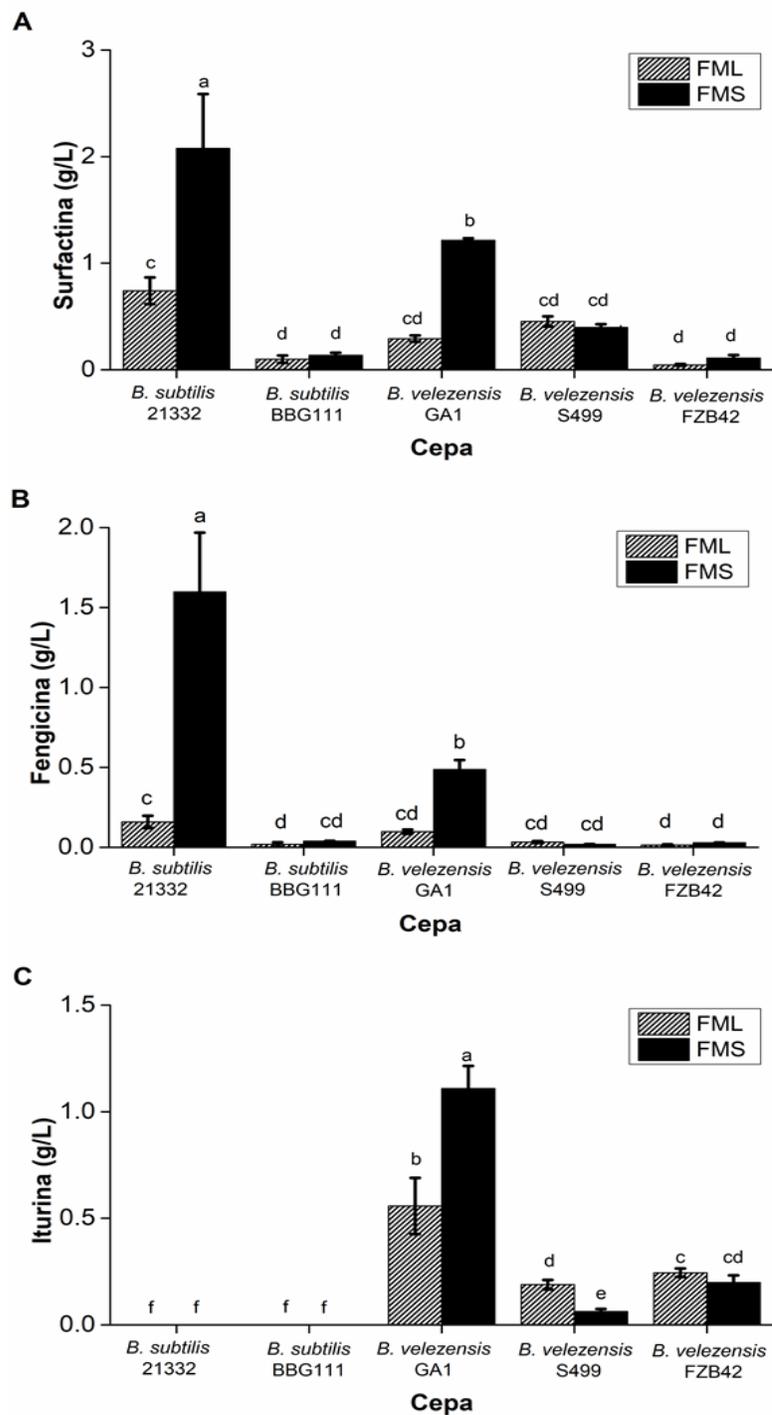


Figura 20. Producción de (A) surfactina, (B) fengicina e (C) iturina por varias cepas de *Bacillus* bajo FMS y FML. Las muestras se tomaron después de 72 h de cultivo. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

Las cepas evaluadas producen varios compuestos homólogos de LP, con diferentes patrones en ambos tipos de cultivos (Tabla 10). Las cepas ATCC 21332, BBG 111 y S499

presentan patrones similares en la producción de compuestos homólogos de surfactina en ambos tipos de cultivo. Por el contrario, se obtienen cadenas de ácidos grasos más largas en condiciones de FMS para FZB42 y GA1. La diversidad de compuestos homólogos de surfactina es mayor en *B. subtilis* que en *B. velezensis*. Esta diferencia se debe al mayor número de compuestos homólogos que produce *B. subtilis* bajo FML (6) y FMS (6) en comparación con los que se generan por *B. velezensis* en FML (4) y FMS (5).

Tabla 9. Asignación de los compuestos homólogos de familias de lipopéptidos producidos por varias cepas de *Bacillus* en FMS y FML.

Asignación	Cepa									
	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332		<i>B. subtilis</i> BBG111		<i>B. velezensis</i> FZB42		<i>B. velezensis</i> GA1		<i>B. velezensis</i> S499	
	FML	FMS	FML	FMS	FML	FMS	FML	FMS	FML	FMS
<i>Surfactina</i>										
C ₁₂	x	x	x	x			x	x	x	x
C ₁₃	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C ₁₄	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C ₁₅	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C ₁₆	x	x	x	x		x		x	x	x
C ₁₇	x	x	x	x						
<i>Fengicina</i>										
C ₁₅ fengicina A	x				x	x	x		x	x
C ₁₆ fengicina A/ C ₁₄ fengicina B	x	x			x	x	x	x	x	x
C ₁₇ fengicina A/ C ₁₅ fengicina B	x	x		x	x	x	x	x	x	x
C ₁₈ fengicina A/ C ₁₆ fengicina B	x	x	x	x	x		x	x	x	x
C ₁₉ fengicina A/ C ₁₇ fengicina B	x	x	x	x				x		
<i>Iturina</i>										
C ₁₄ Iturina A							x	x	x	x
C ₁₅ Iturina A							x	x	x	x
C ₁₆ Iturina A							x	x	x	x
C ₁₄ Bacilomicina D					x	x				
C ₁₅ Bacilomicina D					x	x				
C ₁₆ Bacilomicina F					x	x				

El símbolo (x) indica la producción del lipopéptido por la cepa en FMS y FML.

Todas las cepas evaluadas (excepto la cepa S499) presentan diferencias en los patrones de producción de compuestos homólogos de fengicina en FMS y FML. La surfactina y fengicina de bajo peso molecular fueron los homólogos predominantes producidos por las cepas de

Bacillus, independientemente del tipo de cultivo. Akpa et al. (2001) describen una tendencia similar para la producción de compuestos homólogos de surfactina de bajo peso molecular. En cuanto a la familia de la iturina, el tipo de compuestos homólogos fue similar en ambos tipos de cultivos para todas las cepas. Akpa et al. (2001) mencionan que las influencias de diferentes medios de cultivo sobre la biosíntesis de los compuestos homólogos de iturina son menos significativas que las observadas para los compuestos homólogos de surfactina. Estas diferencias se deben a la menor sensibilidad del complejo enzimático involucrado en la biosíntesis de surfactina hacia las cadenas de ácidos grasos intracelulares que los de la biosíntesis de iturina. El número de compuestos homólogos diversos por cepa y tipo de cultivo varía de 8 (*B. subtilis* BBG 111 en FML) a 12 (cepas de *B. velezensis* GA1 en FMS y S499 en FML y FMS). La superposición de la masa molecular entre los compuestos homólogos de fengicina A y B dificulta la identificación de su estructura (datos no mostrados).

Estudios anteriores han informado diferencias en la producción de compuestos homólogos de lipopéptidos en función de la cepa y la composición del medio (Akpa et al., 2001) y una polaridad y composición similar de los lipopéptidos producidos por FMS y FML (Das y Mukherjee, 2007; Zhu et al., 2013). Sin embargo, se proporciona evidencia de las diferencias en el tipo y número de compuestos homólogos de lipopéptidos producidos por ambos tipos de cultivo. Las diferencias que se observan en la producción de LP podrían estar relacionadas con diferencias en los procesos de regulación en ambos tipos de cultivos, asociadas con cambios en algunos eventos de detección de quórum, sincronización celular y el estado fisiológico de las células (Chen et al., 2020; Lima-Pérez et al., 2019; Zhu et al., 2013). Por lo tanto, los diferentes tipos y concentraciones de los lipopéptidos muestran el papel crítico de las diferencias fisiológicas entre los dos tipos de cultivo (Lima-Pérez et al., 2019). Estudios cinéticos de crecimiento de biomasa, absorción de glucosa y producción de LP y metabolitos primarios se llevan a cabo por las cepas ATCC 21332, GA1 y BBG 111 para comprender mejor sus metabolismos en condiciones de FMS y FML.

9.2.3 Cinéticas de producción de lipopéptidos, crecimiento de biomasa y consumo de carbono en fermentación sólida y líquida

Se realizan estudios cinéticos con las cepas ATCC 21332, GA1 y BBG111. Las dos primeras cepas se seleccionan por su mayor producción de LP tanto en FMS como en FML, y la cepa BBG 111 se elige por su incapacidad para producir biopelículas, cuyo desarrollo está relacionado con la síntesis de LP (Brück et al., 2019). Estas cepas han sido evaluadas por su

capacidad para producir LP y como agentes de biocontrol (Arguelles-Arias et al., 2009; Chtioui et al., 2012; Coutte et al., 2010).

La mayor producción de surfactina se obtiene por las cepas ATCC 21332 y GA1 en FMS (0.4 a 0.5 g/L) después de 48 h de cultivo. Esta es dos veces mayor que la producida en FML, mientras que la biosíntesis de surfactina por la cepa BBG 111 es 1.4 veces mayor en FMS que en FML (Figura 22A). La producción de fengicina por las cepas ATCC 21332 y GA1 también es mayor en FMS que en FML (Figura 22B), y su producción por la cepa BBG 111 es insignificante en ambos tipos de cultivo (> 0.05 g/L). Además, la mayor producción de fengicina (2.7 g/L \pm 0.7 g/L) con la cepa 21332 a las 72 h de cultivo, es aproximadamente 4 veces mayor que la reportada para FML (Chtioui et al., 2012; Fahim et al., 2012).

Hasta donde sé, este es el primer estudio que informa sobre la producción cuantitativa de fengicina por FMS. Wang et al. (2008) reportan la presencia de fengicina en FMS por *Bacillus subtilis* usando soya y camote; sin embargo, no se indica la concentración de fengicina. La producción de iturina por GA1 es cuatro veces mayor en FMS que en FML (Figura 22C), aumentando hasta el final del cultivo en ambos cultivos. La concentración máxima de iturina (1.2 g/L \pm 0.2 g/L) en FMS es mayor que la reportada en FML (Sun et al., 2019; Yue et al., 2021). La producción máxima de LP es 3.5 veces mayor en FMS que en FML por las cepas 21332 y GA1, y 1.5 veces mayor en FMS y menor a 0.2 g/L por la cepa BBG 111 (Figura 22D).

La producción de biomasa por las cepas ATCC 21322 y GA1 es significativamente mayor en FMS (24-25 g/L) que en FML (8-10 g/L) (Figura 22E). El crecimiento de la cepa BBG 111 es bajo y 1.5 veces mayor en FMS que en FML. Estos resultados difieren de los dados por Das y Mukherjee. (2007), quienes encuentran similar producción de biomasa en ambos tipos de cultivos por *B. subtilis* DM-03 y *B. subtilis* DM-04. Por el contrario, Zhu et al. (2013) hallan una mayor producción de biomasa en FML que en FMS por *B. amyloliquefaciens* XZ-173. Estas diferencias pueden ser inherentes a las cepas de *Bacillus* evaluadas y/o diferencias en la composición del medio de cultivo. El consumo de glucosa de las cepas ATCC 21322 y GA1 es mayor en FMS (89-86%) que en FML (53-87%) (Figura 22F). La cepa BBG 111 muestra un bajo consumo de glucosa en FMS (20%) y FML (9%), lo que sugiere una inhibición por sustrato debido a la alta concentración de glucosa. Por otro lado, se encuentra que la fuente de carbono es el sustrato limitante del crecimiento microbiano (Anexo F).

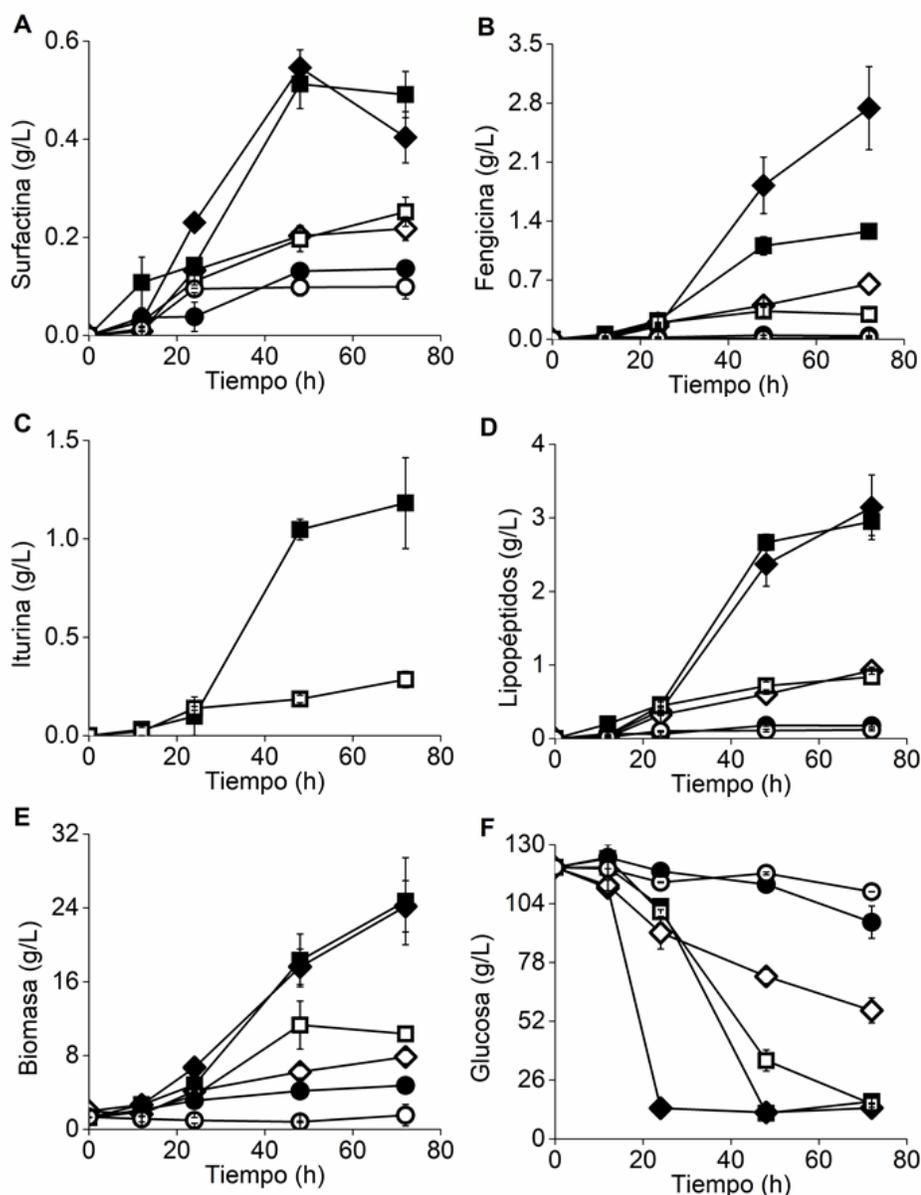


Figura 21. Perfiles de producción de A) surfactina, B) fengicina, C) iturina, D) metabolitos primarios, E) biomasa y F) glucosa por *B. subtilis* ATCC 21332 (rombos), *B. velezensis* GA1 (cuadrados) y *B. subtilis* BBG 111 (círculos) en FMS (símbolos negros) y FML (símbolos blancos).

La cepa BBG 111 exhibe la producción más baja de LP y biomasa, así como el agotamiento de la glucosa; su incapacidad para producir biopelículas probablemente esté relacionada con la baja producción de LP (Brück et al., 2019). La alta producción de fengicina y surfactina se ha atribuido al desarrollo de biopelículas por ATCC 21332 y GA1, respectivamente (Chtioui et al., 2012; Zune et al., 2014). La formación de biopelículas en FMS ha sido reportada

por cepas *Bacillus* (Ano et al., 2009). Por lo tanto, la mejora de la producción de LP en FMS en comparación con FML también podría estar asociada al desarrollo de biopelículas, además de la alta producción de biomasa y consumo de glucosa.

9.2.4 Producción de metabolitos primarios

Se desarrollan estudios cinéticos para establecer la relación entre los LP y la producción de metabolitos primarios bajo FMS y FML, evaluando los niveles de producción de acetato, acetoína, butanodiol y lactato. La producción de acetoína es significativamente mayor en relación con los metabolitos primarios evaluados (Figura 23). La alta producción de acetoína está relacionada con la alta concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo (Tian et al., 2016; Zhang et al., 2013) y es similar a la reportada en otros estudios (41-51 g/L; Tian et al., 2016; Zhang et al., 2013). El compuesto 2,3-butanodiol sólo es producido por las cepas ATCC 21332 y BBG111 en FML. La producción de metabolitos primarios (la suma de las concentraciones de acetato, acetoína, butanodiol y lactato) por las cepas ATCC 21332 y GA1 es 1.2 y 1.5 veces mayor en FML que en FMS, mientras que es similar en ambos tipos de cultivos para la cepa BBG111. Este comportamiento podría estar relacionado con la regulación intrínseca de las vías metabólicas entre las cepas silvestres y la mutante. Por lo tanto, se requiere más investigación sobre este hecho.

La producción de LP en función de la glucosa consumida presenta dos patrones generales, uno para las cepas ATCC 21332 y GA1 y otro para la cepa BBG 111. Para las dos primeras cepas, en FMS, los valores de $Y_{P/G}$ para la producción de lipopéptidos son más altos y los valores de $Y_{P/G}$ para la producción de metabolitos primarios son más bajos que los obtenidos en FML (Tabla 11). Además, la relación de producción de LP sobre los metabolitos primarios es 5 veces mayor para las cepas ATCC 21332 y GA1 en FMS que en FML. La baja producción de biomasa en FML favorece la producción de metabolitos y disminuye la de los lipopéptidos. Así, la producción de LP en FMS es favorecida por la mayor producción de biomasa en este sistema. El aumento en la producción de biomasa y el rendimiento biomasa-glucosa en FMS se debe a la mejor transferencia de masa y menor inhibición por sustrato para este sistema (Viniegra-González et al., 2003). Los rendimientos de surfactina y biomasa son menores a los reportados bajo FML (Chtioui et al., 2012; Motta Dos Santos et al., 2016); sin embargo, el rendimiento de surfactina es mayor que el reportado en FMS (≈ 12 mg/g) con un medio de cultivo complejo (Zhu et al., 2013). Los rendimientos de fengicina-biomasa son menores a los reportados por Chtioui et al. (2012); aunque, el rendimiento de iturina-biomasa con la cepa GA1 es mayor que el reportado por Zhu et al. (2013) bajo FMS.

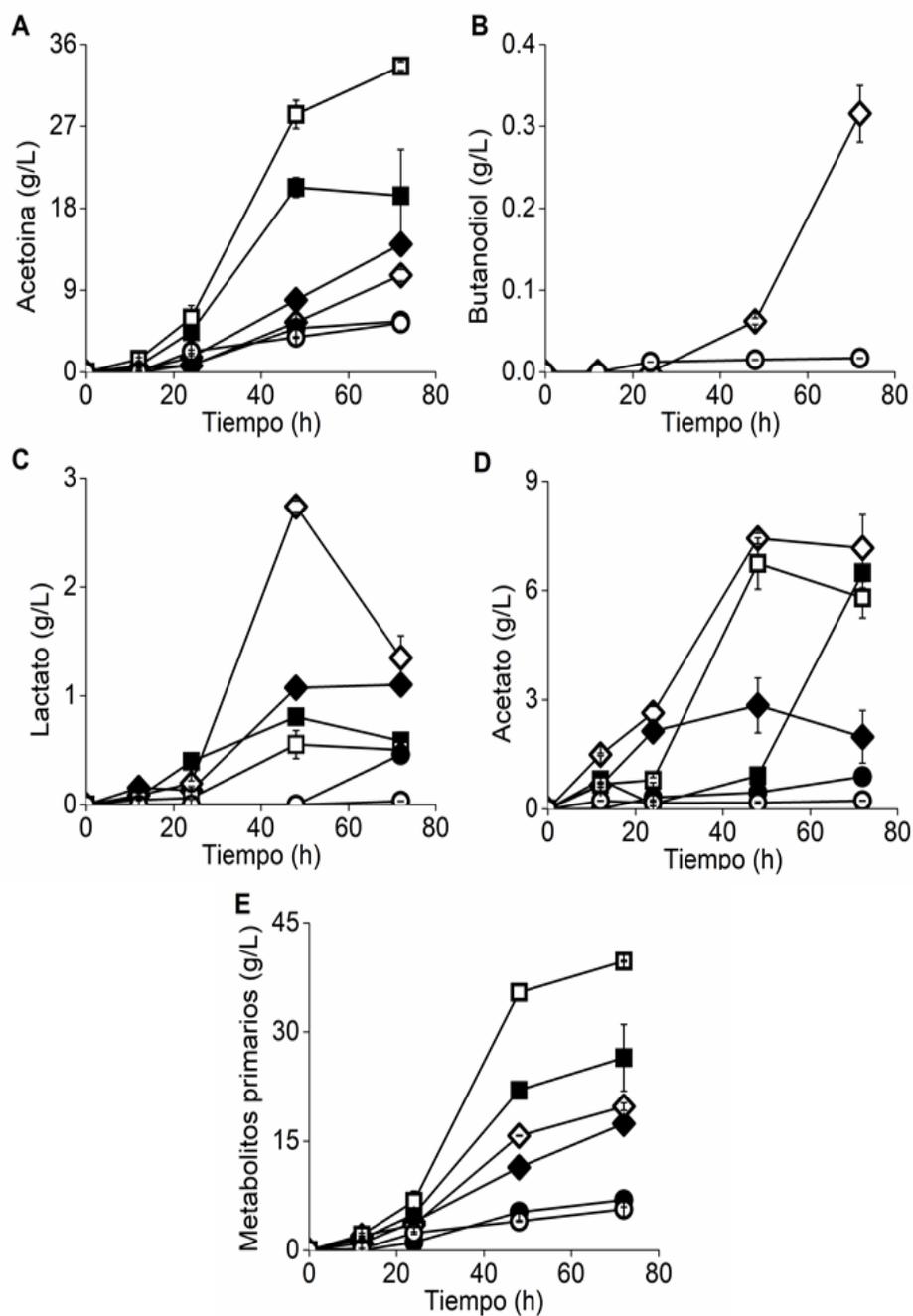


Figura 22. Perfiles de producción de A) acetoína, B) 2,3 -butanodiol, C) lactato, D) acetato, y E) metabolitos primarios por *B. subtilis* ATCC 21332 (rombos), *B. velezensis* GA1 (cuadrados) y *B. subtilis* BBG 111 (círculos) en FMS (símbolos negros) y FML (símbolos blancos).

Tabla 10. Rendimientos máximos de crecimiento y producción de lipopéptidos y metabolitos primarios por *B. subtilis* ATCC 21332, *B. velezensis* GA1 y *B. subtilis* BBG 111 en FMS y FML.

Rendimientos		<i>B. subtilis</i> ATCC 21332		<i>B. velezensis</i> GA1		<i>B. subtilis</i> BBG 111	
		FMS	FML	FMS	FML	FMS	FML
Rendimientos de biomasa y producto sobre glucosa							
Biomasa	$Y_{X/G}$ (g/g)	0.21	0.09	0.23	0.09	0.09	0.17
Surfactina	$Y_{P/G}$ (mg/g)	5	3	5	2	4	9
Fengicina	$Y_{P/G}$ (mg/g)	26	10	12	4	6	2
Iturina	$Y_{P/G}$ (mg/g)	-	-	11	3	-	-
Lactato	$Y_{P/G}$ (mg/g)	10	57	7	7	12	3
Acetato	$Y_{P/G}$ (mg/g)	26	154	63	79	23	21
Acetoína	$Y_{P/G}$ (mg/g)	132	168	187	321	142	501
Butanediol	$Y_{P/G}$ (mg/g)	-	5	-	-	-	2
Rendimientos producto sobre biomasa							
Surfactina	$Y_{P/X}$ (mg/g)	35	37	30	28	40	54
Fengicina	$Y_{P/X}$ (mg/g)	123	111	54	33	17	10
Iturina	$Y_{P/X}$ (mg/g)	-	-	50	31	-	-
Lactato	$Y_{P/X}$ (mg/g)	50	645	47	55	135	18
Acetato	$Y_{P/X}$ (mg/g)	182	1747	277	671	261	125
Acetoína	$Y_{P/X}$ (mg/g)	632	1809	1190	3700	1633	2958
Butanediol	$Y_{P/X}$ (mg/g)	-	54	-	-	-	9

Los rendimientos se calculan para la máxima concentración de productos, las fórmulas son $Y_{P/G} = (P_{max} - P_0) / (G_0 - G_{tmax})$, donde P_{max} es la concentración máxima del producto, P_0 es la concentración inicial del producto, G_0 es la concentración inicial de glucosa, G_{tmax} concentración de glucosa cuando es la concentración del producto máxima, y $Y_{P/X} = (P_{max} - P_0) / (X_{tmax} - X_0)$, donde X_{tmax} es la concentración de biomasa cuando la concentración del producto es máxima y X_0 es concentración de biomasa inicial.

9.2.5 Balance de carbono

El balance de masa de carbono se expresa en C-mol (Villadsen et al., 2011). El flujo de carbono de ATCC 21332 y GA1 se dirige principalmente a la producción de dióxido de carbono y biomasa en FMS y dióxido de carbono y acetoína en FML. A su vez, BBG111 canaliza el carbono en dióxido de carbono y acetoína en FMS y en acetoína y biomasa en FML (Tabla 12). El flujo de carbono que se dirige a la síntesis de lipopéptidos es mayor en FMS que en FML. FMS mejora la transferencia de oxígeno en comparación con FML (Viniestra-González et al., 2003). Esta situación permite alcanzar un mayor crecimiento de biomasa que puede conducir a una producción superior de LP porque estos se describen como productos asociados al crecimiento (Kan et al., 2017), mientras que FML canaliza el carbono en metabolitos primarios (suma de acetoína, lactato, butanediol y acetato). Este efecto podría deberse a que los metabolitos primarios se producen principalmente bajo limitación de oxígeno (Härtig & Jahn, 2012). De hecho, hay una relación inversa entre el flujo de carbono de los LP y los metabolitos primarios de las

cepas evaluadas (Anexo G). Este resultado puede explicarse porque la biosíntesis de LP está relacionada con la vía de la glucólisis y los ácidos grasos. Por lo tanto, si la glucólisis se desvía hacia la producción de lactato, acetato o acetoína, su flujo no suministrará piruvato que proporciona los precursores para producir α -cetoácidos ramificados y acetyl-CoA que son claves para la biosíntesis de ácidos grasos (Wu et al., 2019). La regulación entre los metabolitos primarios y la producción de LP se ha discutido sólo de manera superficial en FML, y no hay informes para FMS. Este estudio presenta algunas evidencias de las diferencias en los mecanismos de regulación de los metabolitos primarios y la producción de LP en condiciones de FMS y FML por diferentes cepas.

Tabla 11. Balance de carbono del crecimiento y producción de metabolitos por *B. subtilis* ATCC 21332, *B. velezensis* GA1 y *B. subtilis* BBG 111 en FMS y FML.

Formula empírica	PM ^a (g/C-mol)	Rendimiento C-mol ^b					
		<i>B. subtilis</i> ATCC 21332		<i>B. velezensis</i> GA1		<i>B. subtilis</i> BBG 111	
		FMS	FML	FMS	FML	FMS	FML
Glucosa (CH ₂ O)	30	-	-	-	-	-	-
Biomasa (CH _{1.6} N _{0.22} O _{0.41}) ^c	23.24	0.27	0.12	0.29	0.07	0.18	0.22
Lactato (CH ₂ O)	30	0.01	0.02	0.01	0.10	0.02	0.003
Acetato (CH ₂ O)	30	0.01	0.11	0.06	0.11	0.04	0.02
Acetoína (CH ₂ O _{0.5})	22	0.18	0.23	0.26	0.52	0.31	0.68
Butanodiol (CH _{2.5} O _{0.5})	22.5	-	0.01	-	-	-	0.002
Surfactina (CH _{1.75} N _{0.13} O _{0.25})	19.57	0.01	0.01	0.01	0.005	0.01	0.01
Fengicina (CH _{1.53} N _{0.17} O _{0.28})	20.39	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.002
Iturina (CH _{1.54} N _{0.25} O _{0.29})	21.68	-	-	0.02	0.004	-	-
Dióxido de carbono (CO ₂) ^d	44.01	0.48	0.49	0.34	0.18	0.43	0.06

^a PM indica peso molecular

^b Rendimiento C-mol basado en la glucosa consumida

^c Composición elemental de la biomasa de *B. subtilis* (Dauner et al., 2001)

^d Estimado a partir del balance de carbono

9.3 Conclusiones particulares

El carbono se dirigió a la síntesis de lipopéptidos en FMS, mientras que en FML, se dirigió a la producción de metabolitos primarios. En ambos tipos de cultivo se encontró entre los metabolitos primarios analizados una relación inversa entre el flujo de carbono de los lipopéptidos y los metabolitos primarios. En particular, la FMS permitió una alta producción de fengicina e iturina por cepas de tipo silvestre ATCC 21332 y GA1, respectivamente. La producción de lipopéptidos también aumentó con el incremento del crecimiento de la biomasa y el consumo de

glucosa. Estudios adicionales deben realizarse para dirigir el flujo de carbono hacia la producción de lipopéptidos.

10. Conclusiones generales

Se desarrolló un bioproceso en fermentación en medio sólido, de alta producción de fengicina e iturina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 a partir de un medio definido adsorbido en espuma de poliuretano.

La mayor producción de lipopéptidos en cultivo en medio sólido que las obtenidas en fermentación en medio líquido, está asociada a la mayor producción de biomasa y la menor producción de metabolitos primarios.

En ambos tipos de cultivo la producción de lipopéptidos es menor que la de los metabolitos primarios evaluados y, la producción de metabolitos primarios en fermentación en medio sólido es menor que en medio líquido.

Este es el primer trabajo en que se reporta la cantidad de fengicina producida por fermentación en medio sólido. La concentración de fengicina obtenida es superior a las reportadas en otros tipos de cultivo.

El uso de un medio de cultivo definido y de espuma de poliuretano como soporte inerte permite el análisis cuantitativo del sustrato y de los productos del metabolismo, así como, de la fisiología y el metabolismo de cepas *Bacillus* en fermentaciones en medio sólido y líquido.

11. Perspectivas

En futuros trabajos deberán evaluarse las condiciones ambientales y nutricionales que favorecen el flujo de carbono a la producción de lipopéptidos en lugar de metabolitos primarios. Así mismo, se deberá estudiar la influencia del desarrollo de biopelículas en el bioproceso en FMS y continuar el trabajo de mejoramiento genético de cepas para incrementar aún más la producción de lipopéptidos y, eventualmente, producir selectivamente el lipopéptido de interés.

12. Referencias

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
- Abdellaziz, L., Chollet, M., Abderrahmani, A., Béchet, M., Yaici, L., Chataigné, G., Arias, A. A., Leclère, V., & Jacques, P. (2018). Lipopeptide biodiversity in antifungal *Bacillus* strains isolated from Algeria. *Archives of Microbiology*, 200(8), 1205–1216. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1537-8>
- Abushady, A., Bashandy, A., Aziz, N., & Ibrahim, H. (2005). Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7(3), 337–344.
- Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., & Behboudi, K. (2014). Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. *Crop Protection*, 60, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.02.013>
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Thonart, P. (2001). Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91–93(1–9), 551–562. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., & Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- Ano, T., Jin, G. Y., Mizumoto, S., Mohammad Shahedur, R., Okuno, K., & Shoda, M. (2009). Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. *Journal of Environmental Sciences*, 21(SUPPL. 1), S162–S165. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60064-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60064-4)
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>

- Banat, I. M., Carboué, Q., Saucedo-Castañeda, G., & de Jesús Cázares-Marinero, J. (2021). Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. *Bioresource Technology*, 320, 124222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124222>
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 87, Issue 2, pp. 427–444). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- Baños, J. (2010). *Producción de lovastatina en fermentación sólida sobre soporte inerte artificial, por una cepa silvestre de Aspergillus terreus (tub f-514) y por sus mutantes resistentes a estrés osmótico y a estrés oxidativo*. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=15369&docs=UAMI15369.pdf>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. In *Process Biochemistry* (Vol. 47, Issue 2, pp. 175–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Bartal, A., Vigneshwari, A., Bóka, B., Vörös, M., Takács, I., Kredics, L., Manczinger, L., Varga, M., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A. (2018). Effects of Different Cultivation Parameters on the Production of Surfactin Variants by a *Bacillus subtilis* Strain. *Molecules*, 23(10), 2675. <https://doi.org/10.3390/molecules23102675>
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23–31.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., & Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 593–600. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4181-2>
- Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaña-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., Di Mascio, P., Ogura, T., & Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria,

- Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. In *Fermentation Processes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64236>
- Biniarz, P., Łukaszewicz, M., & Janek, T. (2017). Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 393–410). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163324>
- Brück, H. L., Delvigne, F., Dhulster, P., Jacques, P., & Coutte, F. (2019). Molecular strategies for adapting *Bacillus subtilis* 168 biosurfactant production to biofilm cultivation mode. *Bioresource Technology*, 293, 122090. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122090>
- Burés, S., Gago, M., Morales, O., Marfà, O., & Martinez, F. (1997). Water characterization in granular materials. *Acta Horticulturae*, 450(450), 389–396. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.450.48>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31–39. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004
- Chen, B., Wen, J., Zhao, X., Ding, J., & Qi, G. (2020). Surfactin: A Quorum-Sensing Signal Molecule to Relieve CCR in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 631. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00631/BIBTEX>
- Chen, H. (2013). Modern solid state fermentation: Theory and practice. In *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1_1
- Chen, L., Zhang, H., Zhao, S., Xiang, B., & Yao, Z. (2021). Lipopeptide production by *Bacillus atrophaeus* strain B44 and its biocontrol efficacy against cotton rhizoctoniosis. *Biotechnology Letters*, 43(6), 1183–1193. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03114-0>
- Chen, W., Juang, R., & Wei, Y. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Cheng, Y.-H., Zhang, N., Han, J.-C., Chang, C.-W., Hsiao, F. S.-H., & Yu, Y.-H. (2018). Optimization of surfactin production from *Bacillus subtilis* in fermentation and its effects on *Clostridium perfringens* -induced necrotic enteritis and growth performance in broilers.

- Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1232–1244.
<https://doi.org/10.1111/jpn.12937>
- Chinmay Hazra, Debasree Kundu, & Ambalal Chaudhari. (2014). Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. *RSC Advances*, 5(4), 2974–2982. <https://doi.org/10.1039/C4RA13261K>
- Chtioui, O., Dimitrov, K., Gancel, F., Dhulster, P., & Nikov, I. (2012). Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production. *Process Biochemistry*, 47(12), 2020–2024.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.013>
- Cossus, L., Roux-Dalvai, F., Kelly, I., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2021). Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. *Biological Control*, 154, 104497.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104497>
- Costa, J. A. V., Treichel, H., Santos, L. O., & Martins, V. G. (2018). Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State fermentation* (pp. 357–372). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00016-5>
- Coutte, F., Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.-S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., & Jacques, P. (2010). Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x>
- Coutte, François, Lecouturier, D., Dimitrov, K., Guez, J. S., Delvigne, F., Dhulster, P., & Jacques, P. (2017). Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. In *Biotechnology Journal* (Vol. 12, Issue 7). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201600566>
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., Wang, S., & Yang, C. (2019). Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1121-1>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by

- Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 42(8), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.011>
- Datta, P., Tiwari, P., & Pandey, L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, 270, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.047>
- Dauner, M., Storni, T., & Sauer, U. (2001). *Bacillus subtilis* Metabolism and Energetics in Carbon-Limited and Excess-Carbon Chemostat Culture. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7308–7317. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7308-7317.2001>
- Davis, D. ., Lynch, H. ., & Varley, J. (1999). The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3–5), 322–329. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00048-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00048-4)
- Davis, D. A., Lynch, H. C., & Varley, J. (2001). The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4–5), 346–354. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00327-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00327-6)
- De Faria, A. F., Teodoro-Martinez, D. S., De Oliveira Barbosa, G. N., Gontijo Vaz, B., Serrano Silva, Í., Garcia, J. S., Tótoia, M. R., Eberlin, M. N., Grossman, M., Alves, O. L., & Regina Durrant, L. (2011). Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46(10), 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>
- de Souza, C. G., Martins, F. I. C. C., Zocolo, G. J., Figueiredo, J. E. F., Canuto, K. M., & de Brito, E. S. (2018). Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(26), 6827–6836. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1281-6>
- Desai, J., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47–64.
- Dhali, D., Coutte, F., Arias, A. A., Auger, S., Bidnenko, V., Chataigné, G., Lalk, M., Niehren, J., de Sousa, J., Versari, C., & Jacques, P. (2017). Genetic engineering of the branched fatty

- acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C 14 isoform. *Biotechnology Journal*, 12(7), 1600574. <https://doi.org/10.1002/biot.201600574>
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 48, pp. 77–90). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., & Nikov, I. (2012). Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresource Technology*, 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.019>
- Favela-Torres, E., Noé, C., Augur, C., & Viniegra-González, G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, 36(6), 565–570. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00251-X)
- Fickers, P., Leclère, V., Guez, J. S., Béchet, M., Coucheney, F., Joris, B., & Jacques, P. (2008). Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Research in Microbiology*, 159(6), 449–457. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2008.05.004>
- Fonseca, R. R., Silva, A. J. R., De França, F. P., Cardoso, V. L., & Sérvulo, E. F. C. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140(1–12), 471–486. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9073-z>
- Geankopolis, C. J. (1998). Curvas de velocidad de secado. In *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias* (Tercera, pp. 596–601). Compañía editorial Continental, S.A de C.V. <https://fenomenosdetransporte.files.wordpress.com/2008/05/geankopolis.pdf>
- Ghazala, I., Bouassida, M., Krichen, F., Manuel Benito, J., Ellouz-Chaabouni, S., & Haddar, A. (2017). Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification. *Engineering in Life Sciences*, 17(12), 1244–1253. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700020>
- Ghribi, D., & Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/653654>

- Gong, Z., He, Q., Che, C., Liu, J., & Yang, G. (2020). Optimization and scale-up of the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state fermentation using high-density polyurethane foam as an inert support. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02234-2>
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059>
- Guez, J. S., Müller, C. H., Danze, P. M., Büchs, J., & Jacques, P. (2008). Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2008.01.003>
- Guimarães, C. R., Pasqualino, I. P., da Mota, F. F., de Godoy, M. G., Seldin, L., de Castilho, L. V. A., & Freire, D. M. G. (2019). Surfactin from *Bacillus velezensis* H2O-1: Production and Physicochemical Characterization for Postsalt Applications. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22(3), 451–462. <https://doi.org/10.1002/jsde.12250>
- Guo, Q., Dong, L., Wang, P., Li, S., Zhao, W., Lu, X., Zhang, X., & Ma, P. (2018). The PhoR/PhoP two-component system regulates fengycin production in *Bacillus subtilis* NCD-2 under low-phosphate conditions. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61669-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61669-1)
- Guo, S., Zhang, J. wei, Dong, L. hong, Li, X., Asif, M., Guo, Q. gang, Jiang, W. jun, Ma, P., & Zhang, L. qun. (2019). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 is involved in suppression of clubroot on Chinese cabbage. *Biological Control*, 136, 104001. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104001>
- Härtig, E., & Jahn, D. (2012). Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Bacterial Respiratory Physiology, Advances in Microbial Physiology* (Vol. 61, pp. 195–216). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6>
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., & Hausmann, R. (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. In *Biotechnology Journal* (Vol. 12, Issue 7). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201600561>

- Hmidet, N., Ben Ayed, H., Jacques, P., & Nasri, M. (2017). Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. *BioMed Research International*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/5893123>
- Holmberg, K. (2019). Surfactants. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 1–56). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_747.pub2
- Huang, X., Liu, J., Wang, Y., Liu, J., & Lu, L. (2015). The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), 381–389. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1006905>
- Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- Jacques, P. (2011). Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In G. Soberón-Chávez (Ed.), *Biosurfactants, Microbiology Monographs* (pp. 57–91). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 Plackett-Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 77–79, 223–233. <https://doi.org/10.1385/abab:77:1-3:223>
- Jain, D., Collins-Thompson, D., Lee, H., & Trevors, J. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-W](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W)
- Jiménez-Delgado, R., Valdés-Rodríguez, S., & Olalde-Portugal, V. (2018). Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2018). Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2735–2747. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.138>
- Joe, M., Bradeeba, K., Parthasarathi, R., Sivakumaar, P., Chauhan, P., Tipayno, S., Benson, A.,

- & Sa, T. (2012). Development of surfactin based nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluation for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.08.008>
- Jokari, S., Rashedi, H., Amoabediny, G. H., Yazdian, F., Rezvani, M., & Hatamian Zarmi, A. S. (2012). Effect of Aeration Rate on Biosurfactin Production in a Miniaturized Bioreactor. *International Journal of Environmental Research*, 6(3), 627–634. <https://doi.org/10.22059/IJER.2012.532>
- Jokari, S., Rashedi, H., Amoabediny, G., Naghizadeh Dilmaghani, S., & Mazaheri Assadi, M. (2013). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in a Miniaturized Bioreactor. *International Journal of Environmental Research*, 7(4), 851–858. <https://doi.org/10.22059/IJER.2013.666>
- Juárez-Cárdenas, M. (2015). *Fisiología de crecimiento de Aspergillus niger en fermentación en medio sólido con diferentes soportes* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=17016&docs=UAMI17016.pdf>
- Jung, J., Yu, K. O., Ramzi, A. B., Choe, S. H., Kim, S. W., & Han, S. O. (2012). Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(9), 2349–2356. <https://doi.org/10.1002/bit.24524>
- Kan, S. C., Lee, C. C., Hsu, Y. C., Peng, Y. H., Chen, C. C., Huang, J. J., Huang, J. W., Shieh, C. J., Juang, T. Y., & Liu, Y. C. (2017). Enhanced surfactin production via the addition of layered double hydroxides. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.06.017>
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Lee, C.-H., Suh, H.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5)

- Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., & Marahiel, M. A. (2010). Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, 17(8), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>
- Kügler, J. H., Le Roes-Hill, M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2015). Surfactants tailored by the class Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00212>
- Li, Q. (2017). Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. *Frontiers of Chemical Science and Engineering 2017 11:1*, 11(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/S11705-016-1607-X>
- Li, X.-Y., Yang, J.-J., Mao, Z.-C., Ho, H.-H., Wu, Y.-X., & He, Y.-Q. (2014). Enhancement of Biocontrol Activities and Cyclic Lipopeptides Production by Chemical Mutagenesis of *Bacillus subtilis* XF-1, a Biocontrol Agent of *Plasmodiophora brassicae* and *Fusarium solani*. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 476–479. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0471-y>
- Li, X., Li, A., Liu, C., Yang, J., Ma, F., Hou, N., Xu, Y., & Ren, N. (2012). Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. *Process Biochemistry*, 47(4), 626–634. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.004>
- Li, X., Yang, H., Zhang, D., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1527-z>
- Lima-Pérez, J., López-Pérez, M., Viniegra-González, G., & Loera, O. (2019). Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(9), 1527–1535. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02150-5>
- Lin, S., Lin, K., & Lin, Y. (1998). Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 267–273.
- Liu, K., Sun, Y., Cao, M., Wang, J., Lu, J. R., & Xu, H. (2020). Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 45, pp. 57–67). Elsevier Ltd.

- <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.005>
- Marinelli, F., & Marcone, G. L. (2011). Microbial secondary metabolites. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (Third, pp. 312–323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00168-3>
- MarketResearch. (2021). *Biosurfactants*. MarketResearch.Com. <https://www.marketresearch.com/Global-Industry-Analysts-v1039/Biosurfactants-14372874/>
- MarketsandMarkets. (2020). *Surfactants Market by Type (Anionic, Non-Ionic, Cationic, and Amphoteric), Application (Home Care, Personal Care, Industrial & Institutional Cleaning, Textile, Elastomers & Plastics, Agrochemicals, and Food & Beverage), Region - Global Forecast to 2025*. MarketsandMarkets. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>
- Mejía Farfán, M. L. (2008). *Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de Bacillus subtilis*. Instituto Politécnico Nacional.
- Meng, Y., Zhao, W., You, J., Gang, H.-Z., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Ye, R.-Q., & Mu, B.-Z. (2016). Structural Analysis of the Lipopeptide Produced by the *Bacillus subtilis* Mutant R2-104 with Mutagenesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(6), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2044-5>
- Miller, J. (1985). Mutagenic specificity of ultraviolet light. *Journal of Molecular Biology*. *Journal of Molecular Biology*, 182(1), 45–65. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90026-9)
- Mitchell, D. A., Berovič, M., & Krieger, N. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. In *Solid-State Fermentation Bioreactors* (pp. 1–12). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2_1
- Mizumoto, S., & Shoda, M. (2007). Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0994-9>
- Mondragón, L. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de*

- MEOR [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. [https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/22942/Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autoctónas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de meor.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/22942/Aislamiento_y_caracterización_de_cepas_bacterianas_aerobias_autoctónas_de_yacimientos_petroleros_productoras_de_biosurfactantes_para_su_aplicación_en_técnicas_de_meor.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Morikawa, M., Ito, M., & Imanaka, T. (1992). Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(5), 255–261. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90055-Y](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90055-Y)
- Motta Dos Santos, L. F., Coutte, F., Ravallec, R., Dhulster, P., Tournier-Couturier, L., & Jacques, P. (2016). An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 218, 944–952. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.053>
- Mulligan, C. N., Chow, T. Y. K., & Gibbs, B. F. (1989). Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(5–6), 486–489. <https://doi.org/10.1007/BF00270781>
- Nair, A. S., Al-Bahry, S., & Sivakumar, N. (2020). Co-production of microbial lipids and biosurfactant from waste office paper hydrolysate using a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(2), 383–391. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00420-6>
- Nakano, M. M., Corbell, N., Besson, J., & Zuber, P. (1992). Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 232(2), 313–321. <https://doi.org/10.1007/BF00280011>
- Núñez-Reyes, D. (2012). *Desarrollo de un sistema de producción de Pichia Pastoris en cultivo en medio sólido* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=15997&docs=UAMI15997.PDF>
- Onwosi, C. O., & Odibo, F. J. C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0891->

3

- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., & Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356–360. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01466-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01466-9)
- Ortega-de la Rosa, N. D., Vázquez-Vázquez, J. L., Huerta-Ochoa, S., Gimeno, M., & Gutiérrez-Rojas, M. (2018). Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(6), 859–869. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1920-5>
- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s002530000403>
- Pérez Sánchez, A. (2014). *Efecto de los estímulos del medio sólido: contacto directo con el aire y estímulo del soporte, en la producción de lovastatina por Aspergillus terreus* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16384&docs=UAMI16384.pdf>
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553–563. <https://doi.org/10.1007/s002530051432>
- Pichardo-Sánchez, M. A. (2019). *Producción de biosurfactantes en cultivo en medio sólido* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=22769&docs=UAMII22769.pdf>
- Piedrahíta-Aguirre, C. A., & Monte Alegre, R. (2014). Production of lipopeptide iturin a using novel strain *Bacillus* iso 1 in a packed bed bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.004>
- Raghavarao, K. S. M. ., Ranganathan, T. ., & Karanth, N. . (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00125-0)
- Rangarajan, V., & Clarke, K. G. (2015). Process development and intensification for enhanced

- production of *Bacillus* lipopeptides. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 31(1–2), 46–68. <https://doi.org/10.1080/02648725.2016.1166335>
- Rangarajan, V., Dhanarajan, G., & Sen, R. (2015). Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate *Bacillus megaterium*. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.016>
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., & Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications. In *Biodegradation - Life of Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56144>
- Reuter, K. (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *The EMBO Journal*, 18(23), 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6823>
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (2013). Biosurfactants. In *The Prokaryotes* (pp. 281–294). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_29
- Sailatha, T., Saranya, P., Swarnalatha, S., Velan, M., & Sekaran, G. (2016). Enzymatic destabilization of chemical surfactant in wastewater—a potent ultrafiltration foulant: kinetic studies. *Desalination and Water Treatment*, 57(32), 14833–14848. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1067839>
- Santander-Rodríguez, G. (2017). *Desarrollo de un sistema para el mejoramiento genético de Streptomyces sp.* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=19101&docs=UAMI19101.pdf>
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 30, Issue 2, pp. 127–144). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>
- Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Torres-Mancera, M., & Rosales-Zamora, G. (2016). *Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO₂ y O₂ y flujo de los gases de salida en*

- procesos biológicos* (Patent No. 336733).
<http://siga.impi.gob.mx/content/common/busquedaSimple.jsf>
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M., Lonsane, B., Navarro, J., Roussos, S., Dufour, D., & Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29(1), 13–24. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80054-5](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80054-5)
- Sen, R., & Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.006>
- Serrano, A., Borreguero, A. M., Garrido, I., Rodríguez, J. F., & Carmona, M. (2017). The role of microstructure on the mechanical properties of polyurethane foams containing thermoregulating microcapsules. *Polymer Testing*, 60, 274–282. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2017.04.011>
- Shafiei, Z., Hamid, A. A., Fooladi, T., & Yusoff, W. M. W. (2014). Surface Active Components: Review. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 6(2), 89–95. <https://doi.org/10.19026/crjbs.6.5503>
- Shaligram, N. S., & Singhal, R. S. (2010). Surfactin-A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 119–134.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., & Balasubramanian, T. (2015). Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522–1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V., & Tomashevich, N. S. (2020). Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1879–1885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.002>
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2018). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Slivinski, C. T., Mallmann, E., De Araújo, J. M., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium

- based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47(12), 1848–1855. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.014>
- Smith, W., & Hashemi, J. (2006). 6.3.1 Valores de propiedades mecánicas obtenidos del ensayo de tracción y del diagrama tensión-deformación convencional. In *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*. (4th ed., pp. 25–26). Mc Graw Gill.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A., & Grossman, A. D. (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 9(5), 547–558. <https://doi.org/10.1101/gad.9.5.547>
- Sun, D., Liao, J., Sun, L., Wang, Y., Liu, Y., Deng, Q., Zhang, N., Xu, D., Fang, Z., Wang, W., & Gooneratne, R. (2019). Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC–MS analysis. *AMB Express*, 9(120), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0845-y>
- Sun, H., Bie, X., Lu, F., Lu, Y., Wu, Y., & Lu, Z. (2009). Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(8), 1003–1006. <https://doi.org/10.1139/W09-044>
- Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L., & Lin, W.-Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 803–809. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>
- Swastika, P., Dwi, S., & Khaswar, S. (2013). Statistical screening of medium components by plackett-Burman experimental design for biosurfactant production by indonesian indigenous *Bacillus* SP DSW17. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, 14(4), 805–813.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., & Jacques, P. (2010). New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1521–1531. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2176-4>
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X., & Chen, W. (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and

- agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.005>
- Torres-Mancera, M. (2013). *Extracción enzimática de ácido clorogénico de la pulpa de café* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=15988&docs=UAMI15988.PDF>
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Valdés-Velasco, L. (2016). *Producción de biosurfactantes lipopeptídicos por Bacillus subtilis en fermentación en medio sólido* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=17259&docs=UAMI17259.pdf>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). Elemental and Redox Balances. In *Bioreaction Engineering Principles* (Third, pp. 63–118). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
- Wang, Q., Chen, S., Zhang, J., Sun, M., Liu, Z., & Yu, Z. (2008). Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresource Technology*, 99(8), 3318–3323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.052>
- Wei, Y.-H., Lai, C.-C., & Chang, J.-S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, 42(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.025>
- Wei, Y., & Chu, I. (2002). Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 24(6), 479–482. <https://doi.org/10.1023/A:1014534021276>

- Wei, Y. H., Wang, L. C., Chen, W. C., & Chen, S. Y. (2010). Production and characterization of fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 originating from a potato farm. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 426–4538. <https://doi.org/10.3390/ijms11114526>
- Willenbacher, J., Mohr, T., Henkel, M., Gebhard, S., Mascher, T., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2016). Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive P in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production. *Journal of Biotechnology*, 224, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.002>
- Willenbacher, J., Yeremchuk, W., Mohr, T., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2015). Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. *AMB Express*, 5(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0145-0>
- Wright, R. (2005). MASS SPECTROMETRY | Gas Analysis. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 493–501. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00363-0>
- Wu, J.-Y., Liao, J.-H., Shieh, C.-J., Hsieh, F.-C., & Liu, Y.-C. (2018). Kinetic analysis on precursors for iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(5), 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.002>
- Wu, Q., Zhi, Y., & Xu, Y. (2019). Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, 52, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.004>
- Wu, Y.-S., Ngai, S.-C., Goh, B.-H., Chan, K.-G., Lee, L.-H., & Chuah, L.-H. (2017). Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00761>
- Xu, H., Jia, S., & Liu, J. (2011). Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 779–788. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i5>.
- Xu, Y., Cai, D., Zhang, H., Gao, L., Yang, Y., Gao, J., Li, Y., Yang, C., Ji, Z., Yu, J., & Chen, S. (2020). Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization. *Process Biochemistry*, 90, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>
- Yang, N., Wu, Q., & Xu, Y. (2020). Fe Nanoparticles Enhanced Surfactin Production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *ACS Omega*, 5(12), 6321–6329.

- <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03648>
- Yang, R., Lei, S., Xu, X., Jin, H., Sun, H., Zhao, X., Pang, B., & Shi, J. (2020). Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 19, pp. 8077–8087). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10801-x>
- Yaseen, Y., Gancel, F., Béchet, M., Drider, D., & Jacques, P. (2017). Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production. *Archives of Microbiology*, 199(10), 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1406-x>
- Yaseen, Y., Gancel, F., Drider, D., Béchet, M., & Jacques, P. (2016). Influence of promoters on the production of fengycin in *Bacillus* spp. *Research in Microbiology*, 167(4), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.008>
- Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41(8), 1799–1805. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>
- Yilgor, I., Yilgor, E., Guler, I., Ward, T., & Wilkes, G. (2006). FTIR investigation of the influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes. *Polymer*, 47(11), 4105–4114. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.02.027>
- Yoneda, T., Miyota, Y., Furuya, K., & Tsuzuki, T. (2002). *Production process of surfactin* (Patent No. 7011969).
- Yue, H., Zhong, J., Li, Z., Zhou, J., Yang, J., Wei, H., Shu, D., Luo, D., & Tan, H. (2021). Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology. *3 Biotech 2021 11:2*, 11(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S13205-020-02540-7>
- Zhang, L., & Sun, C. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), 445–463. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>
- Zhang, X. (2012). Applying the mutation of *Bacillus subtilis* and the optimization of feather fermentation medium to improve Keratinase activity. *Advances in Biological Chemistry*, 2,

- 64–69. <https://doi.org/10.4236/abc.2012.21008>
- Zhang, Y., Li, S., Liu, L., & Wu, J. (2013). Acetoin production enhanced by manipulating carbon flux in a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, *130*, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.036>
- Zhang, Z., Ding, Z. T., Zhong, J., Zhou, J. Y., Shu, D., Luo, D., Yang, J., & Tan, H. (2017). Improvement of iturin A production in *Bacillus subtilis* ZK0 by overexpression of the comA and sigA genes. *Letters in Applied Microbiology*, *64*(6), 452–458. <https://doi.org/10.1111/lam.12739>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(15), 5951–5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Yao, Z., Zhang, L., Bie, X., Lu, F., & Lu, Z. (2012). Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *39*(6), 889–896. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1098-9>
- Zheng, Y., Zheng, M., Ma, Z., Xin, B., Guo, R., & Xu, X. (2015). Sugar Fatty Acid Esters. In *Polar Lipids* (pp. 215–243). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50012-1>
- Zhu, X., Wei, L., & Huang, X. (2013). Study on effect of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* against *E. coli*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *7*(1), 485–490.
- Zhu, Z., Sun, L., Huang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). Comparison of the kinetics of lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation under isothermal and non-isothermal conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 1615–1623. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1587-7>
- Zhu, Z., Zhang, J., Wu, Y., Ran, W., & Shen, Q. (2013). Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(11), 2105–2114. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1375-4>
- Zohora, U. S., Rahman, M. S., Khan, A. W., Okanami, M., & Ano, T. (2013). Improvement of production of lipopeptide antibiotic iturin A using fish protein. *Journal of Environmental Sciences*, *25*, S2–S7. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(14\)60616-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(14)60616-1)

- Zouari, R., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi-Aydi, D. (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production Under Solid-state Fermentation Using By-products of a Traditional Olive Mill Factory. *Achievements in the Life Sciences*, 8(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.als.2015.04.007>
- Zune, Q., Soyeurt, D., Toye, D., Ongena, M., Thonart, P., & Delvigne, F. (2014). High-energy X-ray tomography analysis of a metal packing biofilm reactor for the production of lipopeptides by *Bacillus subtilis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(3), 382–390. <https://doi.org/10.1002/jctb.4128>

13. Anexos

Anexo A. Evaluación de métodos de selección para los mutantes.

Para la elección del método para la selección de los mutantes se evaluaron tres metodologías con la cepa *B. subtilis* ATCC 6633: la actividad antifúngica, la medida del halo de emulsión y la actividad hemolítica. A continuación, se presenta el desarrollo de cada una de ellas.

Actividad antifúngica

Se comparó el efecto de un cultivo con 24 h de incubación de ATCC 6633 en caldo nutritivo y diferentes concentraciones de LP crudos (8.8, 17 y 35 g/L) producidos por dicha *Bacillus*, sobre el hongo *Aspergillus brasiliensis* recién inoculado y con 3 días de incubación en cajas Petri con PDA (Joe et al., 2012; Li et al., 2014). Para ello, se colocaron en las cajas inoculadas del hongo seis papeles filtro estériles (6 mm diámetro) a los cuales se les adicionaron 10 μ L de la muestra correspondiente y se incubaron por 24 y 48 h a 30 °C (Figura A.1).

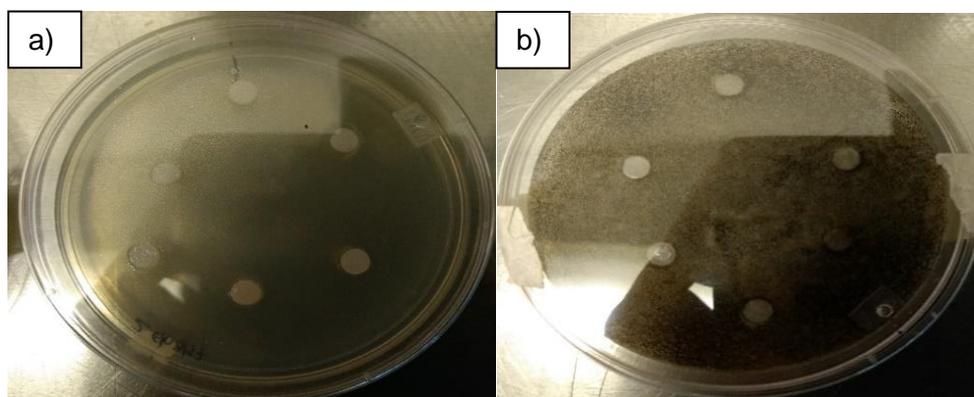


Figura A.1 Tiempo de incubación del hongo. a) 0 h. b) 3 días.

En la Figura A.2a se observa el hongo y las diferentes muestras evaluadas después de 24 h de incubación. Las muestras generan un halo delgado alrededor de los papeles filtro indicando un posible efecto de inhibición en la germinación del hongo. Se realiza un acercamiento con un estereoscopio a un halo para apreciarlo mejor (Figura A.2c). Sin embargo, a las 48 h de incubación del hongo junto con las muestras (Figura A.2b y A.2d), el hongo crece sobre el papel filtro de todas las muestras, es decir que ninguna de ellas es capaz de inhibir el crecimiento del hongo posterior a su germinación.

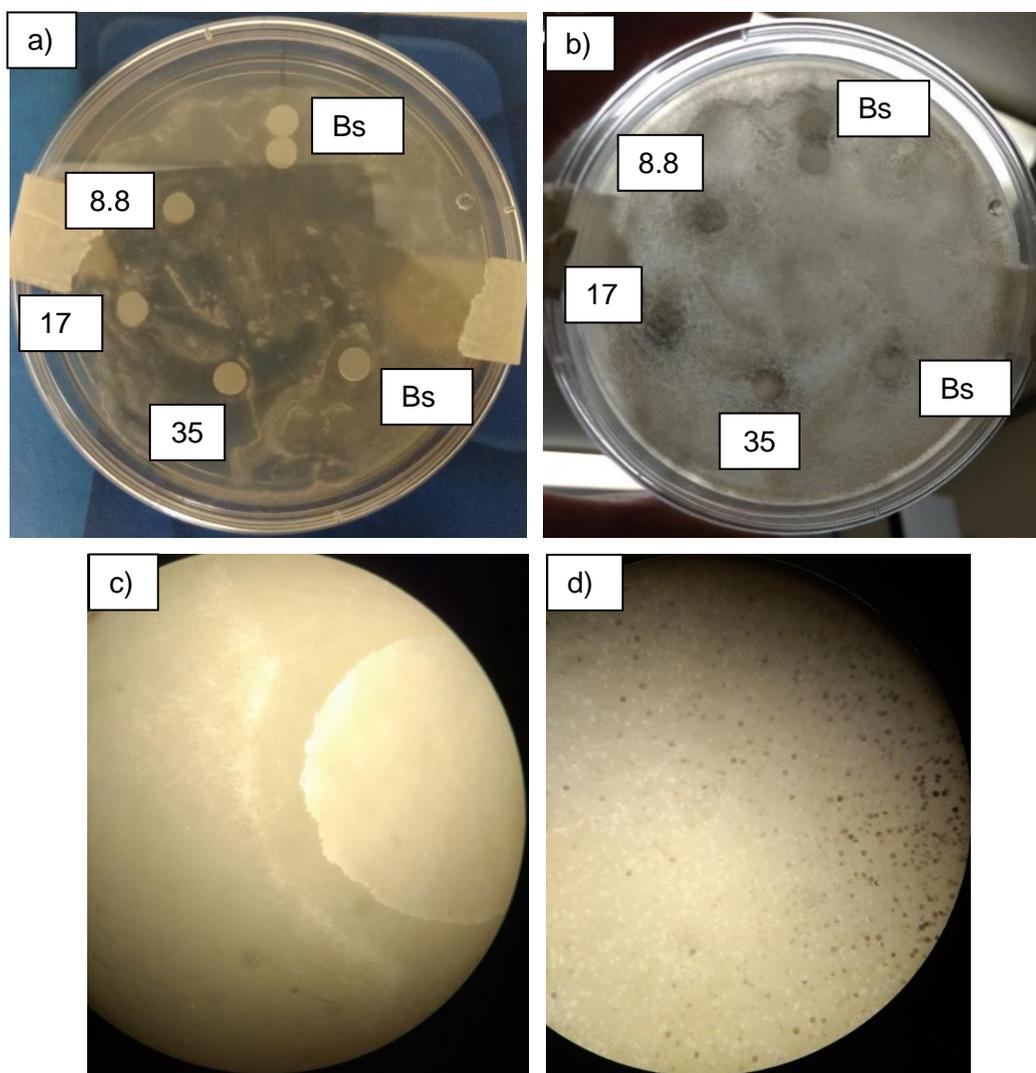


Figura A.2. Efecto de las muestras en el crecimiento del hongo recién inoculado. a) 24 h y b) 48 h después de la adición de las respectivas muestras. Acercamiento a la muestra de Bs a las c) 24 h y d) 48 h. Bs: cultivo de *B. subtilis* con 24 h de crecimiento; 8.8, 17 y 35 son las concentraciones de LP crudos en g/L.

En cuanto al efecto de las muestras sobre un hongo con 3 días previos de incubación, se observa que no presentan actividad antifúngica a las 24 y 48 h después de ser añadidas en los papeles filtro ya que el hongo creció sobre los papeles filtros (Figura A.3). Así que, los LP producidos por la ATCC 6633, independientemente de las concentraciones evaluadas, no generan un efecto negativo sobre el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis*. Por lo tanto, se descarta el uso de la actividad antifúngica como método de selección de mutantes.

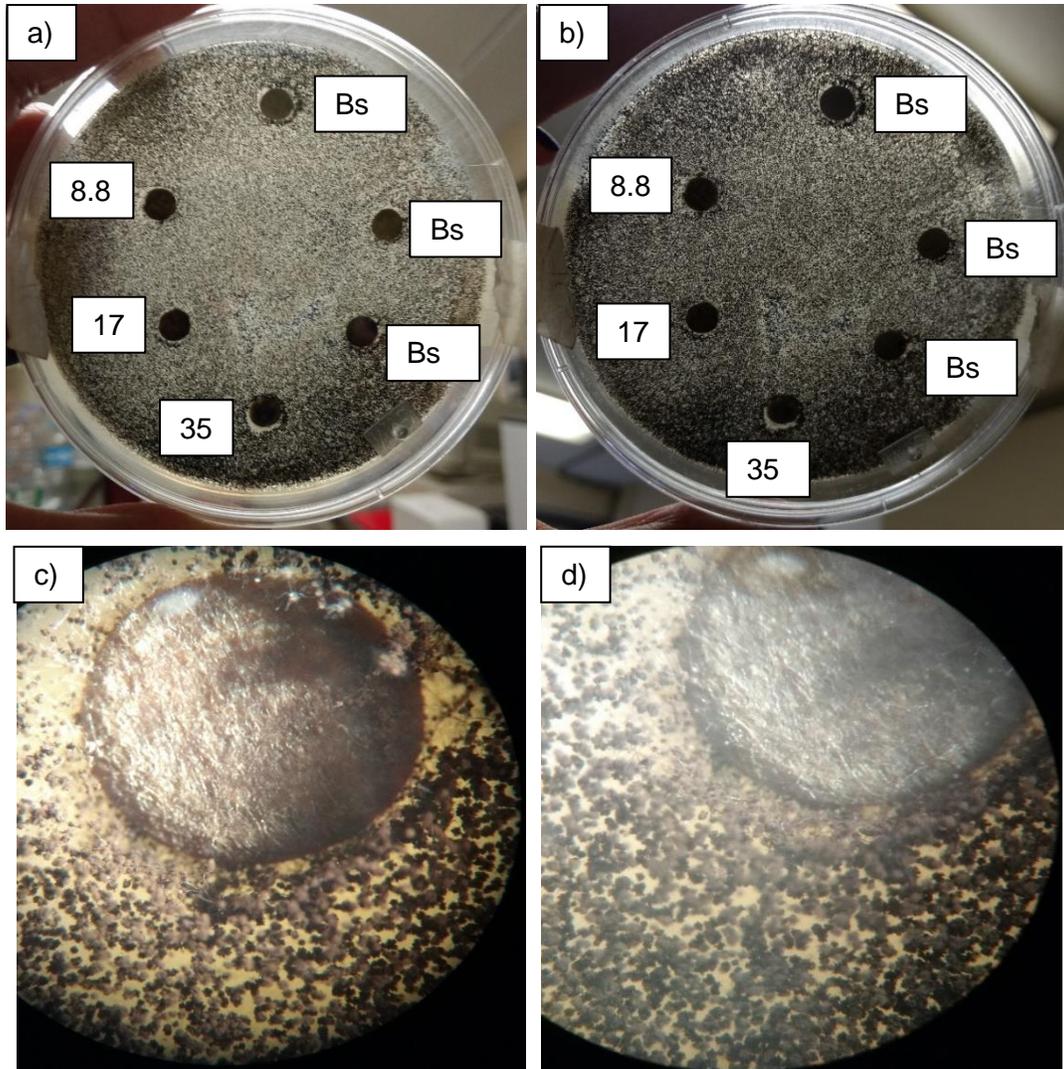


Figura A.3. Efecto de las muestras en el crecimiento del hongo con 3 días de incubación previos. a) 24 h y b) 48 h después de la adición de las respectivas muestras. Acercamiento a la muestra Bs a las c) 24 h y d) 48 h. Bs: cultivo de *B. subtilis* con 24 h de crecimiento; 8.8, 17 y 35 son las concentraciones de LP crudos en g/L.

Medida del halo de emulsión

La metodología propuesta fue dispersar 100 μL de *B. subtilis* ATCC 6633 con 24 h de crecimiento en caldo nutritivo (BIOXON) sobre cajas con agar nutritivo suplementadas con 300 μL de una mezcla petróleo (crudo Maya) con xileno 1:4 p/p sobre la superficie (Morikawa et al., 1992). Incubar las cajas por 1 semana a 30 $^{\circ}\text{C}$ y seleccionar las UFC rodeadas por un halo emulsionado como posibles cepas productoras de BS. No obstante, en el desarrollo de esta metodología, no fue posible dispersar homogéneamente la mezcla de hidrocarburo sobre la superficie del agar y como consecuencia tampoco el inoculo (Figura A.4). Aun así, se incubaron

las cajas Petri durante 1 semana. Como resultado, las UFC no forman un halo de emulsión. Por ello, se descarta este método para que sea parte de la selección de mutantes sobreproductores. Además, presenta una metodología poco práctica y no se observa presencia de alguna emulsión.

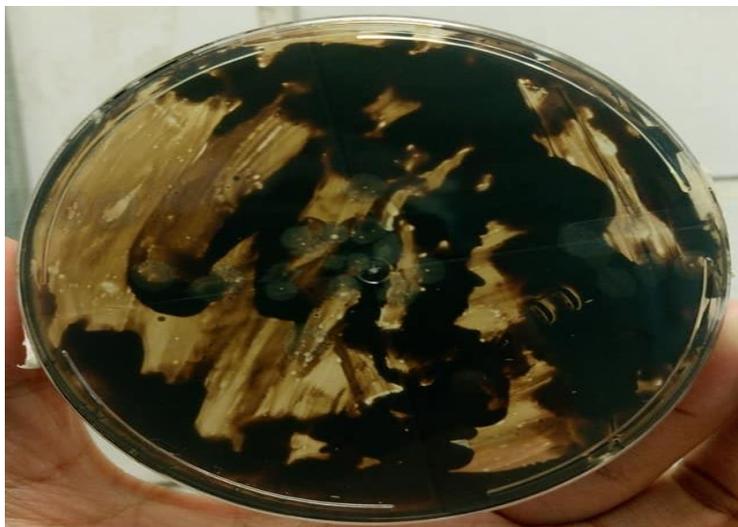


Figura A.4. Medida del halo de emulsión.

Actividad hemolítica

Tabla A.1. Composición del agar sangre (MCD LAB)

Componente	g/L
Digerido pancreático de caseína	15
Peptona de soya	5
Agar bacteriológico	15
Cloruro de sodio	5
Sangre de carnero desfibrinada	5%
pH	7.4±0.2

Se dispersaron 100 μ L de *B. subtilis* ATCC 6633 con 24 h de cultivo en caldo nutritivo (BIOXON) sobre cajas con agar sangre (MCD LAB, Tabla A.1) y se incubaron a 30 °C por 8 días (Zhao et al., 2012). Se observa que a medida que cada día transcurre el halo de hemólisis es más notorio, la colonia y el entorno de la misma se va tornando poco a poco a un color claro amarillo-verde (Figura A.5). Al tercer día el halo es muy perceptible presentando una hemólisis de tipo alfa.

Adicionalmente, se determina que en la actividad hemolítica es importante considerar del halo de hemólisis su diámetro y tiempo de aparición, además la intensidad de la hemólisis (tipo de hemólisis) para recopilar parámetros cuantitativos y cualitativos. Por otro lado, para corroborar que el grado de lisis de los glóbulos rojos está relacionado con el nivel de concentración del LP

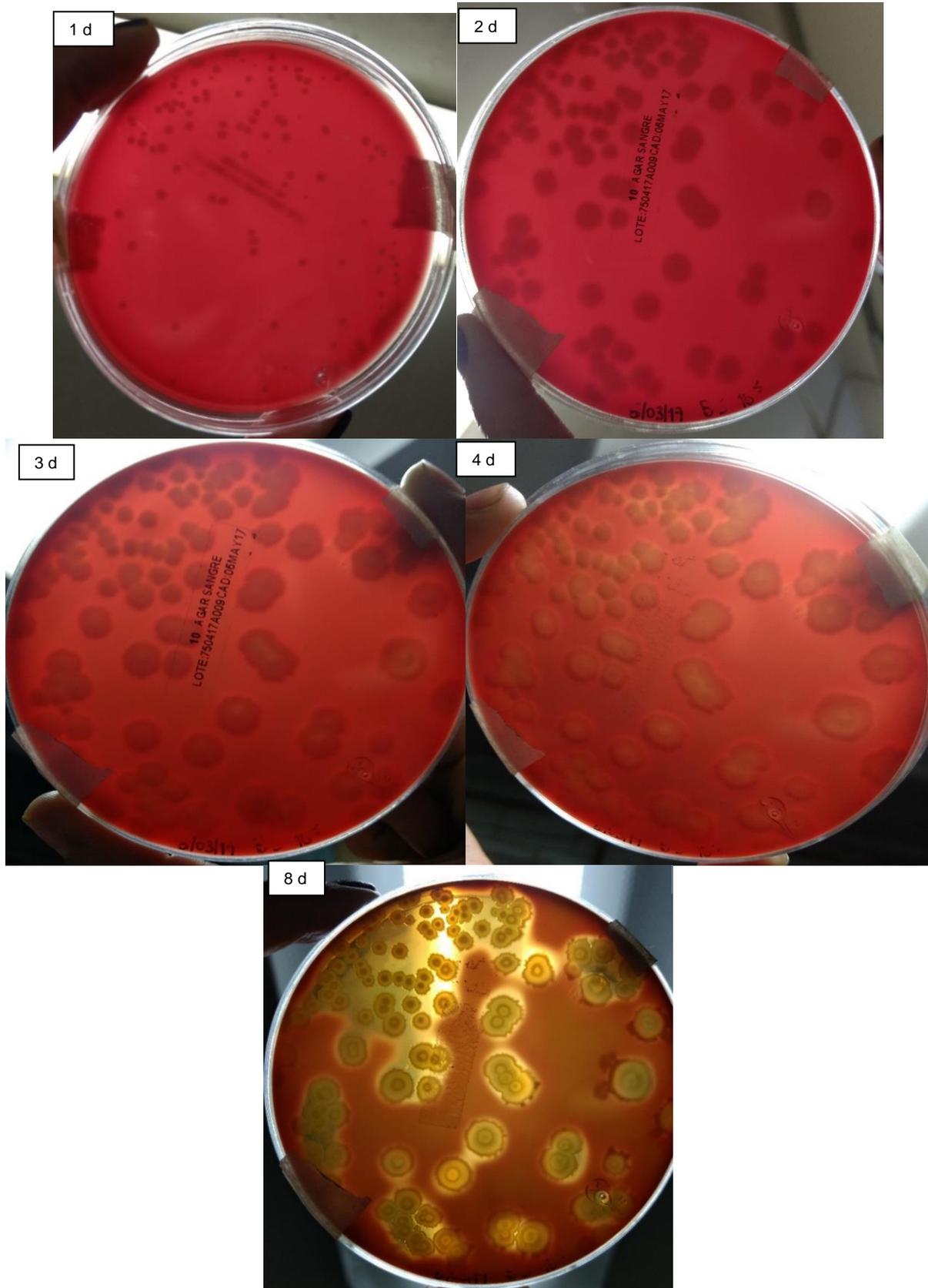


Figura A.5. Actividad hemolítica durante 1,2,3,4 y 8 días.

(Desai & Banat, 1997; Mulligan et al., 1989), se evaluó la actividad hemolítica de diferentes concentraciones de LP crudos producidos por ATCC 6633 (Figura A.6). Como resultado, se halla que a mayor concentración el halo de hemólisis tiende a ser más de tono amarillo-verde claro. Aunque, éste fue mucho más perceptible para las muestras más concentradas (8.8, 17 y 35 g/L LP crudos). En consecuencia, como existe actividad hemolítica por la cepa ATCC 6633, se eligió este método para la selección de los posibles mutantes sobreproductores y se establece el día 3 de incubación para el análisis de la hemólisis de las colonias.

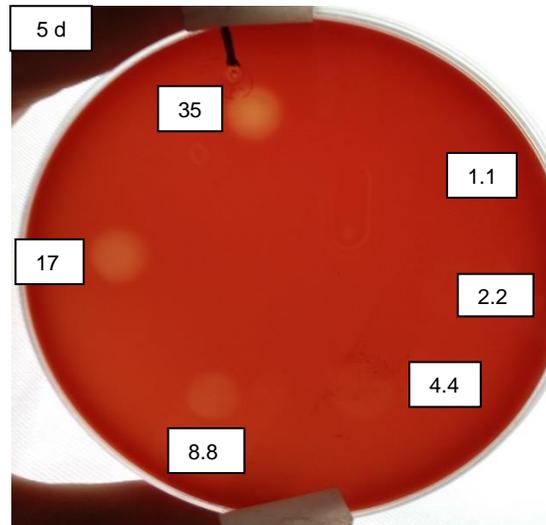


Figura A.6. Actividad hemolítica con diferentes concentraciones de LP crudos (1.1, 2.2, 4.4, 8.8, 17 y 35 g/L).

Anexo B. Estandarización del método de análisis: Actividad emulsificante.

Para la estandarización del método analítico AE se utilizó un extracto crudo proveniente de la FMS con PUF y 60 h de cultivo producido por la mutante #41 proveniente de una mutación con luz UV. La finalidad fue determinar el rango de absorbancia en la cual el comportamiento es lineal y evaluar si el proceso de precipitación ácida es requerido para el análisis de los LP y genera una disminución en la actividad emulsificante. Para ello, por duplicado se tomó 1 mL del extracto crudo de la FMS y se diluyó en serie 1:2 v/v con buffer fosfato pH 9.0, 6 veces. Para evaluar el efecto de la precipitación ácida por duplicado se tomó 1 mL del extracto crudo que se llevó a un pH de 2.0, se dejó por 12 h a 4 °C y se centrifugó. Luego, se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 1 mL de buffer fosfato pH 9.0. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 v/v hasta 10 veces. Posteriormente, las muestras generadas con o sin pasar por precipitación ácida se midieron por AE.

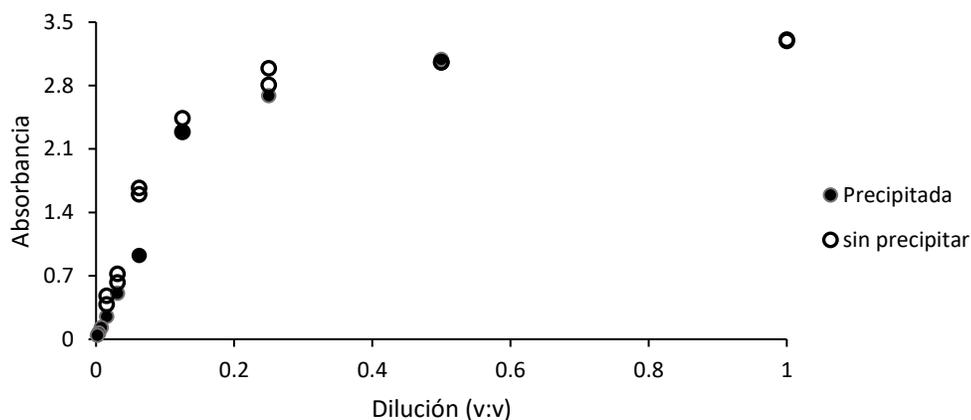


Figura A.7. Absorbancia de diluciones sin y con el proceso de precipitación ácida.

En la Figura A.7, se observa que el proceso de precipitación genera absorbancias ligeramente menores que sin él, lo cual indica la pérdida de una mínima cantidad de LP debido al proceso o eliminación de moléculas no lipídicas que influyan en la AE. Por lo tanto, es posible cuantificar los LP directamente a partir del extracto crudo libre de células sin requerir de precipitación ácida. Por otro lado, se encuentra que a partir de la dilución 0.25 hasta 1, no se presenta un cambio en la absorbancia, es constante y de un valor aproximadamente de D.O 3.0; mientras que a partir de las diluciones por debajo de 0.25, la absorbancia presenta un comportamiento lineal (Figura A.8). El ajuste lineal de las muestras precipitadas y sin precipitar es aproximadamente 1 y el error entre las pendientes es 14.4 %. Además, se estiman las absorbancias teóricas a partir de D.O 2.44 relacionándolas respecto a las diluciones correspondientes, las cuales se aprecian que son congruentes con las que se obtienen con o sin

la precipitación. Por consiguiente, se selecciona la actividad emulsificante para estimar la concentración de los LP; cabe considerar que las absorbancias no deben superar el valor de 2.5, de ser así, se debe diluir la muestra hasta que entre en el rango del comportamiento lineal.

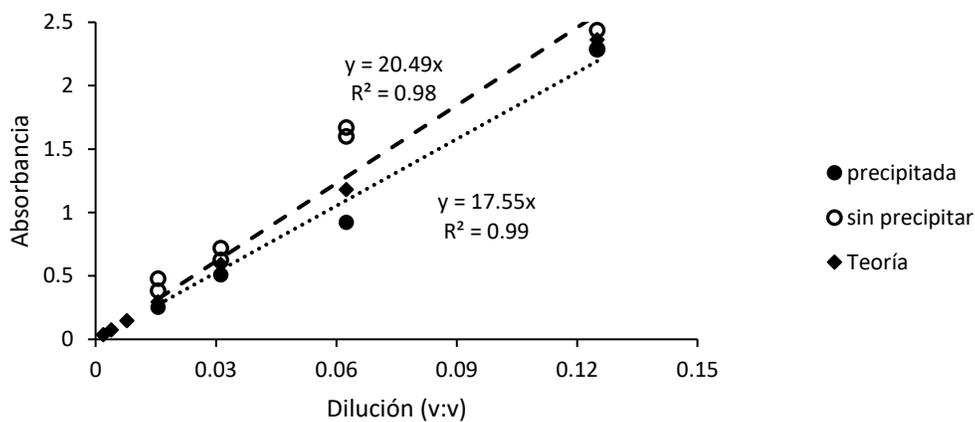


Figura A.8. Comportamiento lineal de las absorbancias.

Estimación del error de la pendiente de la curva estándar de surfactina para el método de la AE.

Una vez que se establecen los límites del método de análisis AE, se realiza una curva estándar con concentraciones conocidas de surfactina vs AE. Sin embargo, la curva se ajusta con intercepción al eje igual a cero (Figura A.9). Por ello, se estima el error de la pendiente calculada sin intercepto ($m = 48.78$) respecto a la determinada con intercepto ($m = 42.52$, intercepto: 1.45), el cual es de 12.8 %. Es decir que se está sobreestimando los valores de concentración en dicho porcentaje, el cual es un valor bajo.

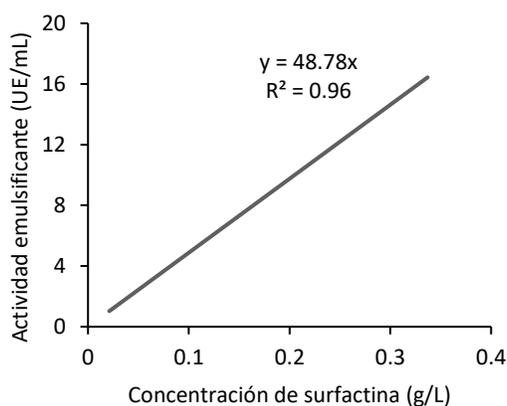


Figura A. 9. Curva estándar para estimar los LP en mg Eq SF/mL

Anexo C. Estandarización del método de recuperación de los lipopéptidos a partir de la espuma de poliuretano.

Para la estandarización del método de recuperación una vez finalizada la FMS, se propusieron comparar 3 técnicas y seleccionar la que permita mayor recuperación de LP (Tabla A.2). Para las experimentaciones se utilizaron muestras provenientes de una FMS por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 de 60 h de cultivo utilizando la PUF como soporte sólido. Después de recuperar los LP utilizando cada técnica por duplicado, se cuantificaron por el método AE descrito en la sección 6.1.6.

Tabla A.2. Técnicas de recuperación de lipopéptidos propuestas.

Técnica	Descripción
A	El cilindro de PUF se retiró del frasco ámbar, se prensó dentro de una jeringa con un embolo y se recolectó la suspensión del prensado.
B	Al frasco que contiene el cilindro de PUF se adicionó 10 mL de agua destilada, se oprimió la PUF varias veces, se recogió la suspensión resultante (extracto 1) y posteriormente la PUF se prensó dentro de una jeringa con un embolo y se recolectó el líquido proveniente del prensado (extracto 2). Finalmente, se juntan los extractos 1 y 2.
C	Al frasco que contiene el cilindro de PUF se adicionó 10 mL de agua destilada, se oprimió la PUF varias veces y posteriormente con una micropipeta se recuperó el extracto.

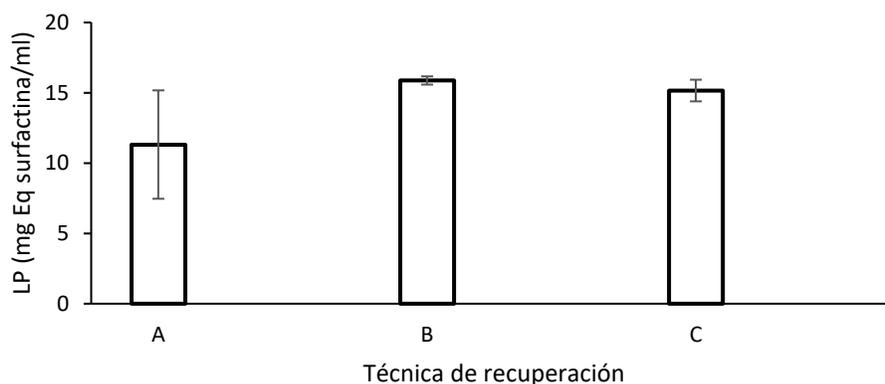


Figura A.10. Recuperación de lipopéptidos por diferentes técnicas.

La Figura A.10 muestra que el método B y C presentan las mayores concentraciones de LP recuperados. El método A presenta un valor 1.4 veces menor a los demás métodos y un alto coeficiente de variación de 34 %. Se infiere que para una mejor recuperación de LP es necesario adicionar agua a la PUF para evitar cierta retención de los productos en el soporte. Por consiguiente, por practicidad experimental, coeficiente de variación y concentración alcanzada, se selecciona la técnica B.

Anexo D. Curvas de secado de diferentes densidades de espuma de poliuretano.

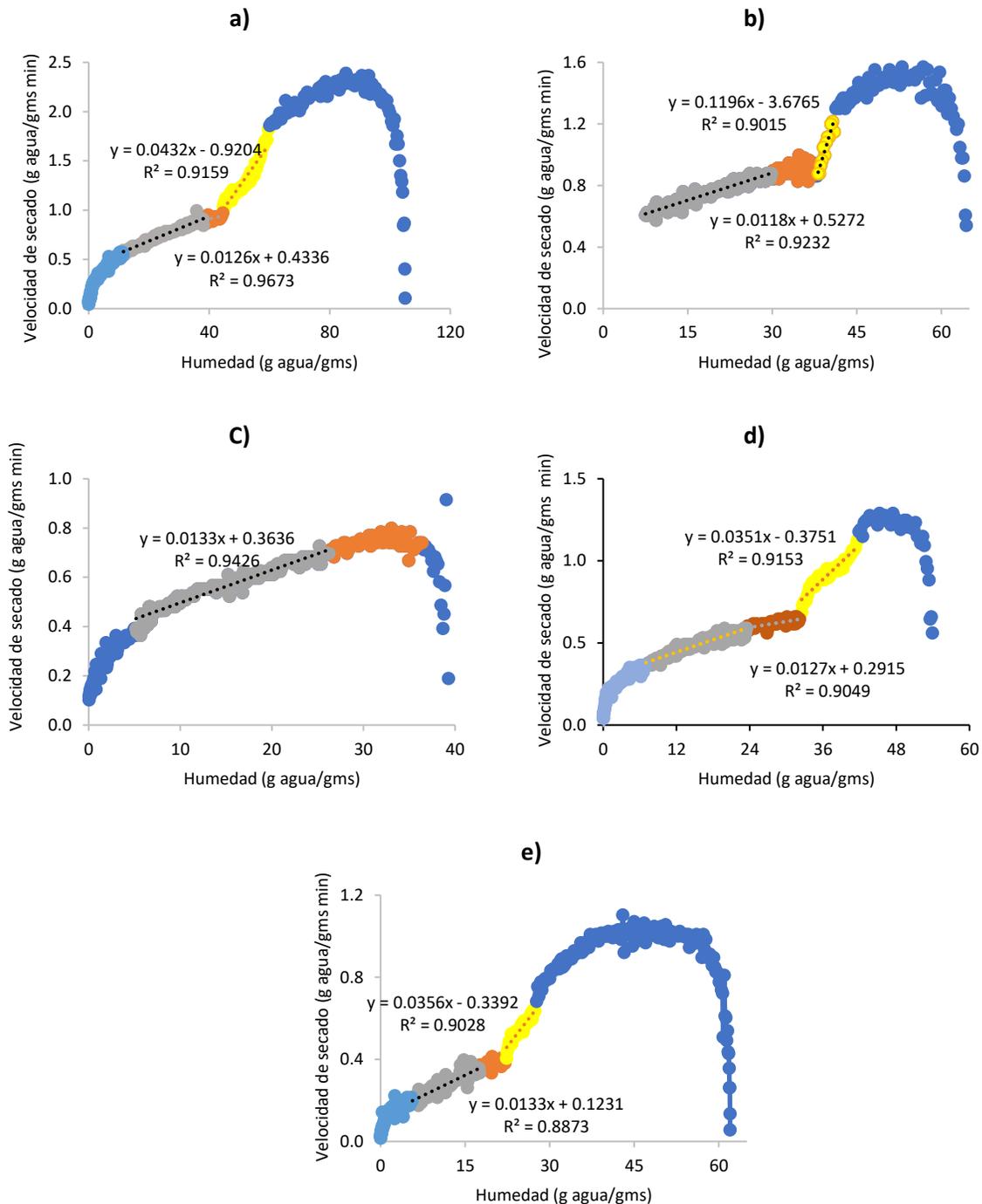


Figura A.11. Curvas de velocidad de secado de un cilindro de PUF de densidad a)17, b)20, c)24, d)27 y e)35 Kg/m³ en función del contenido de humedad.

Anexo E. Curvas de tensión-deformación de diferentes densidades de espuma de poliuretano.

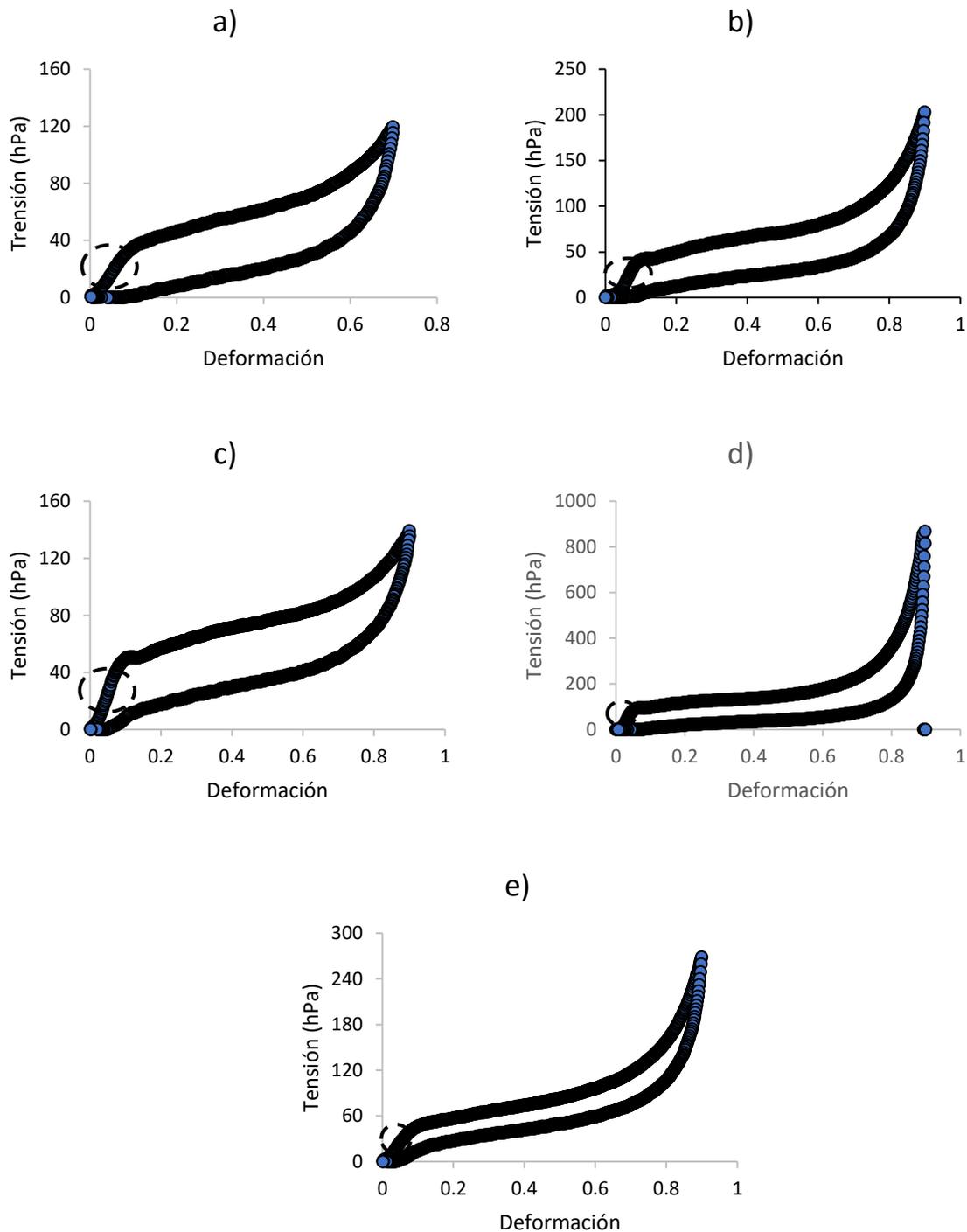


Figura A.12. Curva de velocidad de tensión-deformación de PUFs de densidad a)17, b)20, c)24, d)27 y e)35 Kg/m³. La zona indicada con un círculo corresponde a la zona elástica del material.

Anexo F. Sustrato limitante del crecimiento microbiano en FMS y FML.

El medio de cultivo (Tabla 4) contiene 120 g/L de glucosa como fuente de carbono y 12.03 g/L de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. A continuación, se estima el sustrato limitante para las cepas ATCC 21332, GA1 y BBG 111 en FMS y FML.

Cepa GA1 y ATCC 21332 en FMS

El $Y_{X/G}$ es de 0.22 g/g aproximadamente para las dos cepas en FMS. Si se considera que no hay formación de productos y que la fuente de carbono es la limitante del crecimiento, significa que al final del cultivo la concentración de ese nutriente es igual a 0 y por ende $S_i - S_f = S_i$, entonces $X_f - X_i = Y_{X/G} \times S_i = 0.22 \text{ gX/gG} \times 120 \text{ gG/L} = \mathbf{26.4 \text{ gX/L}}$.

Si se continua con la asunción que no hay formación de productos; la biomasa al ser el único producto nitrogenado, a partir de su fórmula ($\text{CH}_{1.6}\text{N}_{0.22}\text{O}_{0.41}$) se determina que para producir 1 Cmol de biomasa se requieren 0.22 at de N. Con base en esta información, se deduce el $Y_{X/N}$, de la siguiente forma,

$$Y_{X/N} = (1 \text{ CmolX} / 0.22 \text{ at N}) (2 \text{ at N} / 1 \text{ mol NH}_4\text{NO}_3) (1 \text{ mol NH}_4\text{NO}_3 / 80.04 \text{ g NH}_4\text{NO}_3) (23.2 \text{ gX} / 1 \text{ CmolX}) = 2.64 \text{ gX/g NH}_4\text{NO}_3.$$

Si se considera que la fuente de nitrógeno es la limitante significa que al final del cultivo la concentración del nutriente es 0 y por ende $N_i - N_f = N_i$, así $X_f - X_i = Y_{X/N} \times N_i = 2.64 \text{ gX/gN} \times 12.03 \text{ gN/L} = \mathbf{31.8 \text{ gX/L}}$.

Por lo tanto, se observa que la producción de biomasa comparando ambos casos se genera en menor cantidad en el primero donde la fuente de carbono es la limitante de crecimiento microbiano. En adición, realizando este mismo proceso en FML por ATCC 21332 y GA1, y la cepa BBG 111 en FMS y FML, se encuentra nuevamente que el carbono es el sustrato limitante. Respecto a la fuente de fosfato, el medio contiene Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 (Tabla 4), las cuales están en altas concentraciones por lo que se infiere que el fosfato no es sustrato limitante para el crecimiento de la bacteria.

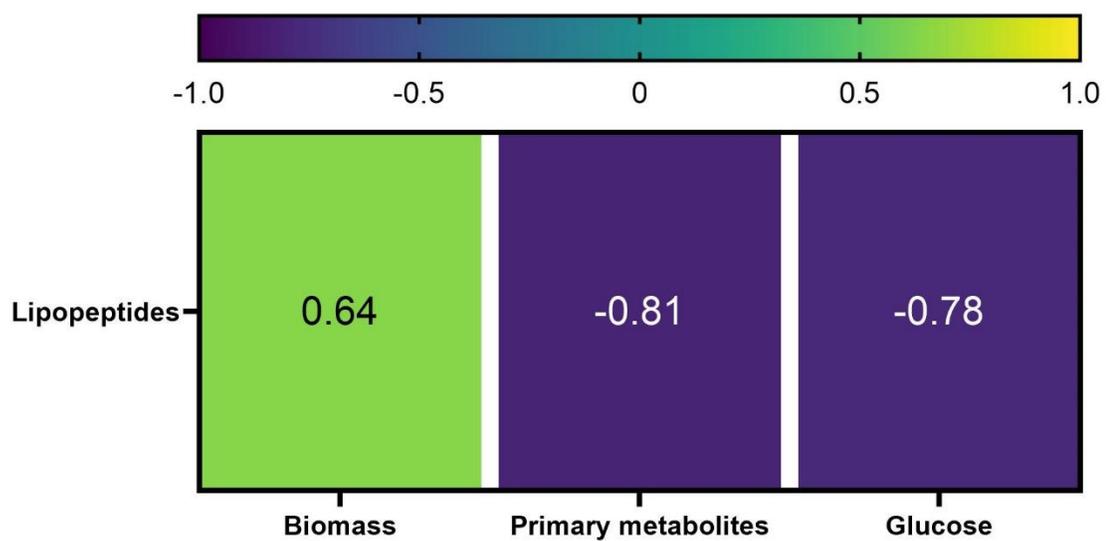
Anexo G. Correlaciones de Pearson.

Figura A.13. Coeficientes de correlaciones de Pearson entre lipopéptidos y biomasa, lipopéptidos y metabolitos primarios y lipopéptidos y glucosa.