

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



POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA
“PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. MARÍA ALEJANDRA PICHARDO SÁNCHEZ

DIRECTOR Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Dr. José de Jesús Cázares Marinero
POLIOLES S.A. de C.V.

Ciudad de México

21 de junio 2019.

Ciudad de México 21 de junio de 2019.

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

PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

que presentó

María Alejandra Pichardo Sánchez

DIRECTOR Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. José de Jesús Cázares Marinero
POLIOLES S.A. de C.V.

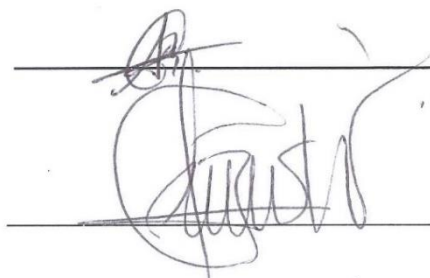
JURADO

Presidente: **Dra. Angélica Román Guerrero**
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Secretario: **Dr. José de Jesús Cázares Marinero**
POLIOLES S.A. de C.V.

Vocal: **M. en C. Lorena Leticia Pedraza Segura**
Universidad Iberoamericana

Vocal: **Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría**
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa




La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluida en el programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001465.

María Alejandra Pichardo Sánchez agradece el apoyo de CONACyT por la beca recibida para obtener el grado Maestría en Biotecnología (CVU 653742).

Esta tesis se realizó dentro del convenio de colaboración entre la empresa Polioles S. A. de C.V. y la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Dentro del marco de los Proyectos en Red Orientados a la Innovación (PROINNOVA): 221262, 231833 y 250609.

Agradecimientos

El camino que elegí seguir no ha sido fácil, pero ha sido muy gratificante, gracias a la compañía de las personas que me rodean y que siempre han estado para apoyarme, sin dudarle mi familia (Padres y hermanos) ha sido la mayor influencia de mí decisión por este sendero, muchas gracias.

Agradezco al Dr. Gerardo Saucedo por su apoyo y guía que han enriquecido mi aprendizaje profesional y personal.

Al Dr. José Cázares, extraordinaria persona, ha sido una gran experiencia trabajar con él, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Angélica Román por su guía y asesoramiento para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela, gracias por encaminarme al mundo de la investigación.

A la Dra. Arely Prado y al Dr. Sergio Huerta por sus palabras de ánimo.

Al equipo de la empresa POLIOLES, Rocío Valencia, Stacy, Hugo Sánchez, Andrea, Harim, Alejandro Salas.

A mis amigos que participaron en el desarrollo del proyecto Polioles, Javier Porcayo, Ascención Ramírez, Claudia Sánchez, Joel Domínguez, Karina Alejandre, Anahí Reyes, Toño Velasco, gracias por su ayuda y compañía.

Agradezco mucho haber encontrado amigos en la Planta Piloto 4 de la UAMI, gracias muchachos porque cada uno contribuyó en momentos de felicidad y alguno que otro sin sabor, Dr. Juan, Raziél, Panchito, Nohemí, Javier, Goyito, Fernando Méndez.

Agradezco a mis queridas amigas de vida Elisa Gutiérrez, Karina García, Gaby Castillo, Karina Alejandre y Silvia.

A Luis Víctor muchas gracias por tus consejos, por tu compañía, por ser mi compañero de desvelos y de vida, gracias por todo.

Resumen

Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfífilas que poseen la capacidad de modificar la tensión superficial e interfacial entre fases líquido-líquido, líquido-sólido y líquido-gas, éstos se producen por la actividad metabólica de bacterias, hongos y levaduras. Los ramnolípidos (RL) pertenecen a la familia de los glicolípidos, son producidos principalmente por especies de *Pseudomonas*, un microorganismo patógeno oportunista que causa enfermedades a la salud humana, el uso de dicho género exige condiciones de seguridad elevadas. De acuerdo con los reportes de la literatura la producción de RL se realiza empleando sistema de cultivo en medio líquido (CL) mayoritariamente, este tipo de cultivo presenta requerimientos energéticos para proveer de agitación y aireación a los microorganismos, durante el CL se genera espuma por lo que se emplean antiespumantes que se vuelven un contaminante en la recuperación del producto.

El cultivo en medio sólido (CMS) ofrece una alternativa para la producción de RL, el medio de cultivo se impregna sobre un soporte sólido que provee de buena aireación y alta transferencia de masa, en particular el oxígeno, en este tipo de cultivo no hay formación de espuma. Este trabajo está dedicado a la producción de biosurfactantes (ramnolípidos) empleando CMS y microorganismos no patógenos con nivel de bioseguridad 1 que no requieren de equipo e instalaciones especiales para su uso.

En una primera etapa se realizó el CMS empleando diferentes combinaciones de fuente de carbono y nitrógeno, las fuentes de carbono evaluadas fueron glicerol y glucosa mientras que las fuentes de nitrógenos fueron sulfato de amonio y nitrato de sodio, los medios de cultivo evaluados se suplementaron con aceite de soya como inductor. *Burkholderia plantarii* alcanzó una concentración de 6.8 a 7.8 g RL/ kg MS, las concentraciones de *Serratia rubidaea* fueron similares 6.8 a 8.4 g RL/ kg MS.

El crecimiento se estimó indirectamente a través del análisis respirométrico de los cultivos, en particular la producción de CO₂. Los cultivos de *S. rubidaea* presentaron una mayor tasa de crecimiento, alcanzó tasas específicas de crecimiento de hasta 0.39 h⁻¹ mientras que con *B. plantarii* se alcanzaron valores de 0.28 h⁻¹.

Los productos obtenidos en ambos sistemas de cultivo fueron analizados por cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con un detector por dispersión de luz que evapora la fase móvil conocido por sus siglas en inglés como ELSD (evaporative light scattering detector). El BS producido por *B. plantarii* en CMS usando glicerol-NaNO₃ y aceite de soya fue el que presentó el conjunto de propiedades fisicoquímicas de mayor similitud al de un estándar comercial de ramnolípido.

Estos datos fueron obtenidos por CCF, HPLC-ELSD, FTIR y medición de tensión superficial, este producto disminuyó la tensión superficial. El producto obtenido en este trabajo disminuyó la tensión superficial del agua desde 72.06 mN/m hasta 37.31 mN/m, empleando 37.5 ppm del BS.

En una segunda etapa se probó el uso de CL para la producción de biosurfactantes. Se utilizó el mismo medio de cultivo empleado en el sistema de cultivo sólido y aceite de soya como inductor para la síntesis de ramnolípidos. Las unidades experimentales se incubaron durante 12 días a 30°C y 200 rpm. Los análisis realizados por CCF, HPLC-ELSD y FTIR a los productos obtenidos confirmaron que *B. plantarii* produce especies con actividad tensoactiva cuando esta crece en glicerol-sulfato de amonio-aceite de soya. Las especies obtenidas reducen la tensión superficial (37.59 mN/m) del agua y cumple con la descripción establecida en la fracción arancelaria para los surfactantes. Incluso, esta reducción de la tensión superficial se logró empleando concentraciones mucho menores de las reportadas en la literatura; hasta cinco veces menos. Asimismo, se plantea el modelamiento matemático de la reducción en tensión superficial, como una metodología que permite comparar el desempeño del BS con diferentes reportes de la literatura.

Las concentraciones de biosurfactantes obtenidas en este trabajo son bajas. Sin embargo, su actividad tensoactiva a concentraciones muy pequeñas hace esta metodología de producción una alternativa sustentable atractiva. Se plantea el modelamiento matemático de la reducción en tensión superficial, como una metodología objetiva y novedosa que permite comparar el desempeño del BS con diferentes reportes de la literatura y no se ha aplicado a esta problemática.

En este trabajo se presenta evidencia experimental objetiva que señala el potencial de la producción de ramnolípidos por cultivo en medio sólido.

Contenido

Resumen	v
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xiv
Glosario de abreviaturas.....	xvi
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1 Los surfactantes	3
2.2 Los biosurfactantes.....	4
2.2.1 Clasificación de los biosurfactantes	5
2.2.2 Aplicaciones de los biosurfactantes	5
2.2.3 Glicolípidos: Clasificación y generalidades	7
2.3 Los ramnolípidos (RL).....	12
2.3.1 Síntesis de ramnolípidos	15
2.3.2 Condiciones de cultivo para la producción de ramnolípidos.....	17
2.4 Producción de ramnolípidos por procesos fermentativos	18
2.4.1 Cultivo en medio líquido	18
2.4.2 Cultivo en medio sólido	18
2.5 Extracción y purificación de ramnolípidos.....	22
2.6 Análisis cualitativos, cuantitativos y caracterización del biosurfactante	23
2.6.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	23
2.6.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	25
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29

Objetivo general.....	29
Objetivos particulares	29
6. Materiales y métodos	30
6.1 Microorganismos: Conservación y condiciones de cultivo	30
6.2 Cultivo en medio sólido.....	30
6.3 Cultivo en medio líquido.....	32
6.4 Recuperación de producto (BS) del CMS	32
6.4.1 Cuantificación del extracto crudo de BS.....	32
6.5.1 Respirimetría	33
6.5.2 Análisis de humedad y pH	34
6.5.3 Cromatografía en capa fina	34
6.5 Métodos analíticos	34
6.5.4 Análisis por HPLC-ELSD	34
6.5.5 Tensión superficial	35
6.6 Expresión de resultados	35
6.6.1 Cuantificación del producto obtenido en CMS	35
6.6.2 Modelado de la tensión superficial	36
7. Resultados y discusión.....	37
7.1 Análisis del crecimiento de <i>B. plantarii</i> y <i>S. rubidaea</i> en CMS por respirometría CO ₂	37
7.2 Caracterización por HPLC-ELSD y cuantificación del biosurfactante producido en CMS	42
7.3 Conclusiones del crecimiento y producción de biosurfactantes.....	48
7.4 Análisis de los resultados de cromatografía en capa fina	50
7.5 Conclusiones del análisis de cromatografía en capa fina	56
7.6 Caracterización por espectroscopia infrarroja (FTIR)	57

7.7 Conclusiones de la caracterización por espectroscopia infrarroja	62
7.8 Determinación de la tensión superficial	63
7.9 Conclusiones de la determinación de la tensión superficial.....	67
7.9 Producción de BS en cultivo líquido	68
7.10 Comparación de sistemas de cultivo	78
7.11 Conclusiones de la producción de BS en sistema de cultivo líquido y comparación entre CL y CMS.....	89
8. Conclusiones y perspectivas.....	91
9. Referencias.....	94
ANEXOS.....	100
A1. Cinética de crecimiento	100
A2. Análisis por HPLC-ELSD.....	101
A3. Factores de retención- CCF	104
A4. Caracterización por FTIR de los productos obtenidos en CMS.....	109
A.5 Modelamiento de la tensión superficial.....	113
A6. Determinación de pH y humedad	114

Índice de Figuras

Figura 2.1 Estructura básica general de los cuatro tipos de glicolípidos, <i>n</i> se refiere a la longitud de la cadena lipídica, <i>R</i> puede ser un átomo de H o grupo acetilo (Smyth <i>et al.</i> , 2014).....	8
Figura 2.2 Estructuras químicas generales de ramnolípidos. Los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> típicamente contienen ácidos grasos con longitudes de cadena entre C ₈ y C ₁₄ (n = 1-7), mientras que los organismos del género <i>Burkholderia</i> producen ramnolípidos con cadenas de alquilo más largas y longitudes típicas entre C ₁₂ y C ₁₆ (n = 5-9), Wittgens <i>et al.</i> , 2017.	13
Figura 2.3 Ruta biosintética de <i>P. putida</i> para la síntesis de ramnolípidos (tomado de Wittgens <i>et al.</i> , 2011).	15
Figura 7.1 Tasas de producción de CO ₂ , de <i>B. plantarii</i> (Bp) y <i>S. rubidaea</i> (Sr) durante CMS usando aceite de soya en combinación con glicerol (triángulos) o glucosa (círculos) y sulfato de amonio (marcador vacío) o nitrato de sodio (marcador relleno) como fuentes de nitrógeno.	38
Figura 7.2 Producción de CO ₂ obtenidas por <i>B. plantarii</i> (Bp) y <i>S. rubidaea</i> (Sr) en CMS usando aceite de soya en combinación con glicerol (triángulos) o glucosa (círculos) y sulfato de amonio (marcador vacío) o nitrato de sodio (marcador relleno) como fuentes de nitrógeno. 40	
Figura 7.3 Cromatograma HPLC-ELSD de los estándares de Mono (a) y Di-RL (b) con 98% de pureza, el pico A corresponde a Rha, B es un Di-RL y C es un Mono-RL.....	42
Figura 7.4 Cromatograma del análisis por HPLC-ELSD del estándar de RL con 90% de pureza, A es ramnosa, B es Di-RL y C es Mono-RL.....	43
Figura 7.5 Cromatograma de los extractos de aserrín recuperados con AcOEt (línea negra) y MeOH (línea amarilla) en comparación con el estándar de RL (R90, línea gris).	44
Figura 7.6 Cromatograma del análisis HPLC-ELSD a los productos de <i>B. plantarii</i> obtenidos en CMS luego de 12 d de cultivo, en medio Gli-NH ₄ ⁺ (a) y medio Gli-NO ₃ ⁻ (b), en línea naranja se muestra tratamiento sin aceite, azul tratamiento con aceite y en gris se muestra el estándar R 90% los productos se recuperaron con AcOEt.	45
Figura 7.7 CCF del RL estándar reveladas con solución de <i>p</i> -anisaldehído (A) y vapores de yodo (B).....	50
Figura 7.8 CCF de los extractos de aserrín obtenidos con AcOEt (2) y MeOH (3), el carril 1 corresponde al estándar de RL R90.	51
Figura 7.9 Cromatografía en capa fina del BS producidos por <i>B. plantarii</i> usando medio Gli-NO ₃ ⁻ y aceite de soya en CMS, revelado con vapores de yodo (a) y solución de <i>p</i> -anisaldehído (b). Las muestras cargadas en cada carril son 1= Estándar de RL R90; extractos recuperados con AcOEt: 2= Extracto de aserrín, extractos a diferentes tiempos de muestreo 3= 0d, 4= 6d, 5= 12d.	52
Figura 7.10 CCF de los BS producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS usando el medio Gli-NO ₃ ⁻ con y sin aceite de soya, las muestras en cada carril son: 1= Estándar de RL R90, 2= Extracto orgánico de aserrín, los carriles 3,4 y 5 corresponden a los productos de los 0, 6 y 12 días de cultivo, los productos se recuperaron con AcOEt, revelador vapores de yodo.	52
Figura 7.11 Espectro FTIR del estándar de ramnolípidos sintetizado por <i>P. aeruginosa</i> con 90% de pureza, Agae Technologies®.....	57
Figura 7.12 Espectro FTIR del extracto de aserrín recuperado con acetato de etilo.	58
Figura 7.13 Espectro de la resina de pino, obtenido por FTIR, Fuente: University of Tartu, Institute of Chemistry.	59
Figura 7.14 Espectros FTIR del BS producido en CMS por <i>B. plantarii</i> en medio Gli-NO ₃ ⁻ : en ausencia (rosa) y presencia (azul) de aceite de soya, estándar de ramnolípidos- línea verde.	60
Figura 7.15 Gráficas de tensión superficial de los BS producidos en CMS usando aceite de soya como inductor, producidos por <i>B. plantarii</i> (a) y <i>S. rubidaea</i> (b), los triángulos corresponden a glicerol, círculos a glucosa, marcador sin relleno contiene NH ₄ ⁺ y con relleno NO ₃ ⁻ como fuente de nitrógeno, las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto; el rombo corresponde a alícuotas de MeOH.	63

Figura 7.16 Cromatogramas de los BS producidos por <i>B. plantarii</i> (a-glicerol, c-glucosa) y <i>S. rubidaea</i> (b-glicerol, d-glucosa) en cultivo líquido con aceite de soya, la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se distingue por línea negra-NH ₄ ⁺ y línea azul-NO ₃ ⁻	70
Figura 7. 17 Espectro FTIR de los productos de <i>B. plantarii</i> obtenidos por cultivo líquido utilizando aceite de soya en combinación con medio Gli-NH ₄ ⁺ (a), Gli-NO ₃ ⁻ (b).	73
Figura 7.18 Espectro FTIR de los productos de <i>B. plantarii</i> obtenidos por cultivo líquido utilizando aceite de soya en combinación con medio Glu-NH ₄ ⁺ (c), Glu-NO ₃ ⁻ (d)	74
Figura 7. 19 Espectros FTIR de los productos de <i>S. rubidaea</i> al crecer durante 12 días en un sistema líquido con medio Gli-NH ₄ ⁺ (a), Gli-NO ₃ ⁻ (b).	75
Figura 7.20 Espectros FTIR de los productos de <i>S. rubidaea</i> al crecer durante 12 días en un sistema líquido con medio Glu-NH ₄ ⁺ (c), Glu-NO ₃ ⁻ (d) adicionados con aceite de soya.	76
Figura 7.21 Perfil de tensión superficial del BS de <i>B. plantarii</i> producido en medio Gli-NH ₄ ⁺ usando sistema de cultivo líquido (triángulos vacíos) y estándar de RL R90 (cuadrados rellenos), el marcador en cruz representa el equivalente al estándar a 100% de pureza, las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo matemático propuesto.	77
Figura 7. 22 Cromatogramas de los RL producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS (negro) y CL (azul), T1: Gli-H ₄ ⁺ ; T3: Gli-NO ₃ ⁻ ; T5: Glu-NH ₄ ⁺ ; T7: Glu-NO ₃ ⁻	80
Figura 7. 23 Cromatogramas de los RL producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS (negro) y CL (azul), T1: Gli-H ₄ ⁺ ; T3: Gli-NO ₃ ⁻ ; T5: Glu-NH ₄ ⁺ ; T7: Glu-NO ₃ ⁻	81
Figura 7. 24 Comparativa producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Gli-NH ₄ ⁺ (a) y Gli-NO ₃ ⁻ (b).	85
Figura 7. 25 Comparativa producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Glu-NH ₄ ⁺ (a) y Glu-NO ₃ ⁻ (b).	86
Figura 7. 26 Comparativa producidos por <i>S. rubidaea</i> en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Gli-NH ₄ ⁺ (a) y Gli-NO ₃ ⁻ (b).	87
Figura 7. 27 Comparativa producidos por <i>S. rubidaea</i> en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Glu-NH ₄ ⁺ (a) y Glu-NO ₃ ⁻ (b).	88
Figura A.1 Cinética de crecimiento en cultivo líquido para <i>S. rubidaea</i> y <i>B. plantarii</i> expresado en unidades de densidad óptica	100
Figura A.2 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 d de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS <i>B. plantarii</i> usando medio Glu-NH ₄ ⁺ (a) y medio Glu-NO ₃ ⁻ (b) mientras que, (e) y (d) corresponden a <i>S. rubidaea</i> . En c y d se muestra el análisis de los productos del medio Gli-NH ₄ ⁺ y Gli-NO ₃ ⁻ sintetizados por <i>S. rubidaea</i> , la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%; los productos se recuperaron con AcOEt.	101
Figura A.3 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 días de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS <i>B. plantarii</i> usando los medios Gli-NH ₄ ⁺ (a), Gli-NO ₃ ⁻ (b), Glu-NH ₄ ⁺ (c), Glu-NO ₃ ⁻ (d); solvente de extracción: MeOH, la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%.	102
Figura A.4 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 días de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS <i>S. rubidaea</i> usando los medios Gli-NH ₄ ⁺ (a), Gli-NO ₃ ⁻ (b), Glu-NH ₄ ⁺ (c), Glu-NO ₃ ⁻ (d), productos recuperados con MeOH, la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%.	103
Figura A.5 Espectros FTIR de los extractos recuperados con AcOEt luego de 12 d de cultivo creciendo en presencia de aceite de soya, T1: <i>B. plantarii</i> Gli-NH ₄ ⁺ ; T2: <i>S. rubidaea</i> Gli-NH ₄ ⁺ ; T3: <i>B. plantarii</i> , Gli-NO ₃ ⁻ ; T4: <i>S. rubidaea</i> Gli-NO ₃ ⁻ ; T5: <i>B. plantarii</i> Glu-NH ₄ ⁺ ; T6: <i>S. rubidaea</i> Glu-NH ₄ ⁺ ; T7: <i>B. plantarii</i> , Glu-NO ₃ ⁻ ; T8: <i>S. rubidaea</i> Glu-NO ₃ ⁻	109
Figura A.6 Espectros FTIR de los extractos recuperados con AcOEt, tratamientos sin aceite de soya luego de 12 días de cultivo, T1: <i>B. plantarii</i> Gli-NH ₄ ⁺ ; T2: <i>S. rubidaea</i> Gli-NH ₄ ⁺ ; T3: <i>B. plantarii</i> , Gli-NO ₃ ⁻ ; T4: <i>S. rubidaea</i> Gli-NO ₃ ⁻ ; T5: <i>B. plantarii</i> Glu-NH ₄ ⁺ ; T6: <i>S. rubidaea</i> Glu-NH ₄ ⁺ ; T7: <i>B. plantarii</i> , Glu-NO ₃ ⁻ ; T8: <i>S. rubidaea</i> Glu-NO ₃ ⁻	110

-
- Figura A.7** Espectros FTIR de los extractos recuperados con MeOH luego de 12 días de cultivo creciendo en presencia de aceite de soya, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃⁻; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃⁻; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃⁻; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃⁻..... 111
- Figura A.8** Espectros FTIR de los extractos recuperados con MeOH, tratamientos sin aceite luego de 12 días de cultivo, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃⁻; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃⁻; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃⁻; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃⁻. 112
- Figura A.9** Cambio de la tensión superficial usando los productos del CMS, los triángulos corresponden a glicerol, círculos a glucosa, marcador sin relleno contiene NH₄⁺ y con relleno NO₃⁻ en (a) *B. plantarii* y (b) *S. rubidaea* sin aceite recuperados con AcOEt; en (c) y (d) están los productos de los tratamientos con aceite recuperados con MeOH para *B. plantarii* y *S. rubidaea* respectivamente, mientras que (e) y (f) corresponden a los productos del tratamiento sin aceite recuperados con MeOH..... 113

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Escala de Griffin para balance hidrofílico lipofílico (tomado de Griffin, 1954).....	4
Tabla 2.2 Clasificación de los biosurfactantes, modificada de Silva <i>et al.</i> , 2014.	5
Tabla 2.3 Producción de biosurfactantes por diferentes microorganismos y sustratos.	9
Tabla 2.4 Producción de ramnolípidos por diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> (patógeno oportunista) en diferentes sistemas de cultivo.....	20
Tabla 2.5 Producción de ramnolípidos por microorganismos no patógenos.	21
Tabla 6.1 Diseño factorial para la producción de RL en CMS.....	31
Tabla 6.2 Composición de los medios de cultivo empleados para la producción de BS.	31
Tabla 7.1 Parámetros cinéticos de los CMS calculados por el modelo logístico.	41
Tabla 7.2 Áreas de los picos separados por HPLC-ELSD de los BS producidos por <i>B. plantarii</i> en CMS.	45
Tabla 7.3 Producción de BS (ramnolípidos) en CMS luego de 12 días de incubación.....	47
Tabla 7.4 Factores de retención del estándar RL.....	50
Tabla 7.5 Factores de retención para el extracto de aserrín.....	51
Tabla 7.6 Resultados del análisis por triplicado en CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> y <i>S. rubidaea</i> en presencia de aceite de soya, recuperados con AcOEt, Revelador empleado: solución de <i>p</i> -anisaldehído.	54
Tabla 7.7 Resultados del análisis por triplicado en CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> y <i>S. rubidaea</i> en presencia de aceite de soya, recuperados con MeOH, Revelador empleado: solución de <i>p</i> -anisaldehído.	54
Tabla 7.8 Análisis de los espectros infrarrojos de los BS producidos por <i>B. plantarii</i> en medio Gli-NO ₃ ⁻ con y sin aceite comparado con el estándar de RL.	60
Tabla 7.9 Parámetros del modelo no lineal (<i>k</i> y <i>A</i>) estimados por el método de mínimos cuadrados para el cambio de tensión superficial usando los BS producidos en CMS.	65
Tabla 7.10 Comparación de parámetros para datos reportados en la literatura.	67
Tabla 7.11 Producción de BS usando aceite de soya como inductor y cultivo en medio líquido luego de 12 días de incubación.	68
Tabla 7.12 Factores de retención para los BS producidos luego de 12 días de cultivo en medio líquido por <i>B. plantarii</i> y <i>S. rubidaea</i>	69
Tabla 7.13 Análisis por HPLC-ELSD: BS producidos por <i>B. plantarii</i> en cultivo líquido.	71
Tabla 7.14 Análisis HPLC-ELSD: productos de <i>S. rubidaea</i> obtenidos en cultivo líquido, tiempos de retención y áreas relativas.	71
Tabla 7.15 Análisis de la tensión superficial de los BS producido en cultivo líquido	77
Tabla 7.16 Producción de BS en CMS y CL.....	78
Tabla 7. 17 Resumen de las bandas de absorción presentes en los extractos recuperados con AcOEt del CMS y CL con <i>B. plantarii</i>	83
Tabla 7. 18 Resumen de las bandas de absorción presentes en los extractos recuperados con AcOEt del CMS y CL con <i>S. rubidaea</i>	84
Tabla 7. 19 Cambio en la tensión superficial del agua con los extractos recuperados del CMS y CL.	89
Tabla A.1 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> en presencia de aceite de soya, producto extraído con AcOEt.....	104
Tabla A.2 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> sin aceite, solvente de extracción: AcOEt.	105
Tabla A.3 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> en presencia de aceite de soya, producto extraído con MeOH.....	105
Tabla A.4 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por <i>B. plantarii</i> sin aceite, solvente de extracción: MeOH.	106
Tabla A.5 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por <i>S. rubidaea</i> en presencia de aceite de soya, producto extraído con AcOEt.....	106

Tabla A.6 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* sin aceite, solvente de extracción: AcOEt. 107

Tabla A.7 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* en presencia de aceite de soya, producto extraído con MeOH..... 107

Tabla A.8 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* sin aceite, solvente de extracción: MeOH. 108

Tabla A.9 Medición de pH del cultivo en medio sólido y líquido. 114

Tabla A.10 Humedad (%) de los cultivos en medio sólido al inicio y final del tiempo de incubación. 115

Glosario de abreviaturas

%E24	Índice de emulsificación
AcOEt	Acetato de etilo
CL	Cultivo en medio líquido
CMS	Cultivo en medio sólido
Di-RL	Diramnlípido
ESI-MS	Espectrometría de masas por ionización con electroaspersión
Gli	Glicerol
Glu	Glucosa
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a masas
LC-QToF-MS	Cromatografía líquida de cuádruplo de tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por desorción/ ionización láser asistida por matriz-con analizador de tiempo de vuelo
MeOH	Metanol
MH	Materia húmeda
Mono-RL	Monoramnlípido
MS	Materia seca
RMN	Resonancia magnética nuclear
R 90%	Estándar de ramnlípido, 90% de pureza
Rha	Ramnosa
RL	Ramnlípidos
RmLA	glucosa-1-fosfato timidil transferasa
RmLB	dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa
RmLC	6-desoxi-D-xilo-4-hexosa 3,5-epimerasa
RmLD	dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexosa reductasa
SI	Solución de impregnación
UPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas

1. Introducción

Los surfactantes son moléculas muy versátiles de la industria química, están presentes en diversos productos que empleamos a diario, por ejemplo, en el aceite del motor de los vehículos, en productos farmacéuticos, en detergentes y diversos productos de limpieza.

La estructura molecular de los surfactantes se caracteriza por poseer una fracción hidrofílica y otra hidrofóbica, son moléculas que reducen la tensión superficial entre sistemas líquido-líquido, líquido- sólido y líquido- gas. Estos tienen diversas aplicaciones, en la industria petroquímica se utilizan en la recuperación de petróleo, en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, en productos de limpieza y de higiene personal. Se obtienen mediante procesos de síntesis química partiendo de derivados del petróleo.

Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfifílicas, producidas extracelularmente por levaduras, hongos y bacterias. En los últimos años, los BS han llamado la atención de la investigación industrial y académica debido a sus numerosas ventajas en comparación con los compuestos sintetizados químicamente. Pueden producirse a partir de recursos renovables, son activos en condiciones extremas de pH y temperatura, tienen baja toxicidad, son altamente biodegradables y poseen aceptabilidad ecológica.

Actualmente, la industria química busca incluir procesos limpios y sustentables para la obtención de BS. Esto nos lleva a investigar procesos eficientes y sostenibles que puedan competir con los procesos convencionales.

La producción de biosurfactantes reportada en la literatura mayoritariamente utiliza sistemas de cultivo en medio líquido (CL). Este tipo de cultivo requiere de agitación y aireación forzada, uno de los mayores problemas de este sistema es la formación de espuma que se da cuando el BS es secretado al medio, ésta reduce los procesos fermentativos e incrementa los riesgos de contaminación.

La formación de espuma puede ser tratada con antiespumantes que se vuelven un contaminante para la recuperación de BS, además de que resultan tóxicos para los microorganismos.

Por su parte el cultivo en medio sólido (CMS) para la producción de BS ofrece una alternativa a las problemáticas del CL. Este tipo de cultivo permite el aprovechamiento de residuos agroindustriales como los de la obtención de aceites vegetales.

Este trabajo de investigación estuvo orientado a la producción de ramnolípidos con microorganismos no patógenos como lo son *Burkholderia plantarii* y *Serratia rubidaea*. Asimismo, implica una comparación de los dos sistemas de producción: cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

Este informe se organizó de una manera clásica, la revisión bibliográfica presenta un análisis de los avances más relevantes de la producción de ramnolípidos por los dos sistemas fermentativos señalados. Las técnicas analíticas, forman una parte importantes de este capítulo, así como la estrategia empleada para expresión de resultados. Estos se presentan y discuten en un capítulo, para terminar la tesis con sus conclusiones y referencias, así como información complementaria contenida en los anexos.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Los surfactantes

A las moléculas que poseen la capacidad de modificar la tensión superficial e interfacial se les denomina surfactantes. Este nombre se deriva del inglés SURFace ACTive AgeNTS. Los surfactantes son moléculas anfipáticas que se componen de una porción hidrofóbica no polar, generalmente una cadena hidrocarbonada, lineal o ramificada que contiene de 8 a 18 átomos de carbono, la cual está unida a una porción polar iónica (hidrófila). Son derivados de fuentes oleoquímicas o petroquímicas y se clasifican por la naturaleza de la fracción hidrofílica, donde encontramos surfactantes aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos (Tadros, 2014).

Los surfactantes también pueden ser clasificados por su origen: surfactantes sintéticos y biosurfactantes. En este sentido los surfactantes sintéticos son producidos mediante síntesis química, mientras que los biosurfactantes se obtienen por procesos biológicos realizados por diferentes microorganismos (Pornsunthorntaweew *et al.*, 2008). La actividad de los surfactantes puede ser emulsificante, dispersante o agente espumante y su efectividad está determinada por su capacidad para reducir la tensión superficial (De *et al.*, 2015).

El valor del balance hidrofílico - lipofílico (HLB) puede predecir las propiedades del surfactante con base en la estructura de la molécula. Este parámetro consta del cálculo de diferentes regiones de la molécula, como lo describió Griffin en 1954, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$HLB = 20 \times \left(\frac{MW_{HP}}{MW_{SA}} \right)$$

Donde MW_{HP} se refiere al peso molecular de la parte hidrofílica de la molécula mientras que MW_{SA} se refiere al peso molecular de todo el agente tensoactivo:

Tabla 2.1 Escala de Griffin para balance hidrofílico lipofílico (tomado de Griffin, 1954).

Valor HLB	Propiedad
0 -- 3	Agente antiespumante
4 -- 6	Emulsión agua en aceite
7 -- 9	Agente humectante
8 -- 18	Emulsión aceite en agua
13 -- 15	Detergente
10 -- 18	Solubilizantes o hidrótopos

2.2 Los biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son moléculas sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos, la mayoría son productos extracelulares. Una parte de la molécula es hidrofílica, como los aminoácidos, los péptidos o los carbohidratos y la otra parte es hidrofóbica que regularmente está constituida por ácidos grasos saturados o insaturados (Jiménez *et al.*, 2010). Son metabolitos secundarios producidos en la fase estacionaria del crecimiento (Varjani y Upasani, 2017.) Muchos procesos de la vida requieren la presencia de sustancias anfífilas, por ejemplo, los fosfolípidos. Los BS pueden ser secretados o permanecer en la pared celular, con la finalidad de disminuir la tensión superficial y utilizar los sustratos hidrofóbicos para el crecimiento microbiano y producción de BS (Hausmann y Syldakt, 2015).

Los BS se obtienen mediante procesos de fermentación utilizando residuos agroindustriales como los derivados de aceites vegetales (maíz, ricino, girasol, olivo, canola, soya y palma), suero de leche y glicerol, entre otros. Estos compuestos presentan baja toxicidad, alta biodegradabilidad, mayor compatibilidad con el ambiente y actividad estable en condiciones extremas de pH, fuerza iónica y temperatura (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008; Mulligan, 2005).

Los BS reducen la tensión superficial, la concentración crítica micelar (CMC) y la tensión interfacial entre sistemas líquido-líquido, líquido-sólido, líquido-gas (Marchant y Banat, 2012). Emplean los mismos mecanismos que los surfactantes sintéticos: emulsionan, dispersan, solubilizan y algunos actúan como agentes humectantes o espumantes.

La diversidad de estas moléculas les confiere distintas aplicaciones dentro de las industrias farmacéutica, alimentaria, cosmética, agrícola y petrolera (Varjani

y Upasani, 2017). Presentan una alternativa a los surfactantes sintéticos gracias a sus propiedades fisicoquímicas, diversidad estructural y selectividad.

2.2.1 Clasificación de los biosurfactantes

Los BS pueden agruparse en dos clases los de bajo peso molecular conocidos como biosurfactantes y los de alto peso molecular (mayores a 10 kDa) conocidos como bioemulsificantes (lipopolisacáridos o lipoproteínas) (Varjani y Upasani, 2017), por su estructura química los BS pueden clasificarse en cinco grupos principales como lo reportaron Silva *et al.*, 2014. En la Tabla 2.2 se muestra la clasificación de los BS con base en su peso molecular y estructura química, además de que se incluyen las clases para cada tipo de BS.

Tabla 2.2 Clasificación de los biosurfactantes, modificada de Silva *et al.*, 2014.

Agente surfactante	Biosurfactantes	Clase
Bajo peso molecular	Glicolípidos	Ramnolípidos Sofrolípidos Trehalolípidos
	Lipopéptidos	Lípidos de manosil-eritritol Surfactina Viscosina
	Fosfolípidos	Lipopéptidos Ácidos grasos Lípidos neutros Fosfolípidos
Alto peso molecular	Surfactantes poliméricos	Polisacáridos, proteínas lipopolisacáridos, lipoproteínas, (Emulsan, biodispersan, liposan)
	Partículas surfactantes	Vesículas y fimbrias

Cada grupo de biosurfactantes presenta propiedades fisicoquímicas distintas y funciones fisiológicas específicas en los microorganismos productores.

2.2.2 Aplicaciones de los biosurfactantes

En nuestra vida cotidiana, utilizamos productos que contienen surfactantes, por ejemplo, champú, cremas cosméticas, jabones, etc. Las diversas propiedades de los biosurfactantes hacen que su interés se haya incrementado para diversas aplicaciones industriales. Actualmente el ramo industrial busca poder reemplazar algunos surfactantes sintéticos por sustancias que tengan el mismo desempeño

pero que sean de origen natural y amigables con el medio ambiente (Marchant y Banat, 2012).

Su baja toxicidad, alta biodegradabilidad, biocompatibilidad y el desempeño óptimo de los BS en altas temperaturas y en ambientes adversos son razones que los convierten en alternativas potenciales. Algunos BS muestran actividad biológica, por lo que se emplean en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Otros tienen aplicaciones ambientales como la biorremediación, la dispersión de hidrocarburos en derrames de petróleo; también pueden emplearse en la extracción de petróleo crudo (Saharan *et al.*, 2011).

Los BS pueden ser utilizados para desemulsificar el petróleo crudo, en la síntesis de nuevos polímeros, como aditivos de cosméticos y en la síntesis de bioplásticos. Sin embargo, el uso de BS en estas aplicaciones actualmente está limitado por los costos de producción, que son muy altos en comparación de los de los surfactantes sintéticos.

Existen empresas que comercializan productos que contienen biosurfactantes. La empresa Kao Co. Ltd. (<https://www.kao.com/global/en/> fecha de consulta: 19 de marzo 2019) comercializa productos cosméticos que contienen soforolípidos (Bioré, jabón para la limpieza del rostro); Sopholiance S es comercializado por la compañía francesa Soliance (<https://www.givaudan.com> fecha de consulta: 19 de marzo 2019) y lo emplean como ingrediente en formulaciones de desodorantes, limpiadores faciales, geles de ducha, desmaquillantes y en tratamientos para el acné.

Los ramnolípidos también son ampliamente utilizados en diversas formulaciones, la empresa NATSURFACT (<https://natsurfact.com/> fecha de consulta: 19 de marzo 2019) comercializa ramnolípidos con distintos grados de pureza y que pueden emplearse en formulaciones de productos para el cuidado e higiene personal, biorremediación, agricultura, tratamientos de agua residuales y limpiadores industriales, entre otros.

Z bioscience (<http://zbioscience.com/> fecha de consulta: 19 de marzo 2019) comercializa limpiadores concentrados que contiene biosurfactantes (ALL SURFACE PLUS CLEANER) y están diseñados para utilizarse en aplicaciones

agrícolas. HTS BIO tiene una línea de productos para la limpieza profesional (ECOBASE®), que contiene biosurfactantes no especificados.

Akshay Intensive Marketing empresa de la India comercializa “Acticlean” una formulación que contiene biosurfactantes mezclados con saponinas que incrementan la actividad surfactante, actúa como un modificador y control espumante, emulsificante o dispersante, puede ser utilizado para la remoción de hidrocarburos o grasas.

Algunas otras empresas que ya comercializan productos con biosurfactantes son BioFuture Ltd (Irlanda, desde 1999), EchoChem (Canadá, desde 2013), Jeneil Biosurfactant Company, LTC (USA, desde 1995) y AGAE Technologies (USA, desde 2010) (Reis *et al.*, 2013).

2.2.3 Glicolípidos: Clasificación y generalidades

Los glicolípidos están formados por una unidad de carbohidrato y otra de ácido graso, el contenido de mono u oligosacáridos ligados a una cadena larga de un ácido graso alifático o hidroxialifático es la base para su clasificación, así se subdividen en cuatro grupos importantes: ramnolípidos, soforolípidos, trehalolípidos y lípidos de manosil-eritritol. El sacárido puede ser ramnosa, soforosa, trehalosa o manosa (Smyth *et al.*, 2014). En la Figura 2.1 se muestra la estructura general de los glicolípidos.

Los glicolípidos son reconocidos por su gran estabilidad y buen desempeño tanto en condiciones suaves como en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. El costo de los materiales para la producción de glicolípidos representa un 10-30% de los costos totales (Radzuan *et al.*, 2017). Pueden ser producidos utilizando materiales económicos que están disponibles en grandes cantidades como los residuos industriales y bioproductos oleosos, incluyendo hidrocarburos, aceites utilizado en la preparación de alimentos, residuos de extracción de aceite de olivo u otras semillas, entre otros sustratos.

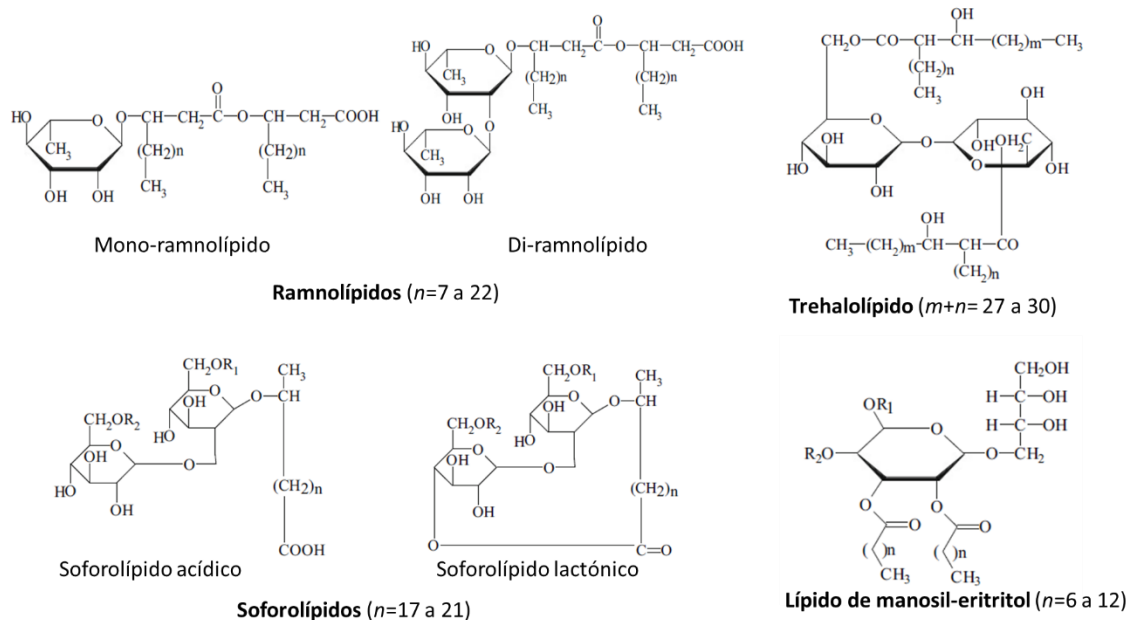


Figura 2.1 Estructura básica general de los cuatro tipos de glicolípidos, n se refiere a la longitud de la cadena lipídica, R puede ser un átomo de H o grupo acetilo (Smyth *et al.*, 2014).

En la industria alimentaria hay una gran cantidad de subproductos que se desechan. Como resultado del alto contenido de carbohidratos, grasas, aceites y otros nutrientes, estos residuos han generado gran interés para su uso en la fabricación de moléculas (BS) con alto valor agregado a un costo de producción menor (Mnif y Ghribi, 2016).

En la Tabla 2.3 se muestra la producción de glicolípidos por diferentes microorganismos y diversos sustratos además de los sistemas de cultivo empleados. Por otra parte, el control de pH y temperatura son factores que influyen en la producción de BS y son factores específicos para cada microorganismo.

Destaca el uso de bacterias *P. aeruginosa*, *B. plantarii*, *P. fluorescens*, para la producción de ramnolípidos con concentraciones menores a 10 g/L. Para la producción de soforolípidos destaca el uso de la levadura *Starmerella bombicola* (antes *Candida bombicola*), hay un trabajo del 2005 donde se reporta una producción de hasta 400 g/L, reportes más recientes indican concentraciones menores a 100 g/L; y las bacterias *Micrococcus* y *Rhodococcus* para la producción de trehalolípidos en concentraciones cercanas a 1 g/L.

Tabla 2.3 Producción de biosurfactantes por diferentes microorganismos y sustratos.

Tipo de biosurfactante	Sustrato	Microorganismo	Producción (gL ⁻¹)	Tensión superficial (mN/ m)	Referencia
Ramnolípidos	Glicerol	<i>Pseudomona</i> sp DSM2874	15	No reportado	Syldatk <i>et al.</i> , 1985.
	Suero de leche y desechos de destilación	<i>P. aeruginosa</i> BS2	0.92	No reportado	Babu <i>et al.</i> , 1996.
	Aceite de olivo	<i>P. aeruginosa</i> NCIB 40044	1.4	34.0	Haba <i>et al.</i> , 2000.
	Residuos de aceite de soya refinado	<i>P. aeruginosa</i> AT10	9.5	26.8	Ábalos <i>et al.</i> , 2001.
	Aceite de nuez brasileña o maracuyá	<i>P. aeruginosa</i> LBI	9.9 / 9.2	29.8 / 31.5	Costa <i>et al.</i> , 2006.
	Bagazo de caña/Salvado de maíz/Glicerol/ Aceite de Soya	<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	46	No reportado	Camilios- Neto <i>et al.</i> , 2011.
	Aceite de soya o girasol	<i>P. aeruginosa</i> DS10-129	4.3/ 3.0	No reportado	Bondarenko <i>et al.</i> , 2010.
	Glucosa/Caldo nutritivo	<i>B. plantarii</i> DSM9509	0.046	29.4 (a 25°C)	Hörmann <i>et al.</i> , 2010.
	Glucosa	<i>P. fluorescens</i> MFS03	8.76	No reportado	Govindammal, 2014.
Destilado de aceite palma	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.43	29.0	Radzuan <i>et al.</i> , 2017.	

Tabla 2.3 (continuación) Producción de biosurfactantes por diferentes microorganismos y sustratos.

Tipo de biosurfactante	Sustrato	Microorganismo	Producción (g^L⁻¹)	Tensión superficial (mN/ m)	Referencia
Soforolípidos	Melaza del bagazo de caña con aceite de soya	<i>Candida bombicola</i>	45	No reportado	Daverey <i>et al.</i> , 2010.
	Aceite de maíz Turco	<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	400	No reportado	Pekin <i>et al.</i> , 2005.
	Glucosa	<i>C. lipolytica</i> IA 1055	No reportado		Sarubbo <i>et al.</i> , 2001.
	Glucosa- Tapis (petróleo de Malasia)	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	26	36.0	Shah <i>et al.</i> , 2017.
	Aceite de soya-glucosa	<i>Candida sp.</i> SY16	95	30.0	Kim <i>et al.</i> , 2006.
Lípidos de manosil-eritrol	Aceite de olivo	<i>Pseudozyma parantarctica</i> JCM 11752 ^T	No reportado	23.7 (a 25°C)	Morita <i>et al.</i> , 2012.
	Glucosa- aceite de olivo	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> SY62	91.6	29.7 (a 25°C)	Kanishi y Makino, 2018.
	Glucosa- aceite de colza	<i>Pseudozyma aphidis</i> MUCL 27852	69	No reportado	Goossens <i>et al.</i> , 2016.
	n-hexadecano	<i>Micrococcus luteus</i> BN56	No reportado	24.1	Tuleva <i>et al.</i> , 2009.
Trehalolípidos	Glucosa-hexadecano	<i>Rhodococcus sp.</i>	1.36	No reportado	Bages <i>et al.</i> , 2018.

Burkholderia (antes *Pseudomonas*) *plantarii* ATCC 49704 causa una enfermedad en las plántulas de arroz, se le conoce como Tinzón bacteriano del arroz (las partes aéreas de la plántula comienzan a marchitarse, se vuelven de color marrón rojizo y se secan), se obtuvo de las lesiones y del suelo del lecho. Es una bacteria gram negativa, aerobia, no formadora de esporas, no presenta cápsula, su forma es alargada (mide 0.7 a 1.0 por 1.4 a 1.9 μm) posee uno a tres flagelos polares que le confieren movilidad. Las colonias son translúcidas, brillantes, convexas y redondas, con bordes completos y superficie lisa con un ligero tinte amarillo. Acumula poli- β -hidroxibutirato, En presencia de glucosa y glicerol no produce gas (Azegami *et al.*, 1987).

Serratia rubidaea ATCC 27593 (cepa tipo) es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, fue aislada de fuentes humanas (sangre, garganta, esputo, pus de la cavidad pleural, entre otros), presenta flagelos que le confieren motilidad. En presencia de glucosa y glicerol produce ácido. Forma vesículas extracelulares rosas (“prodigiosina”, diámetro de 0.2 a 2.0 μm) (Ewing *et al.*, 1973). Matsumaya *et al.* (1990) reseñaron que *S. rubidaea* produce exolípidos con actividad tensoactiva, llamados Rubiwettin R1 y RG1, la estructura general de R1 no ha sido elucidada por completo mientras que, RG1 se identificó como un β -D-glucopiranosil 3-(3'-hidroxitetradecanoiloxi) decanoato en el que la ramnosa es sustituida por glucosa. Además, en este reporte se demostró que la producción los metabolitos secundarios (prodigiosina y Rubewettin R1 y RG1) es dependiente de la temperatura.

Las especies de género *Serratia* son capaces de producir un pigmento rojo no difusible, prodigiosina, un metabolito secundario. Este género ha sido reportado como productor de BS, lipolpéptidos y glicolípidos. El glicolípido producido modifica la hidrofobicidad de la superficie celular, juega un papel importante en la adhesión de bacterias, muestra actividad disruptiva y antiadhesiva de las biopelículas contra cepas bacterianas y fúngicas (Clements *et al.*, 2019).

Hay pocos reportes en la literatura especializada que empleen las cepas ATCC 49704 y ATCC 27593

2.3 Los ramnolípidos (RL)

Los ramnolípidos (RL) están constituidos por mono y disacáridos de ramnosa (Rha) unidos por un enlace glicosídico a una molécula de β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato. Dependiendo del número de unidades de ramnosa existen Mono ramnolípidos (Mono-RL) o Di-ramnolípidos (Di-RL), el número de unidades de ácido graso crea sub-especies de mono y Di-RL (Irorere *et al.*, 2017).

En 2010, Abdel-Mawgoud *et al.* publicaron una recopilación de las diversas estructuras (congéneres) de RL producidos por diversas especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Éstos pueden ser Mono-RL con una o dos cadenas de ácido graso, Di-RL con una o dos cadenas de ácido graso, en los cuales la longitud de la cadena y el número de insaturaciones es variable. Se utiliza la nomenclatura $C_{n:1}$ para indicar la cadena de ácido graso con una longitud n y un enlace insaturado, mientras que $C_{n:2}$ indica una cadena de ácido graso con longitud n y dos insaturaciones. Los valores de n reportados van desde $n=8$ hasta $n=18$.

En la Figura 2.2 se muestra la estructura química, además de las especies típicas de RL que contienen una o dos cadenas de ácido graso (Mono-RL-di-lípido y Di-RL-di-lípido), existen especies que contienen solo una cadena de ácido graso (Mono-RL-mono-lípido y Di-RL-mono-lípido).

Diversos autores han reportado que los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* son una mezcla de homólogos diferentes donde el componente predominante es un Mono-RL Rha- C_{10} - C_{10} (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009). Champion (1995) y Zhang (2011) reportaron la obtención de Mono- RL con cadenas de ácidos grasos C_{18} , C_{22} y C_{24} .

Andrä *et al.* (2006) identificaron el Di-RL: Rha-Rha- C_{14} - C_{14} y dos congéneres de este con mono y tri-acilación de un ácido β -hidroxi-tetradecanoico: Rha-Rha- C_{14} y Rha-Rha C_{14} - C_{14} - C_{14} ; Funston *et al.* (2016) encontraron que *B. thailandensis* E264 produce los RL: Rha- C_{12} - C_{12} , Rha- C_{14} - C_{14} , Rha-Rha- C_{14} - C_{14} , Rha-Rha- C_{12} - C_{14} , Rha-Rha- C_{14} - C_{12} .

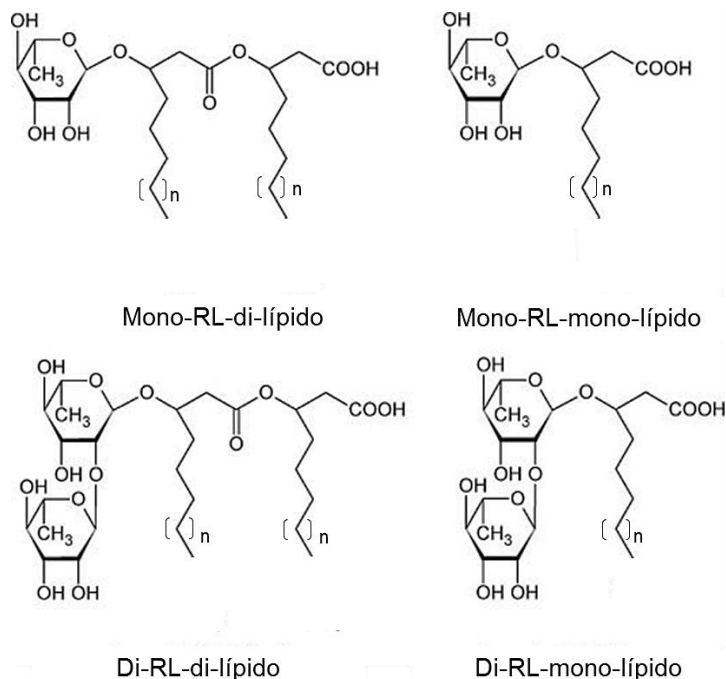


Figura 2.2 Estructuras químicas generales de ramnolípidos. Los ramnolípidos de *P. aeruginosa* típicamente contienen ácidos grasos con longitudes de cadena entre C_8 y C_{14} ($n = 1-7$), mientras que los organismos del género *Burkholderia* producen ramnolípidos con cadenas de alquilo más largas y longitudes típicas entre C_{12} y C_{16} ($n = 5-9$), Wittgens *et al*, 2017.

Los RL son esenciales para el crecimiento de los microorganismos en fuentes de carbono insolubles. Se ha demostrado que la biosíntesis de los precursores para la formación de RL es una síntesis de *nov*o y que son secretados en la fase estacionaria del crecimiento (Hörmann *et al.*, 2010). Los factores que afectan la producción de ramnolípidos pueden dividirse en dos grupos, ambientales y nutricionales. El pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno son factores importantes para el crecimiento del microorganismo, así como la cantidad y calidad de sus productos.

Los RL son responsables de mantener canales libres de células entre macrocolonias durante la formación de biopelículas 3D; se cree que esto permite el flujo de nutrientes a las capas inferiores de la biopelícula cuando la densidad celular aumenta, además, juegan un papel importante en la movilidad de las células (Funston *et al.*, 2016).

Los RL producidos por *P. aeruginosa* son los biosurfactantes más estudiados debido a las aplicaciones potenciales en la industria. Aunque estos BS ya son producidos a nivel industrial, el hecho de que *P. aeruginosa* sea un patógeno

oportunista impone restricciones y condiciones de seguridad de trabajo altas para la producción a gran escala debido al riesgo a la salud (Toribio *et al.*, 2010).

Existe una variedad de géneros de bacterias como: *Burkholderia*, *Acinetobacter* y *Rhodococcus* que han mostrado la capacidad de producir RL al crecer en sustratos hidrofóbicos (Ochsner *et al.*, 1996; Noordman y Janssen, 2002). Diversos autores han reportado el uso de *Burkholderia plantarii* y *Serratia rubidaea* para la producción de ramnolípidos (Hörmann *et al.*, 2010; Matsuyama *et al.*, 1990; Nalini y Parthasarathi, 2014).

De acuerdo con el catálogo de la American Type Culture Collection (ATCC), las cepas de *Serratia rubidaea* (Stapp) ATCC 19278, 19280, 19279, 27593 y de *Burkholderia plantarii* ATCC 49704 están catalogadas como nivel de bioseguridad 1 y podrían ser utilizadas en la producción de ramnolípidos.

Los ramnolípidos homólogos Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ son usualmente predominantes en los productos de *P. aeruginosa* y en menor presencia congéneres que involucran C₈, C₁₀, C₁₂ y C₁₄-3-hidroxi ácidos grasos. La proporción resultante de especies de ramnolípidos depende de muchos parámetros: composición del medio y condiciones de cultivo. La proporción de congéneres determina las propiedades biosurfactantes y se ha reportado que incluso pequeñas diferencias en la composición de la mezcla pueden tener influencia en las propiedades fisicoquímicas (Hošková *et al.*, 2015). Se han reportado más de 50 especies de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Tavares *et al.*, 2013)

Los ramnolípidos son capaces de reducir la tensión superficial del agua, tensión entre agua-aceite y formar micelas a concentración crítica micelar de 50 a 200 mg/L (Li, 2017). Este conjunto de características de los ramnolípidos los hace interesantes para ser estudiados con más profundidad en distintos sistemas de cultivo como el cultivo sumergido y cultivo en medio sólido, como se plantea más adelante en esta tesis.

2.3.1 Síntesis de ramnolípidos

Burger *et al.* (1963) ya había hecho la búsqueda de la ruta biosintética de los RL. Soberón-Chávez *et al.* (2005) y Wittgens *et al.* (2011) mostraron que la biosíntesis de estos biotensoactivos depende de las vías metabólicas centrales, que está muy regulada a nivel transcripcional por la respuesta “*quorum sensing*” y por las condiciones ambientales. La Figura 2.3 muestra la ruta biosintética.

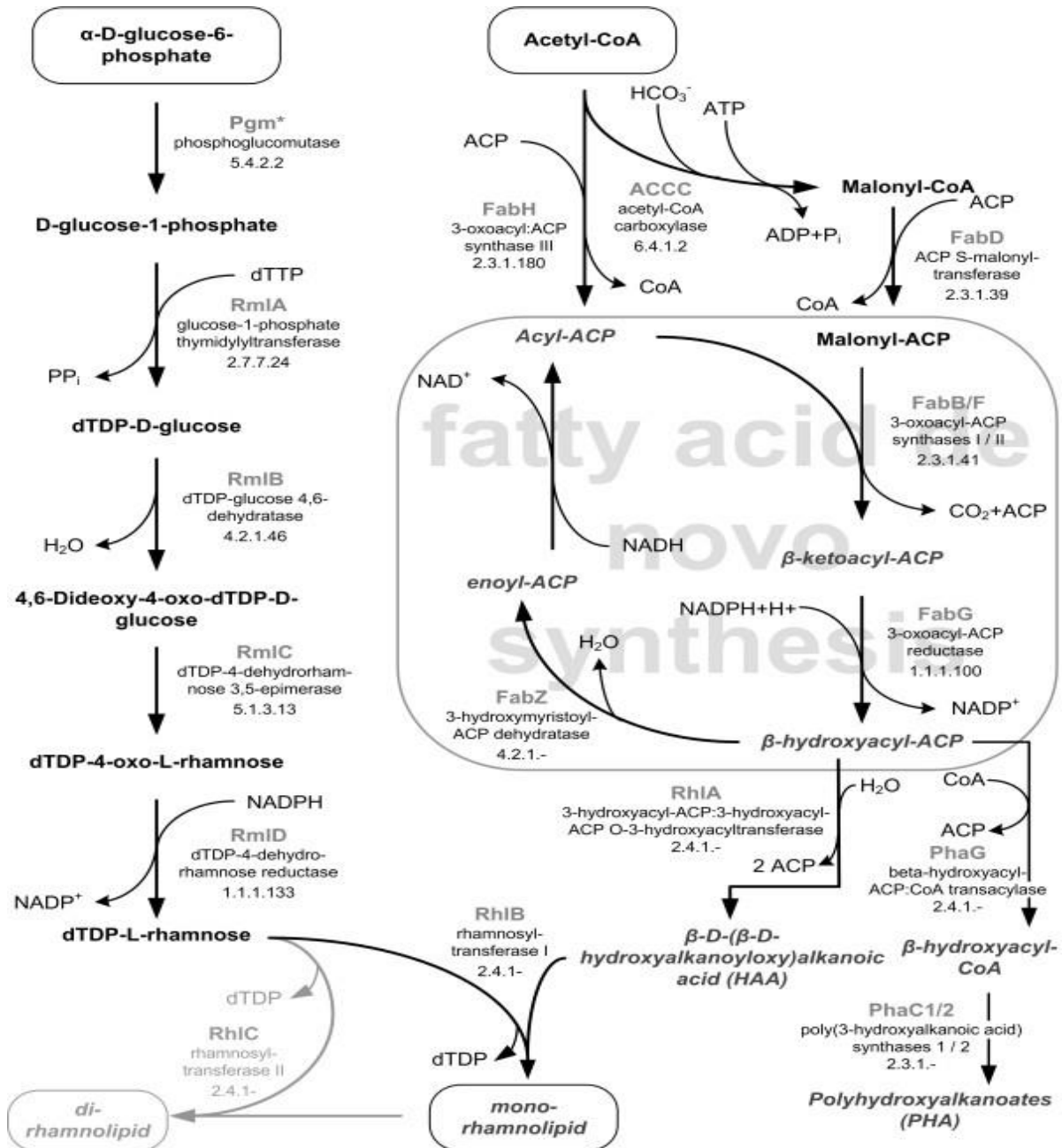


Figura 2.3 Ruta biosintética de *P. putida* para la síntesis de ramnolípidos (tomado de Wittgens *et al.*, 2011).

La síntesis de RL consta por una parte de la síntesis de la fracción hidrofílica (síntesis de ramnosa) y la síntesis de la fracción hidrofóbica (ácido graso). La fracción de ramnosa es sintetizada a partir de glucosa-6-fosfato en cinco reacciones enzimáticas consecutivas. Los β -hidroxi-ácidos grasos a su vez provienen de una síntesis de *novo*, como se observa en la Figura 2.3.

La desoxitimidina difosfato (dTDP)-L-ramnosa es un precursor de L-ramnosa, un azúcar requerido para la virulencia de algunas bacterias patógenas. dTDP-L-ramnosa es sintetizada a partir de glucosa-1-fosfato y desoxitimidina trifosfato (dTTP) mediante una serie de reacciones que involucra 4 diferentes enzimas. *RmlA* (glucosa-1-fosfato timidil transferasa), *RmlB* (dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa), *RmlC* (6-desoxi-D-xilo-4-hexosa 3,5-epimerasa) y *RmlD* (dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexosa reductasa) (Giraud *et al.*, 2000).

La unión de las fracciones del RL consta de tres reacciones enzimáticas específicas. En la primera etapa, dos ácidos grasos β -hidroxilados activados son unidos por *RhlA*, la 3-hidroxi-ACP (proteína portadora del acilo): 3-hidroxiacil-ACP O-3-hidroxiacetil transferasa, a un dímero, llamado 3-(3-hidroxi-alcenoil) alcenoato (HAA). Los Mono- RL son producidos por *RhlB*, la ramnosil transferasa I, por la condensación de HAA y dTDP-L-ramnosa. La ramnosil transferasa II (*RhlC*) añade otra unidad de ramnosa a un Mono-RL resultando un Di-RL (Wittgens *et al.*, 2011).

Hay reportes en la literatura que muestran que los genes (*rhlA*, *rhlB* y *rhlC*) son los responsables de la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*. Dubeau *et al.* (2009) demostraron la presencia de dichos genes en *B. thailandensis* E264 y *B. pseudomonalli* y que los ramnolípidos producidos por ambas bacterias contienen cadenas de ácido graso más largas que las moléculas producidas por *P. aeruginosa*. Además, los ramnolípidos producidos por *B. thailandensis* contienen una proporción mucho mayor de Di-RL que Mono-RL en comparación con los producidos por *P. aeruginosa* y la expresión de los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlC* es continua (Funston *et al.*, 2016).

En *P. aeruginosa* la longitud de la cadena de ácido graso en el RL va de C₈ a C₁₄, pero hay mayor presencia de especies que contienen cadenas de ácido graso C₁₀-C₁₀ tanto en Mono- como Di-RL. En cambio los RL producidos por bacterias del género *Burkholderia* contienen cadenas de ácido graso de mayor longitud C₁₄-C₁₄ (Wittgens *et al.*, 2017).

La regulación “*quorum sensing*” responde a cambios en la población bacteriana, ya que promueve el cambio en la expresión génica en función de la densidad celular. Este sistema regulatorio se basa en la producción baja y constante por cada célula de un compuesto difusible llamado autoinductor, cuando la densidad celular llega al umbral en el que la concentración del autoinductor se ha incrementado lo suficiente, éste interacciona con el activador transcripcional que genera el cambio en la expresión génica (Soberón, 2002). El sistema *quorum sensing* también se activa cuando existen condiciones limitantes de fosfato o nitrógeno (Wittgens *et al.*, 2011).

2.3.2 Condiciones de cultivo para la producción de ramnolípidos

El uso de relaciones C/N y C/P elevadas promueven la producción de ramnolípidos, mientras que, altas concentraciones de iones divalentes, especialmente hierro, son inhibitorios. La producción también es inhibida por la presencia del ion amonio, glutamina, asparagina y arginina (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Las sales de nitrato se han reportado como promotores en la producción de ramnolípidos (Müller *et al.*, 2012). A parte de las limitaciones de fósforo y nitrógeno, la ausencia de iones como Mg²⁺ y Ca²⁺, K¹⁺, Na¹⁺ y sales de elementos traza como son cobre (Cu), cobalto (Co), manganeso (Mn), flúor (F), hierro (Fe), selenio (Se), yodo (I), níquel (Ni), zinc (Zn) y molibdeno (Mo) en ocasiones incrementan la producción de RL (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011).

Las principales fuentes de carbono utilizadas para la producción de ramnolípidos son glucosa, glicerol, *n*-alcanos, etanol y glicerolípidos, y de nitrógeno el ion amonio y la urea. En la literatura hay reportes que indican el uso de aceites

de origen vegetal, como soya, maíz, canola y olivo para la obtención de altas productividades de ramnolípidos.

2.4 Producción de ramnolípidos por procesos fermentativos

Los ramnolípidos son uno de los grupos de glicolípidos más estudiados debido a su buen desempeño en rangos amplios de pH y temperatura, además de que presentan CMC bajas. Al hacer la búsqueda de la palabra/concepto “rhamnolipids” en *Scopus* el histórico de referencias es de 1176 publicaciones con esta palabra clave, de las cuales del año 2015 a la fecha hay 419 publicaciones dedicadas al estudio de este glicolípidos. Mientras que la búsqueda “rhamnolipids in solid state fermentation” el resultado histórico es de 14 publicaciones de las cuales seis han sido publicadas en los últimos 4 años. De este análisis de la bibliografía se observa que el estudio de la producción de RL utilizando sistema de cultivo sólido ha sido poco explotado por lo que con este trabajo de investigación se pretende hacer una aportación al conocimiento en general.

2.4.1 Cultivo en medio líquido

Este sistema requiere de aireación forzada y agitación. La formación de espuma en el cultivo es un problema importante, reduce la transferencia de O₂ entre la fase líquida y la fase sólida del reactor, la espuma tiende a subir en el espacio de cabeza y aumenta el riesgo de contaminación.

El uso de antiespumantes tiene serias desventajas como su alto costo, la disminución de la eficiencia en la transferencia de oxígeno y de dióxido de carbono entre las fases líquido y gas, además, representan un contaminante químico y complican los procesos de purificación (Nalini y Parthasarathi *et al.*, 2014).

2.4.2 Cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido involucra el crecimiento de los microorganismos sobre partículas sólidas. La mayor parte del medio de cultivo esta absorbido en el soporte. El CMS ofrece altas tasas de transferencias de oxígeno. Sin embargo, su mayor reto reside en que requiere de altas tasas de remoción de calor que mantengan la temperatura óptima para el crecimiento y la formación del producto (Mitchell *et al.*, 2004).

El CMS tiene algunas ventajas respecto al CL, permite el uso de sustratos de bajo costo y equipos más simples, requiere bajos volúmenes de agua, tiene una demanda energética baja y se obtiene una mayor concentración de los productos. La tasa de aireación está determinada por los requerimientos de enfriamiento y no por los requerimientos de oxígeno (Camilios-Neto *et al.*, 2011).

De acuerdo con Makkar *et al.* (2011) el uso de sustratos alternativos como son los residuos agroindustriales forma parte de una estrategia para la producción de BS. Dicha estrategia ofrece un doble beneficio ya que se obtiene un producto de valor agregado a bajo costo de producción y se utilizan los subproductos no aprovechados. En la Tabla 2.4 se muestra la producción de RL por microorganismos patógenos mientras que, en la Tabla 2.5 se muestran las producciones de RL por microorganismos no patógenos, además se ordenan de acuerdo al sistema de cultivo empleado. La producción de ramnolípidos reportada por diversas cepas de *Pseudomonas* va desde 0.19 hasta 46 g/L mientras que, la producción de estos glicolípidos empleando microorganismos no patógenos va desde 0.5 hasta 5.67 g/L.

Camilios-Neto *et al.*, (2008), han producido ramnolípidos mediante CMS utilizando diferentes sustratos como el bagazo de caña en combinación con semilla de girasol molida y reportan hasta 45 g RL/ L de solución de impregnación, luego de 288 h de cultivo que expresado en base seca corresponde a 180 g RL/ Kg de sólidos secos iniciales (Kg_{ss}). Por otra parte, Nalini y Parthasarathi en 2014 obtuvieron Mono y Di-RL mediante un CMS empleando como soporte-sustrato la torta de extracción del aceite de mahua. Hasta ahora no se ha reportado la producción de RL en CMS por cepas del género *Burkholderia*, por lo que esta tesis genera un aporte a la literatura.

Tabla 2.4 Producción de ramnolípidos por diferentes cepas de *P. aeruginosa* (patógeno oportunista) en diferentes sistemas de cultivo.

Microorganismo	Sistema de cultivo	Sustrato	Producción (g/L)	Métodos de análisis	Tensión superficial (mN/m)	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> RG18	Semi-sólido	Glicerol-harina de colza-salvado de trigo	15 ± 0.30	%E ₂₄ MALDI-TOF	28.01	Wu <i>et al.</i> , 2017.
<i>P. aeruginosa</i> #112	Líquido	Licor de maíz	3.20	%E ₂₄ CMC ESI-MS	30	Gudiña <i>et al.</i> , 2015
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		Residuos de olivo	0.19	UPLC- MS	33.7	Moya Ramírez <i>et al.</i> , 2015.
<i>Pseudomonas</i> SWP-4		Residuos de aceite de cocina	13.93	CCF FTIR NMR ESI-MS	24.1	Lan <i>et al.</i> , 2015.
<i>P. aeruginosa</i> TMN		Glucosa	0.30	FTIR NMR ESI-MS	34.0	Moussa <i>et al.</i> , 2014.
		Glicerol	0.25		46.0	
<i>P. aeruginosa</i> A11		Glicerol	4.44	FTIR NMR LC-MS	29.0	Singh y Cameotra 2013.
<i>P. aeruginosa</i> BN10		Glicerol	No reportado	NMR ESI-MS	29.0 (a 25°C)	Christova <i>et al.</i> , 2011.
<i>P. aeruginosa</i> SP4		Caldo nutritivo-aceite de palma	No reportado	HPLC-ELSD	No reportado	Sarachat <i>et al.</i> , 2010.
<i>P. aeruginosa</i> DS10-129		Glicerol	0.17	CCF FTIR GC-MS	No reportado	Bondarenko <i>et al.</i> , 2010.
<i>P. aeruginosa</i> BS20		Aceite de soya	13.40	%E ₂₄ CCF HPTLC	30.0	Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> , 2009.
<i>P. aeruginosa</i> SP4		Caldo nutritivo aceite de palma	5.20	HPLC-ELSD FTIR NMR	29.0	Pornsunthorntawee <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	Sólido	Bagazo de caña-salvado de maíz-glicerol-aceite de soya	45.00	ESI-MS/ MS LC-MS	No reportado	Camillios-Neto <i>et al.</i> , 2011.
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614		Bagazo de caña-glicerol-harina de semilla girasol	46.00	No reportado	No reportado	Camillios-Neto <i>et al.</i> , 2008.

Tabla 2.5 Producción de ramnolípidos por microorganismos no patógenos.

Microorganismo	Sistema de cultivo	Sustrato	Producción (g/L)	Métodos de análisis	Tensión superficial (mN/m)	Referencia
<i>B. thailandensis</i> E264	Líquido	Caldo nutritivo-aceite de cocción	2.20	%E ₂₄ LC-MS	37.7	Kourmentza <i>et al.</i> , 2018.
<i>B. cepacia</i>		Aceite de olivo	No reportado	%E ₂₄ GC-FID	24.6	Almatawah, 2017.
<i>B. thailandensis</i> E264		Glucosa-caldo nutritivo-glicerol	1.49	ESI-MS	28.0	De Rienzo <i>et al.</i> , 2016.
<i>B. thailandensis</i> E264		Caldo nutritivo-glicerol	2.79- 25°C 1.99- 30°C	ESI-MS LC-QToF-MS	No reportado	Funston <i>et al.</i> , 2016.
<i>B. kururiensis</i> KP23T <i>B. kururiensis</i> LMM21		Glicerol	0.78-KP23T 5.67-LMM21	ESI- MS	No reportado	Tavares <i>et al.</i> , 2013.
<i>B. glumae</i> AU6208		Glicerol Aceite de canola	0.56 1.00	LC-MS	28.5	Costa <i>et al.</i> , 2011.
<i>B. plantarii</i> DSM9509T		Glucosa-caldo nutritivo	0.05	NMR HPLC ESI-MS-MS	29.4 (25°C)	Hörmann <i>et al.</i> , 2010.
<i>S. marcescens</i> S10		Aceite de olivo	No reportado	%E ₂₄	41.5	Ahmed y Hassan, 2013.
<i>S. rubidaea</i> SNAUO2	Sólido	Torta de extracción de aceite de Mahúa	No reportado	CCF FTIR GC-MS	No reportado	Nalini y Parthasarathi, 2014.
<i>S. rubidaea</i> ATCC 27593	Superficial	Peptona glicerol	No reportado	GC-MS CCF NMR	R1 25.5 RG1 25.8	Matsumaya, 1990.

2.5 Extracción y purificación de ramnolípidos

Se han reportado diversos procedimientos para la recuperación de RL como la precipitación ácida, filtración, extracción con solventes, centrifugación y fraccionamiento en espuma, esta última ofrece la recuperación del producto con una pureza alta.

Los métodos más comunes para la extracción de ramnolípidos, incluyen la extracción con solventes (cloroformo-metanol, diclorometano-metanol, butanol, acetato de etilo, pentano, hexano, entre otros) o la precipitación ácida (Khire, 2010). También se ha reportado el uso de precipitación con sulfato de amonio, cristalización, centrifugación, adsorción y fraccionamiento en la espuma, en este método se obtiene el producto con alta pureza (Sarachat *et al.*, 2010).

En cultivo líquido la extracción de RL se realiza mediante una precipitación ácida, de esta forma se insolubiliza el RL a un pH ácido (pH= 2~3), posteriormente, el precipitado se somete a una extracción por solventes orgánicos (cloroformo o acetato de etilo), los solventes son evaporados y así se obtiene un extracto crudo con una concentración de alrededor del 25-40% (Müller *et al.*, 2012).

Se ha reportado el uso de técnicas más sofisticadas para la recuperación y purificación de RL como son el intercambio iónico, absorción- desorción, y algunas técnicas cromatográficas. El RL extraído y purificado puede ser caracterizado empleando métodos robustos como técnicas cromatográficas, métodos espectrométricos o espectroscópicos.

2.6 Análisis cualitativos, cuantitativos y caracterización del biosurfactante

La cuantificación de BS se hace por diversas metodologías. El análisis puede ser por gravimetría para obtener la cantidad de BS crudo, mientras que hay quienes cuantifican empleando métodos más finos como HPLC, donde se reporta la producción de alguna molécula en específico o de todas las especies que se produjeron. Así, en la literatura podemos encontrar una gran variedad de reportes que indican la producción de BS alcanzada empleando diferentes estrategias para su cuantificación.

Los métodos empleados para la caracterización son cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (GC), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), espectrometría de masas con ionización por electroaspersión (ESI-MS) (Varjani y Upasani, 2017).

2.6.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja (IR) estudia el efecto de la interacción entre la materia y la energía de radiación en el rango IR vibracional, que se encuentra entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. En esta región la frecuencia de radiación corresponde en energía a las frecuencias vibracionales naturales de los enlaces en moléculas orgánicas. Las vibraciones de enlace pueden ser de estiramiento asimétricas y simétricas, así como modos de flexión en el plano y fuera del plano. Las vibraciones de estiramiento implican movimientos de los átomos en la dirección de la unión, mientras que las vibraciones de flexión (o deformaciones) implican movimientos que resultan en cambios correspondientes en el ángulo de unión (Thompson, 2018).

La llamada huella digital comprende la región entre 1500 y 400 cm^{-1} donde se muestran bandas de deformación características de cada molécula y permite que sean identificadas por sus espectros así mismo admite la comparación con bases de datos (Heyd *et al.*, 2008).

Los IR con transformada de Fourier (FT) están formados por tres componentes: la fuente de radiación, el interferómetro de Michelson y el detector. El interferómetro (consiste en un espejo móvil, un espejo fijo y un divisor de haz) modula la radiación al dividir un haz de luz en dos caminos para que un haz golpee el espejo fijo y el otro al espejo móvil. Cuando los haces reflejados rebotan y se vuelven a combinar, se produce un patrón de interferencia. El interferómetro produce señales de interferencia que contienen información espectral IR generada después de que un haz ha pasado a través de una muestra, dichas señales se producen y miden en función de la diferencia de la trayectoria óptica por un detector. El interferómetro realiza la codificación de la señal y convierte las frecuencias iniciales en una forma especial descifrable por el detector. Todas las frecuencias se examinan simultáneamente. La señal medida se digitaliza y se envía a la computadora donde se produce la transformación de la señal. La transformada de Fourier se puede ver como un método matemático que permite transformar una función del dominio del tiempo al dominio de la frecuencia (Álvarez-Ordoñez y Prieto, 2012).

La absorción IR se mide como número de onda (cm^{-1}) o como longitud de onda (μm). El número de onda está definido por ciclos de onda por unidad de longitud y es directamente proporcional a la frecuencia (s^{-1}) o energía de radiación IR. La longitud de onda está definida como la longitud de un ciclo de ondas completo. El espectro infrarrojo que se obtiene se presenta normalmente como la transmitancia o la absorbancia frente al número de onda o la longitud de onda (Smith, 2011).

Esta técnica se emplea para la identificación de biosurfactantes, ocasionalmente puede emplearse como un método de cuantificación, siempre y cuando se cuente con una molécula de referencia con la que se elabore una curva de calibración que relacione concentración y absorbancia, dicha línea de calibración debe ser validada.

2.6.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

De acuerdo con Santiago y Strobel (2013) la cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography) es una técnica ampliamente reportada para elucidar la composición de biosurfactantes, es una técnica analítica rápida y sencilla que permite comparar moléculas y monitorear la producción de BS.

Consta de una fase estacionaria y una móvil, las fases estacionarias empleadas son gel de sílice, óxido de aluminio, óxido de magnesio y silicato de magnesio. El gel de sílice se prefiere debido a su gran adsorción de muestra, adsorbe al soluto mediante interacciones intermoleculares dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno. El yeso, almidón o los aglutinantes orgánicos se utilizan para fijar el gel de sílice a una superficie de soporte, el gel de sílice más común para CCF es “gel de silicona 60”, que tiene un tamaño de poro de 6nm (Spanberger *et al.*, 2011).

La fase móvil emplea algún disolvente de polaridad conocida o mezclas de disolventes. La elección del sistema depende de la polaridad de la molécula que se desea separar, es decir una mezcla polar, hará que los solutos polares migren más mientras que una fase apolar llevará al frente de la placa las moléculas más apolares.

Un método de detección de los analitos es el uso de una lámpara de luz ultravioleta (UV), un revelador no destructivo (si el compuesto no es fotosensible), se basa en la incorporación de un compuesto fluorescente en la fase estacionaria, la presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa (Skoog *et al.*, 2016). No todas las sustancias son revelables a partir de la luz UV. Cuando los analitos adsorbidos a la placa cromatográfica no son revelables bajo la luz UV, su identificación se logra con el uso de agentes reveladores químicos que reaccionan con el analito adsorbido. Este revelado produce manchas de diferentes colores dependiendo de la naturaleza del analito. No todas las sustancias son reveladas por reveladores químicos.

Otro método de detección es el uso de vapores de yodo, considerado un revelador universal para moléculas lipofílicas, cuando la placa se satura del vapor de yodo, las zonas con muestra se colorean como manchas color marrón (Jork *et al.*, 1990).

Dentro de los agentes químicos para la visualización de los analitos, se encuentran los reactivos de carbonización que ayudan a la conversión de los compuestos que contienen carbono en zonas marrón-negras cuando la placa se calienta a temperaturas de 80-120°C. El reactivo de carbonización más común es el ácido sulfúrico (Spangenberg *et al.*, 2011). La solución de *p*-anisaldehído- ácido sulfúrico es un revelador químico universal para productos naturales. Produce cambios de color que pueden ayudar en la identificación de los componentes. La oxidación de los azúcares da una coloración verde mientras que, los compuestos lipídicos se colorean de marrón-negro (Jork *et al.*, 1990).

Con base en la revisión bibliográfica realizada, y sabiendo que hay pocos reportes dedicados al estudio de la producción de ramnolípidos utilizando un sistema de cultivo en medio sólido, en esta tesis proponemos emplear dicho sistema de cultivo con un medio de cultivo reportado en la literatura para la producción de un biosurfactante utilizando microorganismos no patógenos. Este trabajo incluye la puesta a punto de técnicas de extracción, caracterización y evaluación de la producción de RL.

3. Justificación

La producción de BS se ha investigado desde hace muchos años. Existe una gran cantidad de trabajos que reportan la obtención de BS mediante cultivos en sistema líquido y pocas investigaciones se han dedicado a su producción en medio sólido. La producción de BS presenta una baja competitividad económica en comparación con los surfactantes químicos sintéticos convencionales, debido a que los procesos de producción y purificación tienen costos muy elevados.

Se requiere sustituir los procesos de síntesis química por tecnologías sustentables, limpias y amigables con el ecosistema para la obtención de biosurfactantes, empleando microorganismos que no representen riesgos a la salud pública. Los BS son capaces de formar emulsiones estables y su nicho de mercado es el mismo que los surfactantes químicos. En este trabajo se propone generar conocimiento científico y tecnológico para la producción de BS empleando microorganismos no patógenos en un sistema de cultivo en medio sólido, que mejore su funcionalidad en comparación con los surfactantes químicos.

4. Hipótesis

Burkholderia plantarii y *Serratia rubidaea* son microorganismos no patógenos que podrían sintetizar biosurfactantes al crecer en condiciones nutricionales limitadas. La combinación de la fuente de carbono y nitrógeno además del uso de una fuente de carbono hidrofóbica, tendrán un efecto sobre la producción del biosurfactante empleando un sistema de cultivo en medio sólido comparado con un medio líquido.

5. Objetivos

Objetivo general

Establecer las condiciones de producción de agentes con actividad surfactante (biosurfactantes, BS) con microorganismos no patógenos empleando sistema de cultivo en medio sólido (CMS) y cultivo en medio líquido (CL).

Objetivos particulares

- Comparar la producción BS mediante CMS y CL con *B. plantarii* ATCC 49704 y *S. rubidaea* ATCC 27593.
- Caracterizar por cromatografía en capa fina, FTIR, HPLC-ELSD y tensión superficial los BS producidos en CMS y CL para *B. plantarii* y *S. rubidaea*, respectivamente.
- Comparar el efecto de la composición de medio de cultivo en la producción de BS.
- Simular la disminución de la tensión superficial de los BS obtenidos en CMS y CL mediante el uso de un modelo matemático.

6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismos: Conservación y condiciones de cultivo

Los microorganismos que se utilizaron fueron *Serratia rubidaea* ATCC 27593 y *Burkholderia plantarii* ATCC 49704. Las cepas, se mantuvieron en glicerol al 40% (p/v) a -18°C para su conservación a largo plazo (6-12 meses). Para la conservación de las cepas a corto plazo (4 - 6 semanas), se emplearon cajas Petri con agar nutritivo almacenadas a 4°C. La reactivación de las células consistió en inocular por asada o volumen (3 µL) un tubo de ensaye con tapón de algodón que contenía 3 mL caldo nutritivo (CN) e incubarlo durante 24 h con agitación a 200 rpm y 30°C.

Para propagar las cepas se transfirió el contenido del tubo de ensaye a un matraz Erlenmeyer de 250 mL (con 30 mL de CN) y se incubó bajo las mismas condiciones, estas células se emplearon como inóculo para los cultivos en medio sólido y líquido.

6.2 Cultivo en medio sólido

En este ensayo se reproducen las mejores condiciones y medio de cultivo reportado por Camilios-Neto *et al.* en 2011. El soporte empleado fue aserrín con tamaño de partícula de 0.84 a 2.48 mm (entre malla 8 y 20). Como fuente de carbono se emplearon glicerol y glucosa mientras que para cubrir los requerimientos de nitrógeno se usaron las sales $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaNO_3 . La composición de la solución de impregnación fue la siguiente (en g/L) KH_2PO_4 (3), K_2HPO_4 (7), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2), fuente de nitrógeno (1), fuente de carbono (Glicerol o glucosa, 83.1). Se adicionó aceite de soya (6%) e inóculo (4%), el porcentaje es v/v respecto al volumen total de solución de impregnación. La relación C/N (p/p) fue de 140 para todos los tratamientos. Se planteó un diseño factorial de tres factores con dos niveles (Tabla 6.1). Para el balance de humedad se consideraron 150 g de materia húmeda (MH) como base de cálculo y una humedad cercana al 60%.

A partir de este punto se utilizarán las siguientes abreviaturas glicerol (Gli), glucosa (Glu), sulfato de amonio (NH_4^+) y nitrato de sodio (NO_3^-) para referir la fuente de carbono y nitrógeno utilizadas.

Tabla 6.1 Diseño factorial para la producción de RL en CMS

Tratamiento	Microorganismo	Nutriente	
		Carbono	Nitrógeno
1	<i>B. plantarii</i>	Gli	NH ₄ ⁺
2	<i>S. rubidaea</i>	Gli	NH ₄ ⁺
3	<i>B. plantarii</i>	Gli	NO ₃ ⁻
4	<i>S. rubidaea</i>	Gli	NO ₃ ⁻
5	<i>B. plantarii</i>	Glu	NH ₄ ⁺
6	<i>S. rubidaea</i>	Glu	NH ₄ ⁺
7	<i>B. plantarii</i>	Glu	NO ₃ ⁻
8	<i>S. rubidaea</i>	Glu	NO ₃ ⁻

En la Tabla 6.2 se resume la composición de los medios de cultivo evaluados para la producción de BS, en los tratamientos control se empleó la misma composición del medio de cultivo sin añadir aceite de soya.

Tabla 6.2 Composición de los medios de cultivo empleados para la producción de BS.

Medio	Gli- NH ₄ ⁺	Gli- NO ₃ ⁻	Glu- NH ₄ ⁺	Glu- NO ₃ ⁻
Componente	g/L	g/L	g/L	g/L
Carbono	83.16	83.16	83.16	83.16
KH ₂ PO ₄	3.33	3.33	3.33	3.33
K ₂ HPO ₄	7.77	7.77	7.77	7.77
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.22	0.22	0.22	0.22
Nitrógeno	1.11	1.40	1.11	1.43
Inóculo	4% respecto al volumen de solución de impregnación			
Aceite de soya	6% respecto al volumen de solución de impregnación			

Para cada unidad experimental se emplearon 48.15 g de soporte seco, 91.66 g de solución de sales, 3.67 mL de inóculo y 5.50 mL de aceite. La solución de impregnación y el aceite se esterilizaron por separado a 121°C a 15 lb durante 15 min. El material sólido (150 g MH) se empacó en biorreactores de vidrio (1 L, 101 x 222 mm). Las unidades experimentales se incubaron durante 288 h, 30°C, la aireación fue de 0.4 Vkgm (volumen de aire por kg MH por minuto). Cada tratamiento se evaluó por triplicado. Adicionalmente se prepararon controles, que consistieron en utilizar la misma composición de la solución de impregnación, pero sin agregar el aceite de soya.

6.3 Cultivo en medio líquido

Para el cultivo en medio líquido se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL como biorreactores, se aplicó el mismo diseño experimental empleado en CMS. A cada unidad experimental se le añadieron 45 mL de solución de impregnación (Tabla 6.1), 2.70 mL de aceite de soya y 1.80 mL de inóculo. La solución de impregnación, la fuente de carbono y el aceite se esterilizaron por separado a 121°C por 15 min. Los matraces se agitaron a 200 rpm, durante 288 h a 30°C, cada tratamiento se evaluó por triplicado.

Al final de la incubación los matraces se mantuvieron a 4°C durante 12 h. Con ayuda de una espátula se retiró la capa de aceite que solidificó, para retirar el aceite residual el medio de cultivo se mezcló con un volumen igual de hexanos, la fase acuosa se acidificó con HCl 2M a pH 3, posteriormente, el producto se extrajo haciendo 3 lavados con acetato de etilo, el solvente se evaporó en un rotavapor modelo R100 de BÜCHI a 45°C y a presión reducida de 250 mBar.

6.4 Recuperación de producto (BS) del CMS

Se evaluó la eficiencia de dos disolventes (acetato de etilo y metanol) para la extracción del BS del CMS. Se colocaron 50 g MH en matraces Erlenmeyer y se adicionaron 200 mL de disolvente. En el caso de la extracción con metanol la materia húmeda fermentada se secó previamente a 60°C por 24 h. La suspensión se agitó durante 1 h a 130 rpm a temperatura ambiente, se aplicó un lavado más con el disolvente evaluado. Esta suspensión se filtró por papel Whatmann del No.1, se añadió NaSO₄ anhidro para remover el agua presente en el extracto orgánico. Se filtró a través de tierra de diatomeas, el disolvente se eliminó al vacío con la ayuda de un rotavapor modelo R100 de BÜCHI a una temperatura de 45°C y a una presión de 250 mbar.

6.4.1 Cuantificación del extracto crudo de BS

El BS crudo se cuantificó por gravimetría después de la extracción con disolvente (líquido-sólido) y la evaporación de éste. Se utilizaron matraces bola de 50 mL lavados y secados en estufa a 60°C por 24 h, hasta llegar a peso constante. Se utilizó una balanza analítica digital OHAUS AP210-0 con una resolución de

0.0001 g para determinar el peso del matraz vacío y luego su peso con el producto. La producción de BS se calculó por diferencia de peso.

6.5.1 Respirometría

Para el caso del CMS, la medición del CO₂ puede representar una medida indirecta de la biomasa (X), considerando que el rendimiento de formación de biomasa respecto al de formación de CO₂ permanezca constante, (Y_{X/CO₂}). En el CMS se puede tener la medición en línea y en tiempo real del CO₂ siguiendo la metodología de la patente MX/a/2013/004638 (Saucedo- Castañeda *et al.*, 2013).

La caracterización de los cultivos se realizó a través de la estimación de parámetros cinéticos mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo logístico. La ecuación logística ha sido utilizada para describir el crecimiento microbiano con diferentes sistemas experimentales (Saucedo-Castañeda y *et al.*, 1994). En el CMS los datos de CO₂ pueden ser utilizados como una medición indirecta del crecimiento microbiano. La Ecuación 6.1 expresa la forma diferencial del modelo logístico mientras que la Ecuación 6.2 muestra su forma integral.

$$\frac{dCO_2}{dt} = \mu_{CO_2} CO_2 \left[1 - \frac{CO_2}{CO_{2max}} \right] \dots \text{Ecuación 6.1}$$

$$CO_2(t) = \frac{CO_{2max}}{1 + \left[\frac{CO_{2max}}{CO_{2_0}} - 1 \right] \exp(-\mu_{CO_2} t)} \dots \text{Ecuación 6.2}$$

Donde:

$$\frac{dCO_2}{dt}: \text{Tasa de producción de } CO_2 \left(\frac{mg}{g \text{ MS } h} \right)$$

$$\mu_{CO_2}: \text{Tasa específica de producción de } CO_2 \left(\frac{1}{h} \right)$$

$$CO_{2max} \text{ y } CO_{2_0}: \text{Concentración máxima e inicial de } CO_2 \left(\frac{mg}{g \text{ MS}} \right)$$

El ajuste del modelo a los datos experimentales permitió la estimación de la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) con la subrutina Solver de Excel

6.5.2 Análisis de humedad y pH

La humedad se determinó por gravimetría con la ayuda de una termobalanza Ohaus MB45, se midió la pérdida de peso a 110 °C hasta que ésta fuera menor a 1 mg en 90 s. El pH se determinó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-025-1984, con algunas modificaciones, se colocó 1 g MH y 9 mL de agua destilada en un tubo de fondo cónico de 50 mL. Se agitó durante 1 min en vórtex y con un potenciómetro Bante 210 previamente calibrado se midió el pH al sobrenadante. El porcentaje de humedad y el pH se midieron al inicio y final del tiempo de incubación.

6.5.3 Cromatografía en capa fina

Se emplearon placas de sílica gel 60 (20 x 20 cm, tamaño de partícula 9.5 - 11.5 µm) con indicador de fluorescencia, la fase móvil fue una mezcla cloroformo-metanol-agua (65:15:2, v/v/v) reportada por Nalini y Parthasarathi (2014). Para revelar las placas se empleó luz UV, vapores de yodo y una solución de *p*-anisaldehído. La solución reveladora contenía 5 mL de *p*-anisaldehído, 5 mL H₂SO₄ concentrado, 90 mL C₂H₅OH (96° GL) y 1 mL CH₃COOH concentrado. Todas las muestras se prepararon en MeOH a una concentración de 3 g/L y se colocaron 20 µL de muestra en cada carril. El factor de retención (FR) se calculó siguiendo la relación:

$$FR = \frac{\text{Distancia recorrida por la mancha}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

6.5 Métodos analíticos

6.5.4 Análisis por HPLC-ELSD

Los productos obtenidos de los extractos provenientes del CMS y CL, así como los extractos de aserrín se analizaron por HPLC-ELSD (Shimadzu). Las muestras se prepararon a 3 g/L, como disolvente se empleó MeOH ya que en este el aceite de soya no se solubilizó. Para la separación de las especies de RL se utilizó una columna C-18 fase reversa (Restek 150 x 3.2 mm). Para la fase móvil se usaron gradientes de concentración, la fase A era una solución acuosa de acetonitrilo al 10% (v:v), la fase B, acetonitrilo 100% ambas fases se acidificaron con 0.1% de

ácido trifluoroacético (TFA). El gradiente inició con 30% a 70% B en 5 min, 70 a 90% B en 15 min, durante 10 min se mantuvo 90% B y de 90% a 30% B en 10 min.

6.5.5 Tensión superficial

La tensión superficial se midió con un tensiómetro Dataphysics modelo DCAT 11 equipado con un anillo de Du Noüy (Almatawah, 2017). Las muestras se prepararon a una concentración de 5 g/L y se disolvieron en MeOH, se añadieron alícuotas de 100, 200, 300 y 500 μ L. Se utilizó agua destilada a 20°C y se tomó en cuenta la contribución (poco significativa) del MeOH puro (usado como blanco).

6.6 Expresión de resultados

6.6.1 Cuantificación del producto obtenido en CMS

El extracto crudo que se cuantificó por gravimetría contenía: (i) aceite residual del medio de cultivo (en los tratamientos con aceite), (ii) BS producido por el microorganismo y (iii) BS contenido en el aserrín. Para cuantificar el BS producido por el microorganismo se construyó una curva de calibración con estándar de ramnolípido (es una mezcla de Mono y Di-RL, 90% de pureza, R90 Agae Technologies®) mediante HPLC-ELSD. La curva se construyó utilizando las áreas totales de los cromatogramas y mediante un ajuste por mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta (Ecuación 6.3) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.99, donde y corresponde al área del pico mientras que X es la concentración de RL en g RL/ L.

$$y = 1.7 \times 10^7 X - 5.3 \times 10^6 \dots \text{Ecuación 6.3}$$

Bajo el método empleado, el estándar de RL presentó dos picos importantes con tiempos de retención en 10.74 ± 0.03 min para Di-RL y en 13.16 ± 0.05 min para mono-RL, así que se usaron las áreas de los picos con tiempo de retención (tr) alrededor de los 10 y/o 13 min hallados en los productos del CMS y CL.

La producción de BS se expresó como gramos equivalentes de RL por kg de materia seca (g_{eq} RL/ kg MS) o por litro de solución de impregnación (g_{eq} RL/ L_{SI}). Se cuantificó la cantidad de materia seca (g MS) contenida en la materia húmeda usada para la extracción:

$$g MS = \frac{g MH * (100 - \%H)}{100}$$

El biosurfactante crudo se determinó con la relación:

$$\frac{g_{producto}}{g MS} * 1000 = \frac{g_{BS\ crudo}}{kg MS}$$

La cuantificación se expresó en $g_{eq RL} / kg MS$, siguiendo la relación:

$$\frac{g_{BS\ crudo}}{kg MS} * \frac{\frac{g RL}{L_{calculado}}}{\frac{3g}{L_{muestra\ inyectada}}} * 0.9 = \frac{g_{eq RL}}{kg MS}$$

Para expresar la producción en términos de la solución de impregnación se consideró que la humedad inicial de CMS fue de 60% por lo tanto el resto corresponde a la materia seca, asimismo se consideró que la densidad de la solución de impregnación es igual a la del agua, así que se empleó la siguiente relación:

$$\left[\frac{g_{eq RL}}{kg MS} \right] \frac{0.4 kg MS}{kg MH} = \left[\frac{g_{eq RL}}{L_{SI}} \right]$$

6.6.2 Modelado de la tensión superficial

Saucedo *et al.* (1990) reportaron el modelamiento de la tasa de acidificación para un cultivo de *Lactobacillus*, el modelo describe una disminución de primer orden del pH en función de la concentración de ácido láctico. Este modelo se adaptó para simular la disminución de la tensión superficial en función de la concentración del biosurfactante, en su forma diferencial el modelo es:

$$-\frac{d Ts}{d Bs} = k(A - Ts) \dots \text{Ecuación 6.4}$$

Donde Ts se refiere a la tensión superficial (mN/m), Bs es la concentración de biosurfactante (ppm), k es la constante de primer orden de cambio de la tensión superficial en función de BS (mN·ppm/m) y A es un valor asintótico (mN/m). La forma integral del modelo se muestra en la Ecuación 6.5, B (mN/m) se refiere a la condición inicial de $Bs \rightarrow 0$ entonces el valor de $Ts_m = Ts_{agua}$.

$$Ts_m = A(1 + B * e^{-k*Bs}) \dots \text{Ecuación 6.5}$$

Los valores de A , B y k se calcularon mediante una regresión no lineal usando la subrutina Solver de Excel.

7. Resultados y discusión

La presentación de los resultados se organiza de la siguiente manera, primeramente, se muestran los resultados obtenidos del CMS, iniciando con el crecimiento de *B. plantarii* y *S. rubidaea* a partir del monitoreo de la respirometría. Enseguida se analiza la producción de BS obtenida, los BS se cuantificaron usando HPLC-ELSD. Posteriormente se muestra la caracterización de los productos por cromatografía en capa fina, espectroscopia infrarroja y tensión superficial. Finalmente, se comparan los resultados de cada análisis con lo reportado en la literatura.

Por otra parte, se dedica una sección a los resultados de la producción de BS en sistema de cultivo líquido empleando los mismos medios de cultivo adicionados con aceite de soya que se evaluaron en CMS; se muestra la producción de BS alcanzada en CL y luego se muestra su caracterización por CCF, HPLC-ELSD, FTIR y cambio de la tensión superficial.

7.1 Análisis del crecimiento de *B. plantarii* y *S. rubidaea* en CMS por respirometría CO₂

El CMS se monitoreó durante 288 h, se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo para determinar la producción de BS. El crecimiento se estimó de manera indirecta por el análisis respirométrico del cultivo, los parámetros de crecimiento se obtuvieron mediante el modelo logístico. En la Figura 7.1 se muestran los perfiles de la tasa de producción de CO₂ de *B. plantarii* y *S. rubidaea* al crecer en las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno evaluadas, estos tratamientos fueron adicionados con aceite de soya.

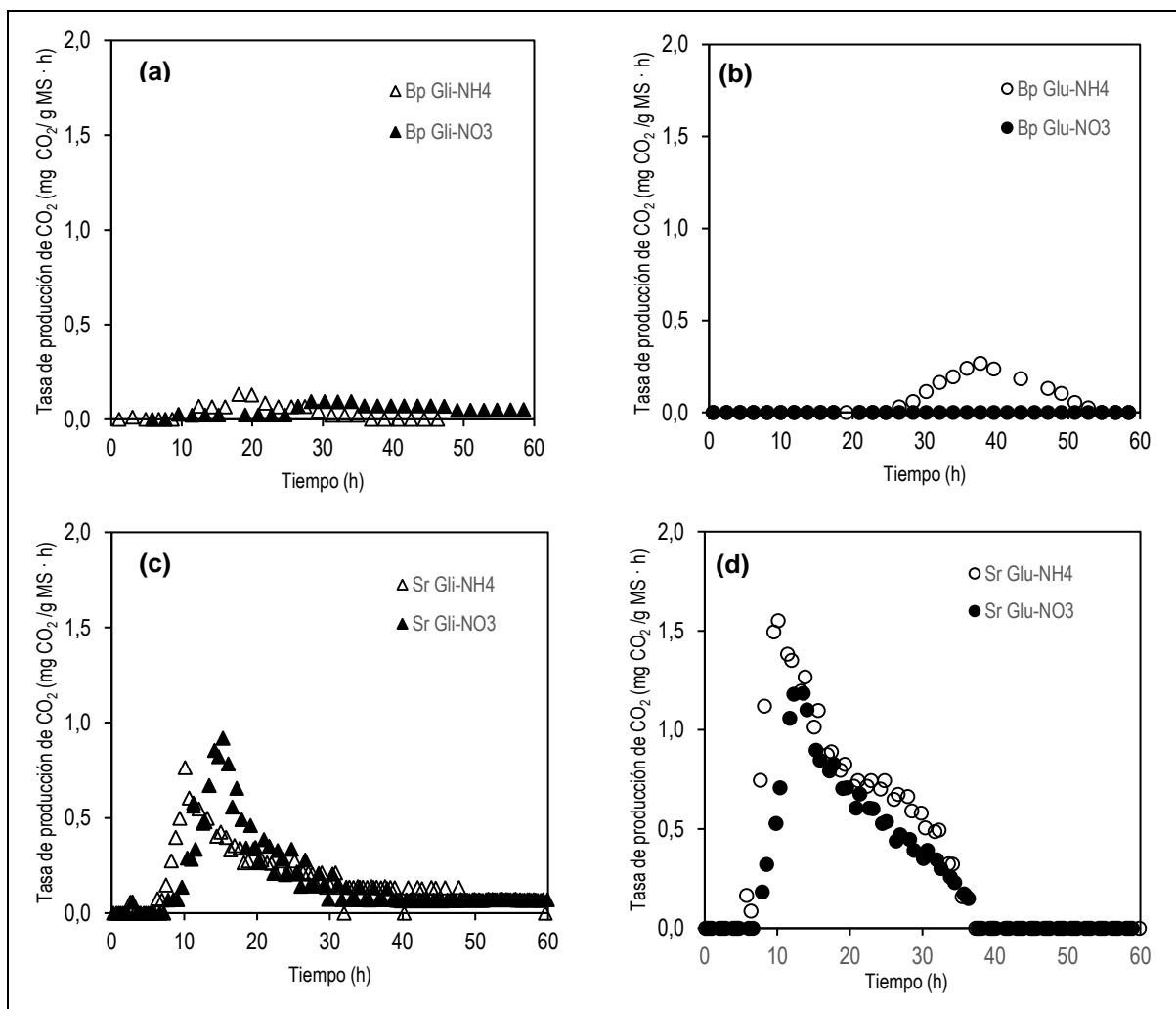


Figura 7.1 Tasas de producción de CO_2 , de *B. plantarii* (Bp) y *S. rubidaea* (Sr) durante CMS usando aceite de soya en combinación con glicerol (triángulos) o glucosa (círculos) y sulfato de amonio (marcador vacío) o nitrato de sodio (marcador relleno) como fuentes de nitrógeno.

Cabe destacar, que para *B. plantarii* se observan fases de retardo (lag) muy largas, cercanas a 30 h, en las cuatro condiciones ensayadas, (Figura 7.1 a y b) en comparación con las de *S. rubidaea* que fueron cercanas a 10 h (Figura 7.1 c y d). Esto podría representar un riesgo de contaminación al usar cultivos de *B. plantarii*.

B. plantarii (Bp) alcanza tasas de formación de CO_2 de 0.13 ± 0.01 y 0.09 ± 0.03 $\text{mg CO}_2/\text{g MS}\cdot\text{h}$ con sulfato de amonio (NH_4^+) y nitrato de sodio (NO_3^-) respectivamente, como fuente de nitrógeno y utilizando glicerol como fuente de carbono además de aceite de soya (Figura 7.1-a). Al emplear glucosa (Figura 7.1-b) la tasa máxima de producción de CO_2 para el tratamiento con NH_4^+ es de

0.27 ± 0.09 mg CO₂/g MS·h mientras que con nitrato de sodio no se observó producción de CO₂.

S. rubidaea (Sr) presentó tasas de producción de CO₂ mayores respecto a *B. plantarii* en todos los tratamientos (Figura 7.1 c y d), se alcanzaron tasas de producción de CO₂ entre 0.63 y 0.86 mg CO₂/g MS·h para los tratamientos con Gli-NH₄⁺ y Gli-NO₃⁻, respectivamente. Al cambiar la fuente de carbono por glucosa la tasa de producción de dióxido de carbono se incrementó casi al doble para las mismas fuentes de nitrógeno evaluadas (Figura 7.1-d).

En la Figura 7.2 se presenta la producción de CO₂ para *B. plantarii* (a y b) y *S. rubidaea* (c y d) cuando se emplea glicerol y glucosa adicionadas con aceite de soya. La mayor producción de CO₂ se logró al utilizar glucosa como fuente de carbono, *S. rubidaea* alcanzó producciones de CO₂ de 22.14 ± 0.43 y 17.51 ± 1.47 mg CO₂/ g MS al utilizar glucosa combinada con NH₄⁺ y NO₃⁻ respectivamente. En el caso de *B. plantarii* las producciones alcanzadas fueron 5.3 veces menores respecto a su homólogo.

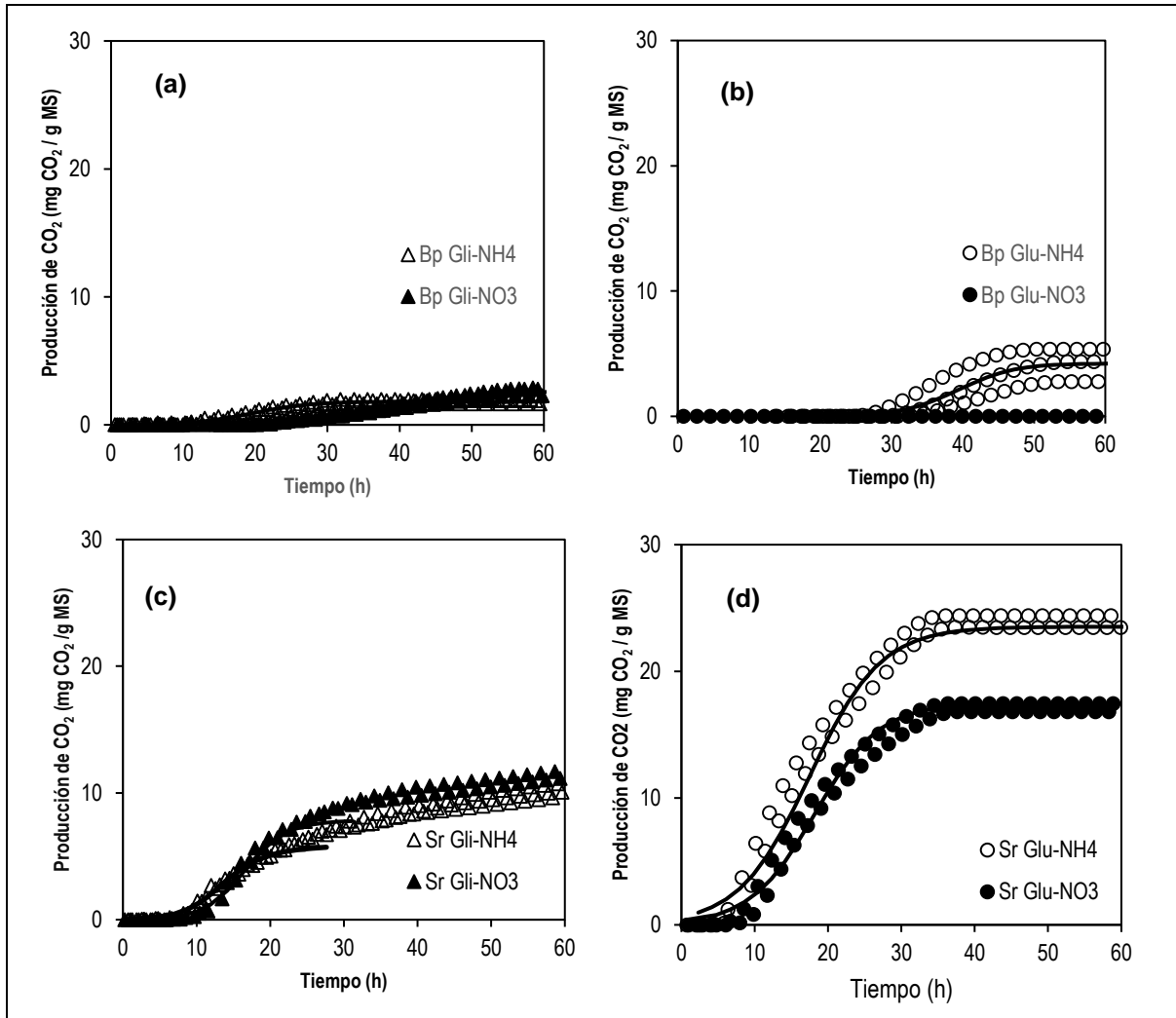


Figura 7.2 Producción de CO_2 obtenidas por *B. plantarii* (Bp) y *S. rubidaea* (Sr) en CMS usando aceite de soya en combinación con glicerol (triángulos) o glucosa (círculos) y sulfato de amonio (marcador vacío) o nitrato de sodio (marcador relleno) como fuentes de nitrógeno.

Al cambiar la fuente de carbono por glucosa se encontró que el NH_4^+ favorece la producción de CO_2 para *B. plantarii*, en cambio con *S. rubidaea* ésta se favorece al emplear NH_4^+ y NO_3^- en menor medida (Figura 7.2 b y d). Los valores de CO_2 estimados por el modelo fueron similares a los observados experimentalmente, que presentaron coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.98 en todos los casos (Tabla 7.1).

A partir del ajuste de los datos experimentales al modelo logístico se obtuvieron la producción total de CO₂ (CO_{2max}) y la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) para los tratamientos adicionados con aceite de soya en la Tabla 7.1 se resumen los valores obtenidos.

Tabla 7.1 Parámetros cinéticos de los CMS calculados por el modelo logístico.

Bacteria	Tratamiento	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	Fase Lag (h)	CO ₂ max (mg CO ₂ / g MS)	R ²
<i>B. plantarii</i>	Gli-NH ₄ ⁺	0.26 ± 0.02	18.6 ± 0.9	1.83 ± 0.18	0.9951
	Gli-NO ₃ ⁻	0.15 ± 0.01	35.2 ± 2.9	2.71 ± 0.33	0.9970
	Glu-NH ₄ ⁺	0.28 ± 0.00	35.0 ± 3.8	4.21 ± 1.27	0.9982
	GluNO ₃ ⁻	No se observó producción de CO ₂			
<i>S. rubidaea</i>	Gli-NH ₄ ⁺	0.39 ± 0.11	10.5 ± 0.7	5.83 ± 1.01	0.9921
	Gli-NO ₃ ⁻	0.38 ± 0.04	12.5 ± 0.2	7.83 ± 1.28	0.9953
	Glu-NH ₄ ⁺	0.21 ± 0.00	8.5 ± 0.5	22.56 ± 2.46	0.9874
	Glu-NO ₃ ⁻	0.23 ± 0.01	10.4 ± 0.1	17.92 ± 1.37	0.9915

Los valores mayores de μ_{CO_2} (0.38- 0.39 h⁻¹) se obtuvieron para *S. rubidaea* usando glicerol como fuente de carbono, para ambas fuentes de nitrógeno, sin embargo, la producción total de CO₂ fue relativamente baja (5.83 – 7.83 mg CO₂/ g MS), es decir una velocidad alta, pero detiene su crecimiento en las primeras 30 h del cultivo (Figura 7.2 c). También para el caso de *S. rubidaea* usando glucosa como fuente de carbono y para ambas fuentes de nitrógeno, se determinaron valores de μ_{CO_2} que variaron de 0.21 a 0.23 h⁻¹. En estos casos (Figura 7.2 d), la producción de CO₂ fue mayor (17.9 – 22.56 mg CO₂/g MS) indicando un mayor crecimiento. Respecto a los cultivos de *S. rubidaea* los valores de μ_{CO_2} permiten estimar tiempos de duplicación bacterianos de 112 - 200 min, que son valores mayores a los reportados en la literatura para bacterias (Mardigan, 2009). Es posible que las condiciones ensayadas en CMS no sean las mejores para *S. rubidaea*, lo mismo aplica para *B. plantarii*, pero en mayor medida, esto se confirma con la duración de las fases lag (35 h) observadas para *B. plantarii*.

7.2 Caracterización por HPLC-ELSD y cuantificación del biosurfactante producido en CMS

El BS producido en CMS por ambos microorganismos fue analizado por HPLC-ELSD usando una columna de fase reversa C18 y un método de gradientes de disolventes. La cuantificación de BS crudo se obtuvo por gravimetría, sin embargo, en esta se incluía el aceite residual del medio de cultivo que no fue posible eliminar usando lavados con hexano ya que el producto de interés fue soluble en este. Así el análisis por HPLC-ELSD se empleó para hacer una cuantificación selectiva del BS similar a las especies presentes en el estándar de RL. De esta manera fue posible expresar la producción en gramos equivalentes de ramnolípido por kilogramo de materia seca ($g_{Eq} RL/ kg MS$), en la sección 6.6 se describe la metodología utilizada.

En la Figura 7.3 se muestran los cromatogramas de los estándares con 98% de pureza para Mono y Di-RL disponibles (Agae Technologies®), el orden de elución de los componentes fue de compuestos polares primeramente y posteriormente los no polares. El pico A con tiempo de retención (t_r) en 1.28 ± 0.07 min corresponde a ramnosa, el pico B que aparece alrededor de los 10.74 ± 0.03 min es de un Di-RL y finalmente a los 13.16 ± 0.05 min aparece el pico del Mono-RL.

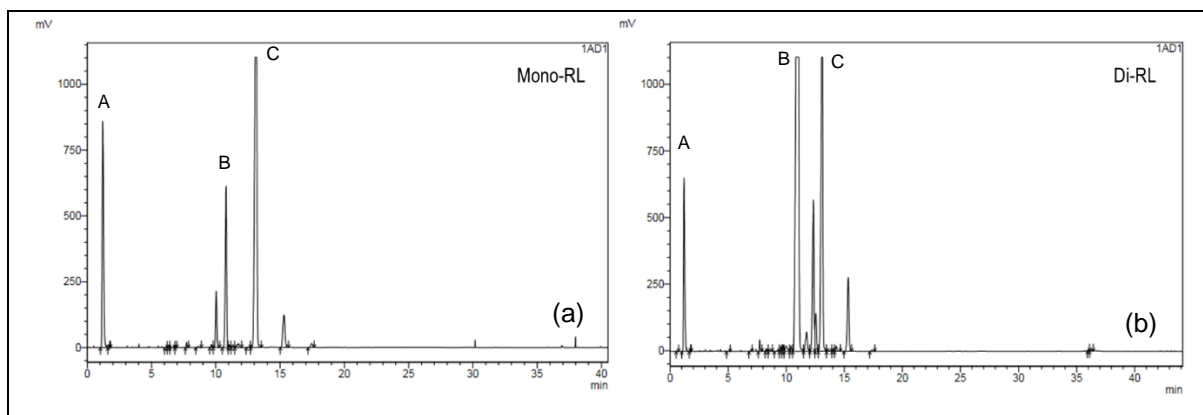


Figura 7.3 Cromatograma HPLC-ELSD de los estándares de Mono (a) y Di-RL (b) con 98% de pureza, el pico A corresponde a Rha, B es un Di-RL y C es un Mono-RL.

En la Figura 7.4 se muestra el cromatograma del estándar de RL con 90% de pureza (R90, Agae Technologies®), este producto es una mezcla de ramnolípidos, tanto Mono como Di-RL. En el cromatograma se aprecia la separación de los

componentes, aparecen los picos A, B y C en los tiempos de retención mencionados anteriormente con porcentajes de área 24.90, 20.86 y 41.76% respectivamente. entre los 14 y 20 min se aprecian otros picos que probablemente pudieran ser congéneres de ramnolípidos.

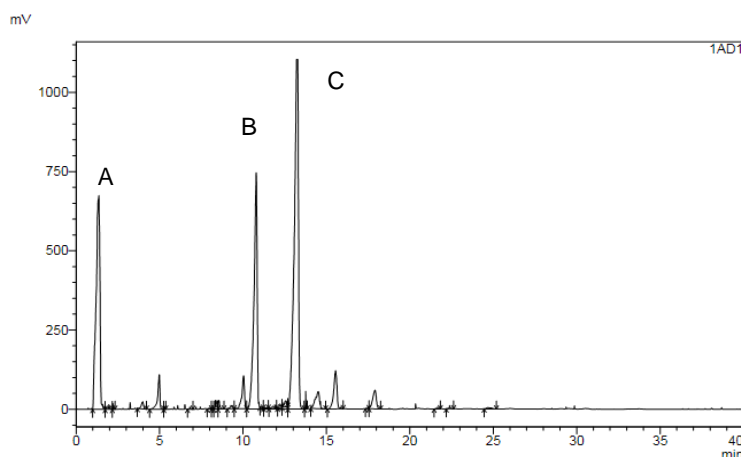


Figura 7.4 Cromatograma del análisis por HPLC-ELSD del estándar de RL con 90% de pureza, A es ramnosa, B es Di-RL y C es Mono-RL.

En la Figura 7.5 se muestran los cromatogramas de los extractos de aserrín, el extracto recuperado con AcOEt presentó picos a los 13.7, 17.6 y 24.2 min con áreas de 24.4, 10.4 y 6.6% respectivamente mientras que, el extracto de aserrín obtenido con MeOH presentó señal a los 1.2 y 13.5 min con áreas de 58.3 y 7.6%, usando este solvente se encontró un mayor contenido de algún compuesto polar, posiblemente un carbohidrato de la madera (glucosa, xilosa, manosa etc.) soluble en este disolvente y que permaneció incluso luego del pretratamiento realizado.

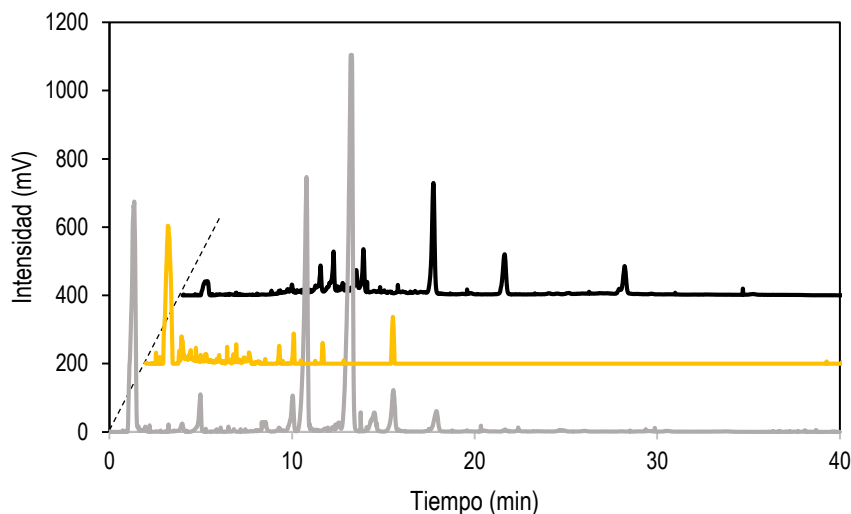


Figura 7.5 Cromatograma de los extractos de aserrín recuperados con AcOEt (línea negra) y MeOH (línea amarilla) en comparación con el estándar de RL (R90, línea gris).

En la Figura 7.6 se muestran los cromatogramas de los productos obtenidos en CMS con *B. plantarii* usando los medios Gli-NH₄⁺ (a)/ Gli-NO₃⁻ (b) con y sin aceite, cada producto presentó señal alrededor de los 13.8 min, en color gris se muestra el estándar de RL con 90% de pureza (R 90), en naranja se muestra el tratamiento sin aceite y en azul el tratamiento con aceite.

En el tratamiento Gli-NO₃⁻ con aceite de soya (Figura 7.6 b) sobresalen dos picos uno en 20.5 min y otro en 25.0 min, con áreas de 45.2 y 23.2 %, respectivamente. En el tratamiento Gli-NH₄⁺ con aceite (Figura 7.6 a) dichas especies se presentan a los 19.9 y 24.1 min con área 6.8 y 9 veces menores respecto a los BS producidos en el medio Gli-NO₃⁻ aceite de soya. Para ambos medios de cultivo se observa que en los tratamientos control, sin aceite de soya (línea en color naranja) no se aprecian picos con intensidad mayor a 100 mV. No se descarta que las especies con tiempos de retención mayores a 20 min puedan ser compuestos con actividad surfactante.

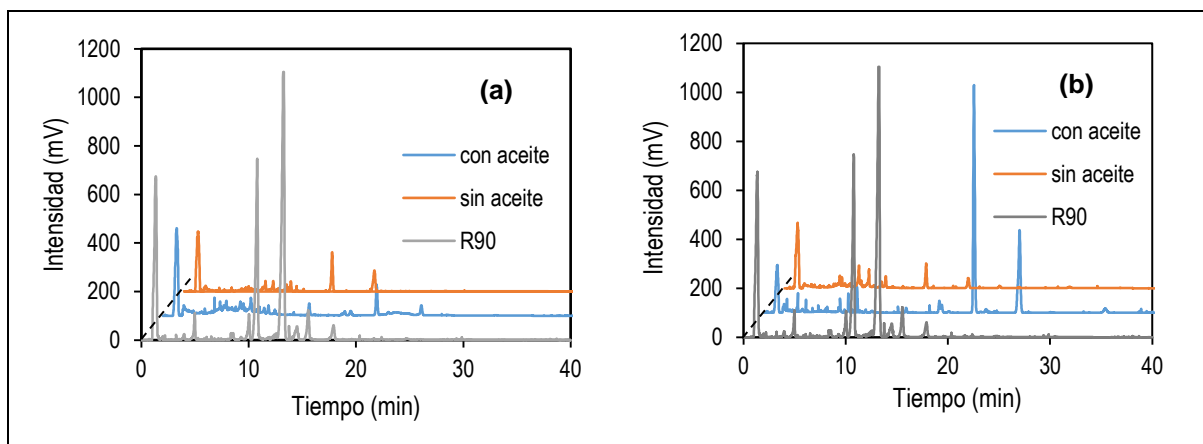


Figura 7.6 Cromatograma del análisis HPLC-ELSD a los productos de *B. plantarii* obtenidos en CMS luego de 12 d de cultivo, en medio Gli-NH₄⁺(a) y medio Gli-NO₃⁻(b), en línea naranja se muestra tratamiento sin aceite, azul tratamiento con aceite y en gris se muestra el estándar R 90% los productos se recuperaron con AcOEt.

La Tabla 7.2 muestra las áreas de los picos (%) que se observaron con el análisis por HPLC-ELSD de los productos de *B. plantarii* producidos en CMS con medio Gli-NH₄⁺, Gli-NO₃⁻, con y sin aceite.

Tabla 7.2 Áreas de los picos separados por HPLC-ELSD de los BS producidos por *B. plantarii* en CMS.

Tiempo de retención (min)	Área del pico (%)				
	Estándar R90	Gli-NH ₄ ⁺		Gli-NO ₃ ⁻	
		Con aceite	Sin aceite	Con aceite	Sin aceite
1.3 ± 0.02	22.65	33.56	45.11	14.99	46.90
10.7 ± 0.03	21.38	-	-	-	0.11
13.8 ± 0.12	40.51	2.33	17.51	0.76	9.82
17.9 ± 0.20	-	-	13.29	-	4.94
20.5 ± 0.55	-	6.68	-	45.19	1.00
24.1*	-	2.56	-	-	-
25.0*	-	-	-	23.20	-

* Sólo se presentaron en uno de los BS analizados

El análisis por HPLC-ELSD se realizó a todos los extractos del CMS producidos por ambos microorganismos, los cromatogramas de los extractos recuperados con AcOEt del CMS se encuentran en el Anexo A2 (Figura A.2) mientras que los extractos recuperados con MeOH de los productos de *B. plantarii* se encuentran en la Figura A.3 y los de *S. rubidaea* en la Figura A.4.

La producción de BS se expresó en gramos equivalentes de RL por kilogramo de materia seca ($\text{g}_{\text{Eq}} \text{RL} / \text{kg MS}$) para ello se analizaron por HPLC-ELSD diferentes concentraciones del estándar R90 y con las áreas totales del cromatograma se construyó una curva de calibración para obtener la ecuación de la recta que permitiera calcular la concentración de RL en los productos del CMS, en la Sección 6.6.1 se explica a detalle la metodología empleada.

En la Tabla 7.3 se presentan la producción de BS obtenida luego de 12 días de cultivo para ambas cepas y los ocho tratamientos ensayados. Los productos se recuperaron con AcOEt y MeOH, se observa que el uso de aceite de soya tuvo efecto positivo sobre la producción de BS, pues es mayor respecto a los tratamientos control donde no fue utilizado el aceite.

El análisis por HPLC-ELSD reveló que el uso de un disolvente orgánico menos polar que el MeOH, como es el acetato de etilo, favorece la recuperación de especies de BS similares al estándar de ramnolípido R90 (moléculas parecidas en tiempo de retención a Mono-RL y Di-RL). Con AcOEt la concentración que se recuperó de los tratamientos con aceite es de 6.8 a 8.4 $\text{g}_{\text{Eq}} \text{RL} / \text{kg MS}$; mientras que con metanol se recuperaron entre 14.8 y 34.3 $\text{g}_{\text{Eq}} \text{RL} / \text{kg MS}$. En los tratamientos control, sin aceite en el medio, la concentración de BS recuperadas con AcOEt fueron menores (2.2 y 3.9 $\text{g}_{\text{Eq}} \text{RL} / \text{kg MS}$), sin embargo, al utilizar MeOH se alcanzan concentraciones mayores (11.7 – 18.1 $\text{g}_{\text{Eq}} \text{RL} / \text{kg MS}$). Estas diferencias en la recuperación de las especies del BS se deben a la polaridad de cada uno de los disolventes de extracción evaluados.

Los resultados podrían sugerir que en los extractos recuperados con MeOH hay una mayor concentración de compuestos de naturaleza polar. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprobar si los productos que se recuperaron con el disolvente de mayor polaridad tienen actividad surfactante que es el propósito de esta tesis.

Tabla 7.3 Producción de BS (ramnolípidos) en CMS luego de 12 días de incubación.

Solvente de extracción		Acetato de etilo		Metanol	
		Con aceite	Sin aceite	Con aceite	Sin aceite
Tratamiento		(g _{Eq} RL/ kg MS)			
<i>B. plantarii</i>	Gli-NH ₄ ⁺	7.8	2.4	14.8	17.5
	Gli-NO ₃ ⁻	7.2	2.2	*	18.1
	Glu-NH ₄ ⁺	8.3	2.2	16.6	*
	Glu-NO ₃ ⁻	6.8	2.5	16.0	11.7
<i>S. rubidaea</i>	Gli-NH ₄ ⁺	8.3	3.9	*	16.5
	Gli-NO ₃ ⁻	8.4	3.1	*	17.2
	Glu-NH ₄ ⁺	8.0	2.2	*	*
	Glu-NO ₃ ⁻	6.8	2.3	34.3	13.5

* No se presentó señal en el análisis por HPLC-ELSD.

En diversos artículos científicos se ha reportado la producción de ramnolípidos por cepas del género *Burkholderia*, todos ellos empleando un sistema de cultivo en medio líquido; y las concentraciones varían desde 0.05 hasta 2.79 g/L (Tabla 2.5) mientras que, otros autores que trabajaron con diversas cepas de *Pseudomonas* usando el mismo sistema de cultivo han alcanzado producciones de hasta 14 g/L, como lo reportaron Lan *et al.* (2015). En 2011, Camilios-Neto *et al.* reportaron una producción de 45 g/L (180 g/ kg MS) utilizando un sistema de cultivo en medio sólido y *P. aeruginosa* UFPEDA 614, cabe señalar que en su proceso de extracción no hay un paso en el que se elimine el aceite residual, podría ser que la cuantificación del BS haya sido incrementada, por la presencia de aceite residual.

El método empleado para el análisis por HPLC-ELSD fue el reportado en la literatura por Pornsunthorntawee *et al.* (2008) y Sarachat *et al.*, 2010. Ellos analizaron el RL producido por *P. aeruginosa* SP4 en medio líquido empleando caldo nutritivo adicionado con aceite de palma como medio de cultivo, encontraron seis tipos de RL y determinaron su estructura. A los 4.68 min encontraron un Di-RL (Rha-Rha-C₈-C₁₀), a los 14.58, 18.20, 21.76 y 25.25 min hallaron cuatro especies de Mono. RL (Rha-C₈-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C_{12:1}; Rha-C₁₀-C₁₂), finalmente a los 29.62 min encontraron un Di-RL con una cadena lipídica de longitud mayor (Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1}).

Los productos recuperados con AcOEt fueron los que presentaron especies similares al estándar de ramnolípido R90, las producciones obtenidas expresadas en gramos equivalentes de ramnolípido por litro de solución de impregnación van desde 2.71 a 3.32 para los tratamientos con aceite de soya de *B. plantarii* y de 2.78 a 3.33 para los productos de *S. rubidaea*. Mientras que los tratamientos control (sin aceite) presentaron producciones (en g_{Eq} RL/ L_{Sl}) de 0.89 a 1.01 para *B. plantarii* y de 0.9 a 1.55 para *S. rubidaea*, estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura.

7.3 Conclusiones del crecimiento y producción de biosurfactantes

Los perfiles respiratorios de los CMS (producción de CO₂) presentaron diferencias entre las cepas estudiadas. *S. rubidaea* presentó mayor producción de CO₂ cuando crecía en medio Glu-NH₄⁺-aceite de soya, mientras que en *B. plantarii* ocurrió algo similar pero la producción de CO₂ fue menor. La producción de CO₂ fue menor al emplear glicerol como fuente de carbono.

En las cuatro condiciones ensayadas *B. plantarii* presentó fases de retardo (lag) muy largas (35 h), en comparación con las de *S. rubidaea* que fueron cortas (12 h). Esto podría representar un riesgo de contaminación al usar los cultivos de *B. plantarii*. Para *S. rubidaea* las mejores condiciones de cultivo para el crecimiento fueron empleando glucosa como fuente de carbono en combinación con las dos fuentes de nitrógeno ensayadas, sulfato de amonio y nitrato de sodio. Por otra parte, el crecimiento de *B. plantarii* en las condiciones ensayadas no fue del todo favorable

excepto al utilizar glucosa con nitrato de sodio. El análisis de los parámetros cinéticos de respirometría confirman que las condiciones de cultivo ensayadas en CMS no promueven el crecimiento de *B. plantarii*.

El análisis de los productos por HPLC-ELSD permitió la identificación de compuestos con tiempos de retención similares al estándar de RL (90% de pureza), fue posible cuantificar selectivamente el BS producido y se encontraron especies de BS distintas al estándar utilizado. Con la separación de los componentes de cada producto mediante esta técnica se determinó que el metanol como solvente de recuperación no favorece la recuperación de las especies de interés.

7.4 Análisis de los resultados de cromatografía en capa fina

El uso de la técnica analítica de cromatografía en capa fina permitió tener una respuesta preliminar acerca de los tipos de biosurfactantes producidas en cada uno de los tratamientos evaluados. Para el revelado de las placas se utilizaron vapores de yodo y solución de *p*-anisaldehído debido a que cada revelador permitió la visualización de diferentes compuestos.

En la Figura 7.7 se muestran placas de estándar de ramnolípido reveladas con solución de *p*-anisaldehído (Fig.7.7 A) y vapores de yodo (Fig. 7.7 B), con este revelador se observaron seis manchas mientras que, con la solución de *p*-anisaldehído sólo se observan tres. En la Tabla 7.4 se resumen los valores del factor de retención (FR) y la etiqueta asignada a cada mancha, R1 y R2 corresponden a Di y Mono-RL respectivamente, las manchas R3 a R6 corresponden a diferentes congéneres de RL.

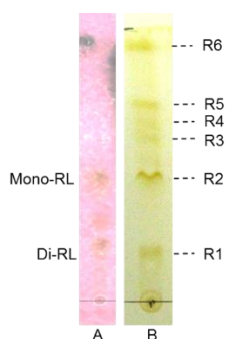


Figura 7.7 CCF del RL estándar reveladas con solución de *p*-anisaldehído (A) y vapores de yodo (B).

Tabla 7.4 Factores de retención del estándar RL

Mancha	Valor de FR
R6	0.94 ± 0.03
R5	0.80 ± 0.03
R4	0.73 ± 0.02
R3	0.60 ± 0.04
R2	0.45 ± 0.04
R1	0.24 ± 0.04

Resultados representados como media ± desviación estándar de tres placas.

Por otra parte, esta técnica permitió identificar compuestos que se extrajeron del aserrín (blanco) al utilizar AcOEt y MeOH para la recuperación de los productos, en la Figura 7.8 se muestra la placa de los extractos del soporte y se muestra la comparación de éstos con el estándar del RL.

El aserrín de pino fue usado como soporte para el CMS, se procedió a analizarlo para detectar posibles compuestos con actividad biosurfactante. En los extractos del aserrín se encontraron siete manchas; en la Tabla 7.5 se resumen los valores de los factores de retención. En comparación con el estándar de RL se

encontró que las manchas R6 y A7, R5 y A6, R4 y A5, R3 y A3 coinciden con los valores correspondientes de FR. Aunque hay coincidencia en el valor de FR la CCF es un análisis preliminar que puede brindar una aproximación acerca de las moléculas presentes en una muestra, pero también se sabe que las manchas pueden tener el mismo valor de FR y ser moléculas distintas.

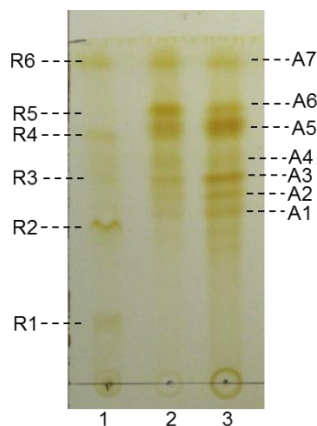


Figura 7.8 CCF de los extractos de aserrín obtenidos con AcOEt (2) y MeOH (3), el carril 1 corresponde al estándar de RL R90.

Tabla 7.5 Factores de retención para el extracto de aserrín

Mancha	Valor de FR
A7	0.93 ± 0.01
A6	0.80 ± 0.02
A5	0.72 ± 0.02
A4	0.65 ± 0.02
A3	0.59 ± 0.02
A2	0.54 ± 0.02
A1	0.49 ± 0.02

En la Figura 7.9 se muestran los resultados de CCF del BS producido por *B. plantarii* en CMS con medio Gli-NO_3^- y aceite de soya, los productos fueron recuperados con acetato de etilo, en el revelado con solución de *p*-anisaldehído (Figura 7.9 b) se aprecian sobre los carriles 3 y 4 las manchas A2 y A4, mientras que en el revelado con vapores de yodo (Figura 7.9 a) sólo se visualizan las manchas R5 y R6.

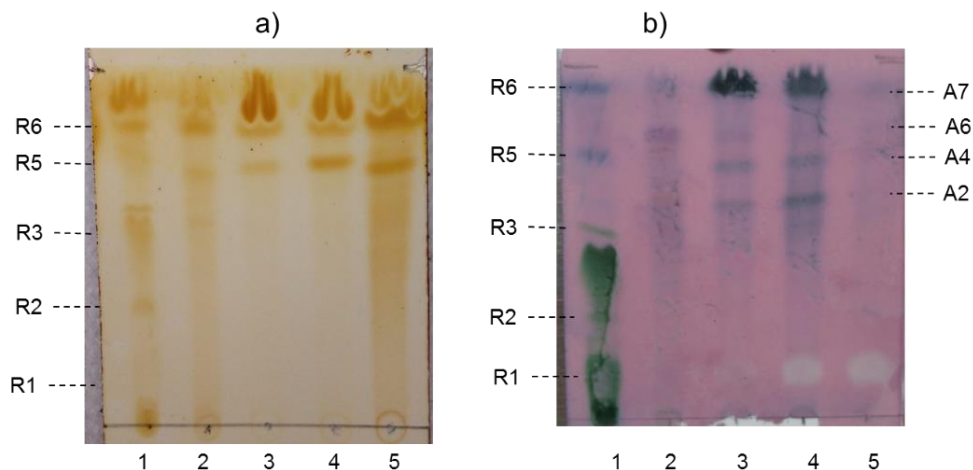


Figura 7.9 Cromatografía en capa fina del BS producidos por *B. plantarii* usando medio Gli-NO₃⁻ y aceite de soya en CMS, revelado con vapores de yodo (a) y solución de *p*-anisaldehído (b). Las muestras cargadas en cada carril son 1= Estándar de RL R90; extractos recuperados con AcOEt: 2= Extracto de aserrín, extractos a diferentes tiempos de muestreo 3= 0d, 4= 6d, 5= 12d.

La Figura 7.10 muestra las placas de los extractos orgánicos de la producción de BS en CMS por *B. plantarii* creciendo en medio Gli-NO₃⁻ con aceite y sin aceite, los productos se extrajeron con AcOEt, las placas se revelaron con vapores de yodo, en cada una se colocaron el estándar de RL, extracto de aserrín y los productos de los 0, 6 y 12 días de cultivo.

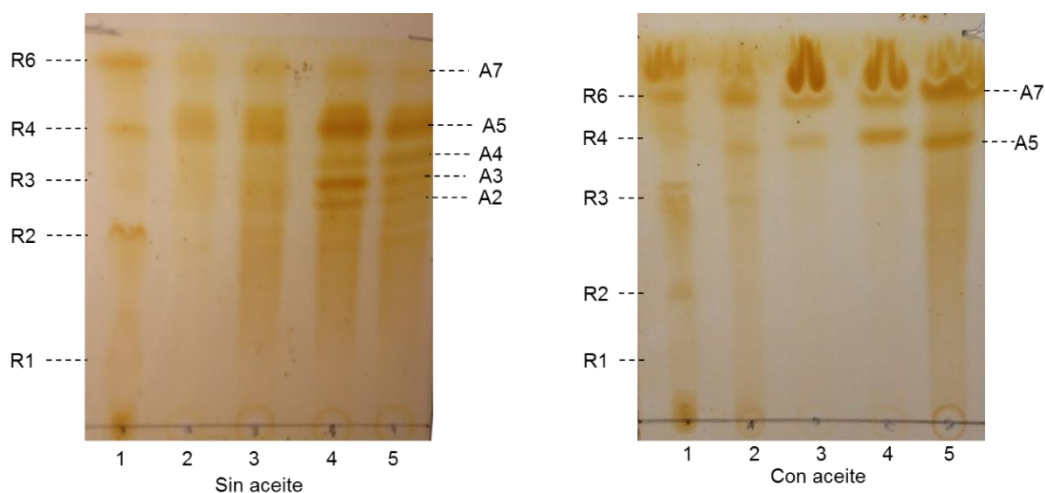


Figura 7.10 CCF de los BS producidos por *B. plantarii* en CMS usando el medio Gli-NO₃⁻ con y sin aceite de soya, las muestras en cada carril son: 1= Estándar de RL R90, 2= Extracto orgánico de aserrín, los carriles 3,4 y 5 corresponden a los productos de los 0, 6 y 12 días de cultivo, los productos se recuperaron con AcOEt, revelador vapores de yodo.

En los productos de los 6 y 12 días de cultivo (sin aceite en el medio) se encontraron las manchas A2, A3 y A4 mientras que, en el cultivo con aceite éstos desaparecen y solo se aprecia la presencia de las manchas A5 y A7.

En las Tablas 7.6 y 7.7 se muestran los resultados de los análisis por CCF realizados a los extractos orgánicos del CMS de *B. plantarii* y *S. rubidaea* creciendo en los diferentes medios de cultivo en presencia de aceite de soya. Luego de 12 días de incubación, los productos se extrajeron con AcOEt y MeOH respectivamente, el asterisco (*) indica la presencia de la mancha en la muestra mientras que, el guion (-) indica ausencia de ésta. Solo una de las dos manchas (R1 y R2) que corresponden a Di-RL y Mono-RL, fue identificada en los productos de *B. plantarii* creciendo en los medios Gli-NH_4^+ y Gli-NO_3^- con aceite de soya y recuperados con AcOEt. En los productos de *S. rubidaea* mediante esta técnica analítica no se encontraron manchas con FR similar a R1 y R2 que son los que corresponde a los productos de interés.

Tabla 7.6 Resultados del análisis por triplicado en CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* y *S. rubidaea* en presencia de aceite de soya, recuperados con AcOEt, Revelador empleado: solución de *p*-anisaldehído.

Mancha	Factor de retención		<i>B. plantarii</i>				<i>S. rubidaea</i>			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	-	*	*	-	-	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	*	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	*	-	-	-	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	*
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	*	*	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) indica que hubo presencia de la mancha mientras que, (-) indica que no hubo presencia de la mancha.

Tabla 7.7 Resultados del análisis por triplicado en CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* y *S. rubidaea* en presencia de aceite de soya, recuperados con MeOH, Revelador empleado: solución de *p*-anisaldehído.

Mancha	Factor de retención		<i>B. plantarii</i>				<i>S. rubidaea</i>			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	*	-	*	-	-	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	*	*	-	*	-	-	-
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	*	-	*	*	-	-	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	*	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) indica que hubo presencia de la mancha mientras que, (-) indica que no hubo presencia de la mancha

En los productos recuperados con AcOEt del CMS, obtenidos de los medios Gli-NH₄⁺, Glu-NH₄⁺ y Glu-NO₃⁻, adicionados con aceite de soya, se encontró la mancha R2 de Mono-RL. Matsumaya *et al.* (1990) usando un medio de cultivo superficial de peptona glicerol y *S. rubidaea* ATCC 27593 reportaron la producción de exolípidos que nombraron como Rubewetin RG1 y Rubewetin R-1, los FR encontrados fueron 0.10~0.12 para RG1 y 0.56 *S. rubidaea* ~0.59 R-1. El análisis por RMN de protón reveló que R-1 es una mezcla de ácidos grasos hidroxilados, en su mayoría 3-(3'-hidroxi-tetra-decanoil-oxi)-decanoato y 3-(3'-hidroxi-hexadecenoil-oxi)-decanoato. Rubewetin RG1 fue β-D-glucopiranosil 3-(3'-hidroxi-hexadecanoil-oxi)-decanoato R-1 y RG1 son exolípidos distintos a los lípidos de membrana, con actividad anfifílica, capaces de reducir la tensión superficial. El hecho de que las manchas encontradas en ambos trabajos presenten valores distintos de FR puede explicarse por la composición de la fase móvil y las condiciones de cultivo empleadas, cabe señalar que para la cepa utilizada (ATCC 27593) este reporte es el único precedente.

En 2005 Gunther *et al.*, encontraron que un cultivo de *Pseudomonas chlororaphis* NRRL B-30761 producía RL al crecer en un medio mineral con 2% de glucosa, en el análisis por CCF encontró tres manchas con valores de FR de 0.39 y 0.62, siendo dos variantes de Mono-RL y otra mancha con FR de 0.84 que corresponde a una forma metil-esteres de RL. El estándar de RL que utilizaron como referencia presentó valores de FR igual a 0.16 para Di-RL y FR de 0.37 para Mono-RL. En el análisis de los productos por HPLC-MS se determinó que se trataba de Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C_{12:1}; Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C_{12:1}.

Por su parte en 2009 Abdel-Mawgoud *et al.*, reportaron la producción de ramnolípidos homólogos en un extracto crudo de RL comparado con un estándar (obtenido de AgSciTech); detectaron cuatro homólogos en el estándar con valores de FR 0.26, 0.45, 0.52 y 0.67, las especies con FR de 0.45 corresponde a Di-RL-di-lípido y 0.67 para Mono-RL-di-lípido, en los productos de los cultivos de *P. aeruginosa* BS20 cultivada en medio mineral de sales y medio mineral de sales

suplementado con aceite de soya encontraron manchas con FR de 0.40 y 0.68 respectivamente.

Nalini y Parthari (2014) utilizaron un sistema de CMS para que *S. rubidaea* SNAU02 produjera RL, ellos reportaron valores de FR de 0.38 y 0.85 para Di y Mono-RL. En 2017 Wittgens *et al.*, encontraron manchas con FR de 0.27 para Di-RL con predominancia de Rha-Rha-C10-C10 (verificado por análisis HPLC-ESI-MS), para Mono-RL el FR fue de 0.82.

En el Anexo A3 se presentan los resultados del análisis por CCF a los productos de *B. plantarii* y *S. rubidaea* del CMS con y sin aceite recuperados con AcOEt y MeOH (Tabla A.1 hasta Tabla A.8).

7.5 Conclusiones del análisis de cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina permitió realizar un análisis preliminar de la composición de los extractos orgánicos del CMS, producidos por *B. plantarii* y *S. rubidaea* en los diferentes tratamientos evaluados, el uso de esta técnica analítica permitió visualizar las especies polares y no polares usando *p*-anisaldehído como revelador. Así mismo, se determinó que el uso de metanol como solvente de extracción no favorece la recuperación de las especies con factores de retención similares a Di y Mono-RL contenidos en el estándar. En cambio, el uso de acetato de etilo como solvente de extracción sí favorece la recuperación de especies similares al estándar.

Con base en los análisis por HPLC-ELSD, CCF y en congruencia con los reportes de la literatura que indican que el uso de una fuente de carbono hidrofóbica y el aporte de nitrógeno en forma de nitrato favorecen la producción de RL, se confirma que *B. plantarii* usando medio Gli-NO₃⁻ y aceite de soya en CMS es capaz de producir biosurfactante, es por ello que a partir de este punto de la tesis la explicación de los resultados estará centrada en el producto de esta bacteria.

7.6 Caracterización por espectroscopia infrarroja (FTIR)

Como ya se mencionó en la sección anterior, a partir de este punto de la tesis el análisis de los resultados estará centrado en el BS producido por *B. plantarii* usando medio Gli-NO₃⁻ con aceite de soya en CMS.

La espectroscopia infrarroja es un método de análisis que ayuda en la identificación de los grupos funcionales de las moléculas. La irradiación con luz infrarroja induce una vibración de los enlaces químicos a una frecuencia característica, así la energía es absorbida por los grupos funcionales que forman parte de la estructura. En la Figura 7.11 se muestra el espectro del estándar de ramnolípido con 90% de pureza, la banda en 3247.22 cm⁻¹ corresponde al estiramiento en el enlace del grupo -OH, por la amplitud e intensidad de la banda, esta señal pertenece al hidroxilo del agua en fase gaseosa del ambiente y no forma parte de la molécula.

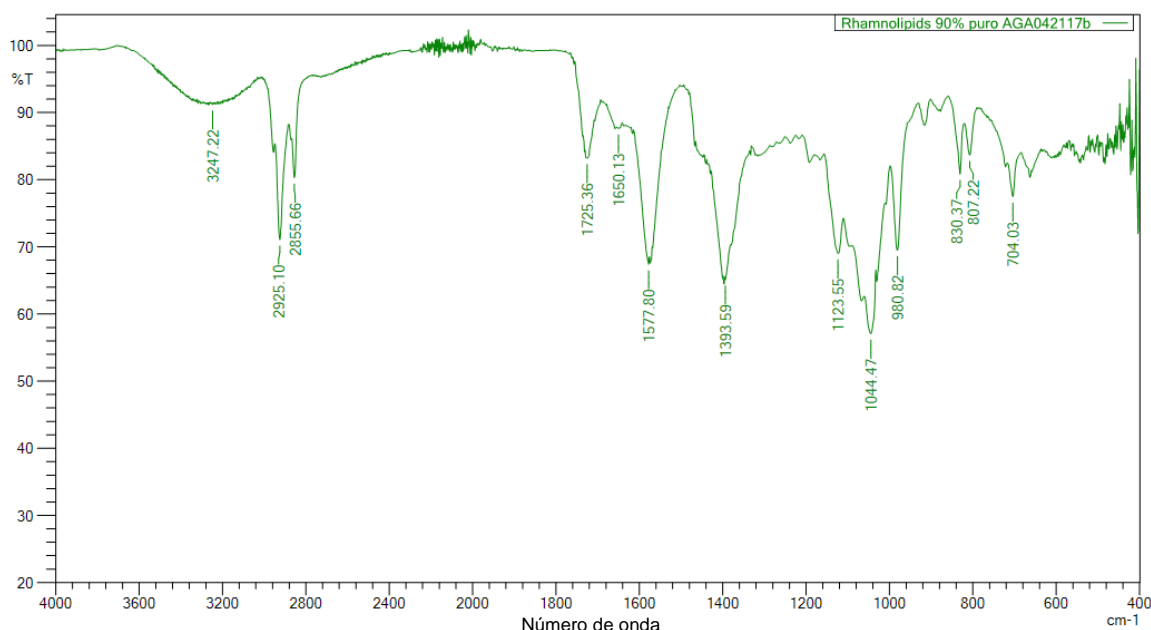


Figura 7.11 Espectro FTIR del estándar de ramnolípido sintetizado por *P. aeruginosa* con 90% de pureza, Agae Technologies®.

Las bandas correspondientes a enlaces del tipo C-H, que absorben dentro de las áreas bien definidas en 2925.10 y 2855.66 cm⁻¹ son características para grupos metino, metileno y metilo (-CH=, -CH₂-, -CH₃) que conforman a las cadenas hidrocarbonadas. La banda en 1725.36 cm⁻¹ es muy probable que

responda al carbonilo del éster, donde se da la unión del azúcar y la cadena lipídica que conforma al RL. EL grupo carbonilo en forma de carboxilato pudiera ser que absorba en 1650.13 cm^{-1} . Las bandas que aparecen entre 1500 y 400 cm^{-1} son parte de la “huella digital” del estándar, es decir estas bandas son características y únicas para el estándar de RL R90.

Se analizó el extracto de aserrín recuperado con AcOEt que se muestra en la Figura 7.12, en el espectro se observaron las bandas en 3440 cm^{-1} que corresponden a los enlaces $-\text{OH}$, las bandas en 2926.01 y 2854.65 cm^{-1} son características al estiramiento simétrico en los grupos metino, metileno y metilo. La biblioteca del software LabSolutions IR (Shimadzu) permitió comparar el espectro del extracto de aserrín con espectros en su biblioteca, siendo 78% similar a lanolina y parafina.

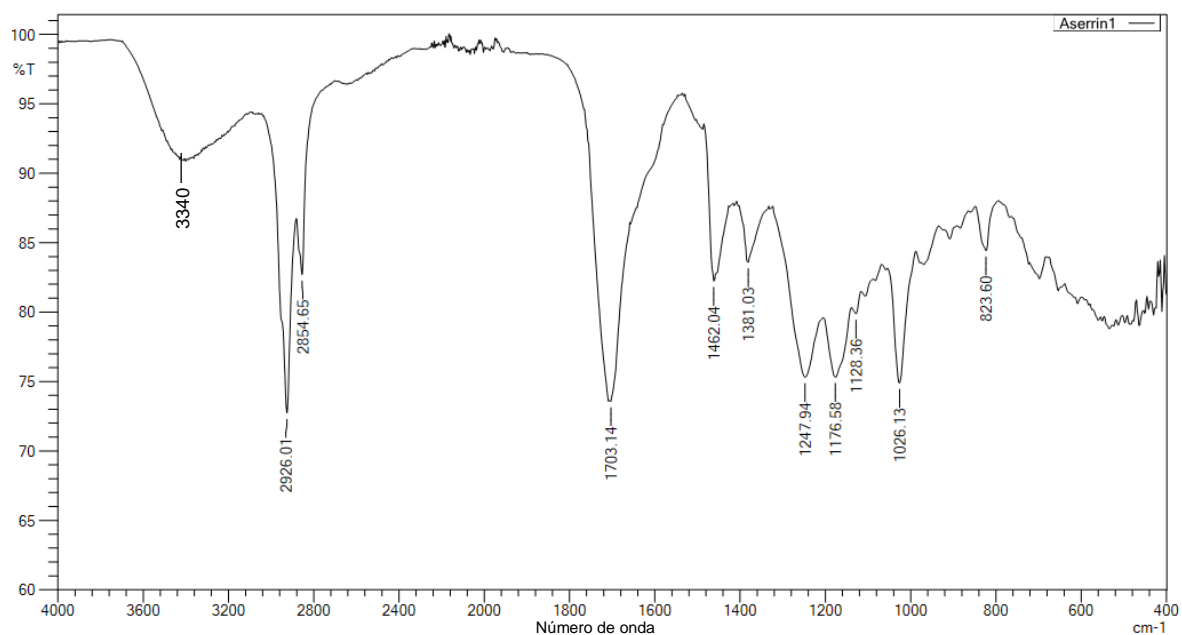


Figura 7.12 Espectro FTIR del extracto de aserrín recuperado con acetato de etilo.

A pesar de que el extracto del aserrín tuviera coincidencia con los espectros de lanolina y parafina, en la base de datos de espectros FTIR-ATR del Instituto de Química de la Universidad de Tartu (Estonia) se encontró el espectro para la resina

del pino (Figura 7.13), el extracto de aserrín recuperado con AcOEt presentó coincidencia en 11 bandas con el espectro de dicha resina.

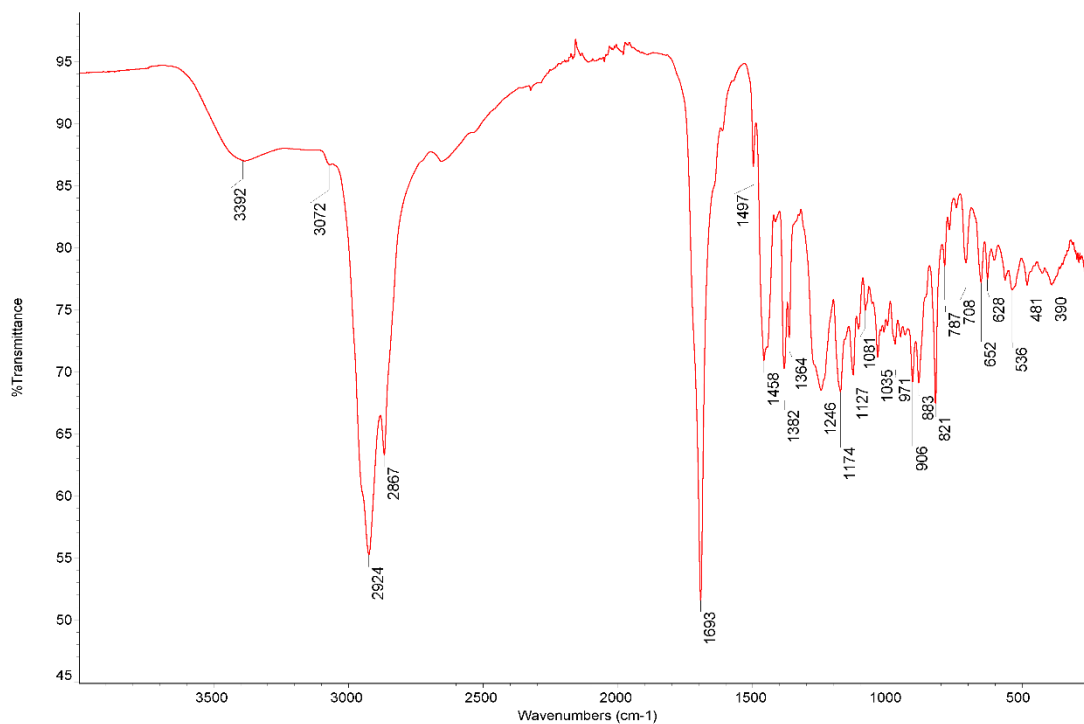


Figura 7. 13 Espectro de la resina de pino, obtenido por FTIR, Fuente: University of Tartu, Institute of Chemistry.

El espectro FTIR de los BS producidos por *B. plantarii* en CMS usando medio Gli-NO₃⁻ con y sin aceite de soya se muestran en la Figura 7.14. El espectro en color rosa corresponde al tratamiento control (sin aceite), mientras que la línea azul es del tratamiento con aceite de soya, los espectros de los extractos analizados presentaron similitudes entre sí. La Tabla 7.8 resume las bandas que coinciden en número de onda y los grupos funcionales a los que corresponden para el estándar de RL R90 y el producto del CMS de *B. plantarii* del medio Gli- NO₃⁻ adicionado con aceite de soya. El enlace en C=O presente en diversos grupos funcionales absorbe en distintos números de onda así la banda en 1693.50 cm⁻¹ del producto de *B. plantarii* pudiera deberse a un grupo amida mientras que, este tipo de enlace presente en el estándar de RL (1725.36 cm⁻¹) es característico de un éster.

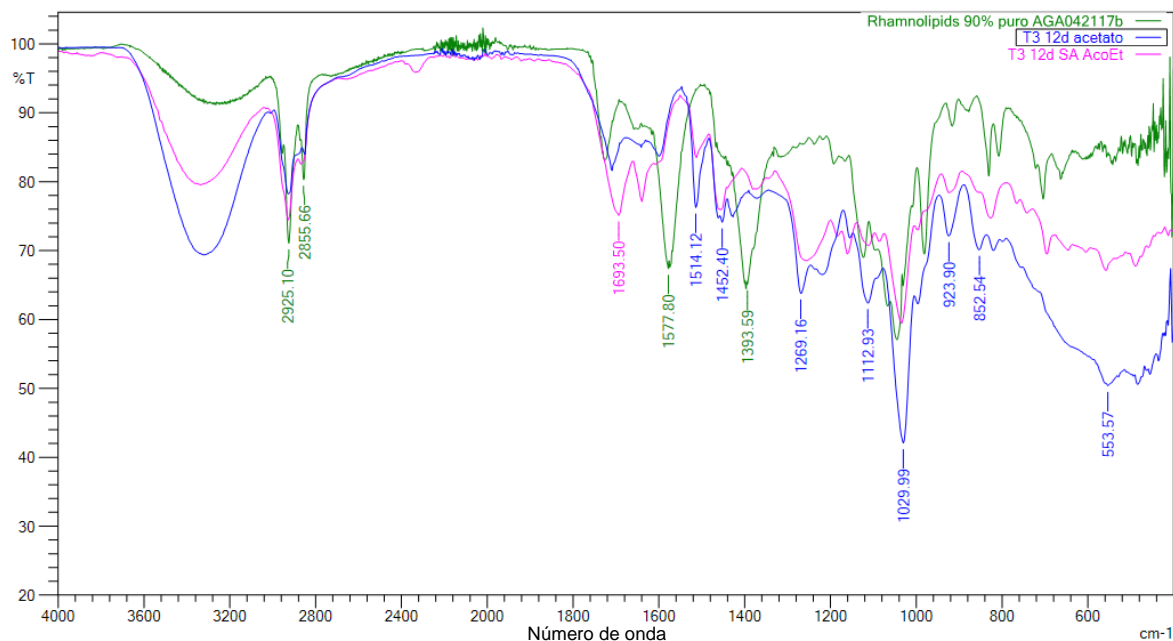


Figura 7.14 Espectros FTIR del BS producido en CMS por *B. plantarii* en medio Gli-NO_3^- : en ausencia (rosa) y presencia (azul) de aceite de soya, estándar de ramnólípido- línea verde.

Tabla 7.8 Análisis de los espectros infrarrojos de los BS producidos por *B. plantarii* en medio Gli-NO_3^- con y sin aceite comparado con el estándar de RL.

Grupo Funcional	Tipo de vibración	<i>B. plantarii</i>	Estándar de
		Gli-NO_3^-	RL R 90%
		Número de onda (cm^{-1})	
-OH	Estiramiento	3342.64	3247.22
-CH, -CH ₂ , -CH ₃ presentes en la cadena alifática.	Estiramiento simétrico	2927.99	2925.10
	Estiramiento asimétrico	2870.08	2855.66
-C=O	Estiramiento simétrico	1693.50	1725.36
-OH	Deformación (balanceo)	1452.40	1399.59
-C-O-C- en el anillo de ramnosa	Estiramiento simétrico	1029.99	1044.47

Por la forma e intensidad de las bandas alrededor 3340 cm^{-1} en los productos de CMS de *B. plantarii* presentados en la Figura 7.14 es muy probable que sean debido a la humedad en el ambiente y en la muestra, sin embargo, Govindammal

(2014) en la caracterización por FTIR del ramnolípido producido por *P. fluorescens* MFS03 indicó que una banda de intensidad fuerte y ancha en 3466.24 cm^{-1} corresponde al grupo hidroxilo típico de polisacáridos, además de que el RL presentó bandas localizadas en 2926.45 y 2856.23 cm^{-1} características de enlaces C-H en cadenas hidrocarbonadas. El estiramiento en el enlace C-O presentó bandas en 1162 a 1232.88 cm^{-1} que confirman la presencia enlaces formados entre átomos de carbono y grupos hidroxilo en la estructura química de los anillos de ramnosa, el RL producido en CMS por *B. plantarii* en medio Gli-NO_3^- y aceite de soya presentó una banda en 1269.16 cm^{-1} (Figura 7.14, línea azul) en el tratamiento control (sin aceite de soya) no se observó esta banda.

En 2015 Lan *et al.* trabajaron con *P. aeruginosa* SWP-4 usando un sistema de cultivo líquido y aceite empleado en la preparación de alimentos como inductor, en el análisis por FTIR el RL purificado presentó una banda ancha en 3410 cm^{-1} ($-\text{OH}$), el estiramiento simétrico de los grupos $-\text{C}-\text{H}$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ y $-(\text{CH}_2)_n$ presentes en la cadena alifática se presentaron en 2996 cm^{-1} , 2857 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} y 618 cm^{-1} mientras que, el enlace insaturado $-\text{C}=\text{C}-$ fue confirmado por dos bandas de débil absorción en 3230 y 1713 cm^{-1} , también se observaron las bandas de absorción intensas para los grupos $-\text{C}=\text{O}$ (1619 cm^{-1}) y $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ (1147 cm^{-1}), cabe señalar que la estructura la corroboraron por análisis de RMN de protón (^1H y ^{13}C).

Nalini y Parthasarathi en 2014, mostraron el espectro de un RL que presentó bandas de absorción localizadas en 2927 , 2850 , 1728 , 1406 , 1384 y 1078 cm^{-1} , las bandas en 3406 cm^{-1} indicaron la presencia de $-\text{OH}$. Las bandas de fuerte absorción en $3000-2700\text{ cm}^{-1}$ muestran la presencia de $-\text{CH}$ en las cadenas alifáticas, la banda característica del éster ($-\text{C}=\text{O}$) se observó en 1728 cm^{-1} , la vibración en 1627 cm^{-1} es característica de grupos carbonilo ($-\text{O}-\text{C}=\text{O}$). Los picos de absorción entre $1300-1000\text{ cm}^{-1}$ confirman la presencia de grupos carbonilo del éster, que corresponde a la presencia de $-\text{C}-\text{O}-$ vibraciones de deformación. El RL fue sintetizado por *Serratia rubidaea* SNAU 02 en un sistema de cultivo sólido empleando como soporte-sustrato la torta de extracción del aceite de mahua (un árbol de la India).

Moussa *et al.*, 2014 evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción y desempeño de RL sintetizados por *P. aeruginosa* TMN, el BS purificado presentó un pico ancho en 3429 cm^{-1} , característico de vibraciones de alargamiento -O-H , la absorción alrededor de 2922 cm^{-1} se asigna a estiramiento asimétrico de grupos -CH= , $\text{-CH}_2\text{-}$ y -CH_3 presentes en las cadenas alifáticas. El estiramiento simétrico se observó en 2853 cm^{-1} . En 1715 cm^{-1} observó una banda de débil absorción que corresponde a un estiramiento simétrico que indica la presencia del grupo carboxílico (COOH). La presencia del ácido carboxílico funcional se confirmó por bandas de absorción media en $1455\text{-}1386\text{ cm}^{-1}$ por balanceo del hidroxilo (-O-H).

Un RL (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) de *P. aeruginosa* muestra vibraciones características para grupos -CH_2 , -CH_3 en 2923.3 cm^{-1} , en 1732.2 cm^{-1} para -C=O y enlaces -C-O-C en 1050 cm^{-1} (Heyd *et al.*, 2008). Resultados similares han sido reportados por diversos autores como son Pornsunthorntawee *et al.*, 2008; Bondarenko *et al.*, 2010. Y Singh y Cameotra *et al.*, 2013.

En el Anexo A4 se muestran los espectros FTIR de los productos recuperados con AcOEt y MeOH de CMS luego de 12 días de incubación, se muestran los espectros para ambas bacterias.

7.7 Conclusiones de la caracterización por espectroscopia infrarroja

El análisis de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* y *S. rubidaea* permitió la identificación de grupos funcionales que están presentes en los extractos recuperados con los disolventes para la extracción. De acuerdo con la literatura se encontró que el RL producido por *B. plantarii* en CMS usando medio Gli-NO_3^- y aceite de soya coincide en bandas cuyos números de onda son similares con las bandas presentes en el espectro FTIR de ramnolípidos producidos por diversas cepas de *Pseudomonas* y *Serratia*, así este análisis ha permitido la elucidación de los grupos funcionales característicos en la estructura de un ramnolípido por lo que es muy probable que el producto del CMS sintetizado por *B. plantarii* en medio Gli-NO_3^- y aceite de soya sea un RL.

7.8 Determinación de la tensión superficial

Los BS extraídos al final del cultivo en medio sólido con los solventes evaluados, fueron resuspendidos en MeOH para medir la tensión superficial a diferentes concentraciones de BS. Se verificó que el MeOH usado para la disolución del producto no presentara efecto sobre la tensión superficial del agua (Figura 7.15, en marcador rombo). El cambio en la tensión superficial es una función dependiente de la capacidad tensoactiva de las especies y de su concentración, por lo que se adaptó el modelo reportado por Saucedo *et al.* (1990) y Draper y Smith (1998) para realizar el ajuste de los datos experimentales como se describió en la metodología.

En la Figura 7.15 se muestra el cambio de la tensión superficial en función de la concentración de los BS producidos por *B. plantarii* (Figura 7.15 a) y *S. rubidaea* (Figura 7.15 b) en CMS usando aceite de soya como inductor, los productos se recuperaron con AcOEt.

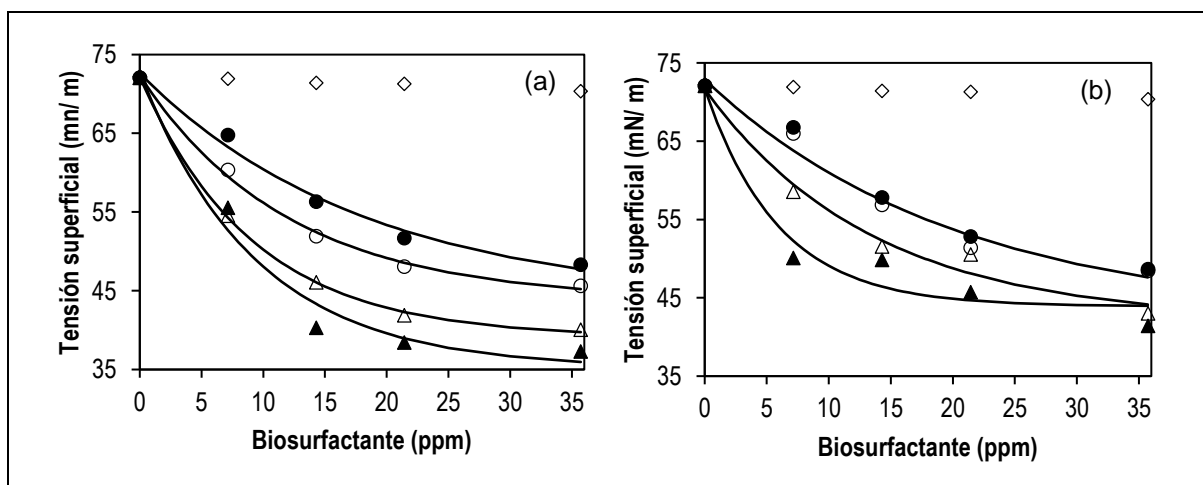


Figura 7.15 Gráficas de tensión superficial de los BS producidos en CMS usando aceite de soya como inductor, producidos por *B. plantarii* (a) y *S. rubidaea* (b), los triángulos corresponden a glicerol, círculos a glucosa, marcador sin relleno contiene NH_4^+ y con relleno NO_3^- como fuente de nitrógeno, las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto; el rombo corresponde a alícuotas de MeOH.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo de cambio de la tensión superficial en función de la concentración de BS descrito en la sección 6.6.2 de Materiales y Métodos. Se obtuvieron los valores de la constante de primer orden (k) y el valor asintótico de la tensión superficial (A). En la Tabla 7.9 se muestran los valores para k y A usando cada uno de los extractos recuperados con AcOEt y

MeOH producidos en CMS con y sin aceite de soya, los coeficientes de determinación fueron mayores a 0.98 en todos los casos. El modelo utilizado sólo es válido en los límites de los datos experimentales, es decir para concentraciones de BS de 0 a 37.5 ppm y valores de tensión superficial entre 35 y 72.5 mN/m.

El sentido físico de A se refiere al valor asintótico de la tensión superficial. De los BS recuperados con AcOEt en los tratamientos con aceite de soya, el BS producido por *B. plantarii* en CMS con medio Gli-NO₃⁻ fue el que más disminuyó la tensión superficial (37.31 mN/m). El BS producido por *S. rubidaea* en medio Gli-NO₃⁻ presentó el valor más alto para k (0.17 mN·ppm/m) es decir que a una concentración de 7 ppm disminuyó la tensión superficial del agua hasta 50 mN/m, sin embargo, el valor de A fue de 43.91 mN/m mientras que la tensión superficial experimental fue de 41.43 mN/m.

Los parámetros obtenidos para los extractos de aserrín recuperados con AcOEt fueron $k= 0.11$ mN·ppm/m y $A= 43.29$ mN/m mientras que los del extracto recuperado con metanol fueron $k= 0.13$ mN·ppm/m, $A= 41.75$ mN/m. La madera contiene biosurfactantes naturales (McClements *et al.*, 2016), los ácidos de resina de madera y sus derivados tienen la capacidad de reducir la tensión superficial, uno de los principales componentes de la resina de pino es la colofonia también llamado “Rosin” o resina de goma que se emplea como materia prima para producir surfactantes de tipo aniónico, catiónico y zwitteriónico (Rao, 2015).

De los productos de *B. plantarii* producidos en CMS el BS del medio Gli-NH₄⁺-aceite de soya reduce la tensión superficial hasta 40.04 mN/m mientras que el resto de los productos obtenidos con y sin aceite de soya y recuperados con ambos disolventes disminuyen la tensión superficial hasta 44.28 mN/m. Con los productos de *S. rubidaea* se obtuvieron valores de tensión superficial de 41.43 a 59.15 mN/m. La adición de aceite de soya tuvo un efecto positivo en la reducción de la tensión superficial ya que con estas condiciones se observaron valores menores respecto a los tratamientos control donde el aceite no se adicionó.

Tabla 7.9 Parámetros del modelo no lineal (k y A) estimados por el método de mínimos cuadrados para el cambio de tensión superficial usando los BS producidos en CMS.

Parámetro	Solvente de extracción/tratamiento	<i>B. plantarii</i>				<i>S. rubidaea</i>			
		Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
k (mN·ppm/m)	AcOEt CA	0.11	0.11	0.08	0.05	0.07	0.17	0.05	0.04
	AcOEt SA	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.13	0.06
	MeOH CA	0.09	0.01	0.04	0.09	0.03	0.01	0.02	0.06
	MeOH SA	0.07	0.05	0.05	0.01	0.04	0.08	0.13	0.12
A (mN/ m)	AcOEt CA	39.06	35.12	43.75	43.55	42.04	43.91	42.38	40.55
	AcOEt SA	45.97	44.26	44.08	43.95	42.45	41.31	42.04	38.87
	MeOH CA	42.58	9.66*	34.43	42.92	27.43*	30.73	17.30*	36.49
	MeOH SA	44.04	38.68	38.60	16.57*	32.39*	41.06	43.78	42.73

CA-con aceite de soya; SA- sin aceite de soya; AcOEt- acetato de etilo; MeOH-metanol

* Los datos experimentales tienen una tendencia lineal, el uso del modelo no lineal en estos casos no es el mejor para hacer estimaciones.

En las Notas Explicativas de la Tarifa Arancelaria publicadas en el Diario Oficial de la Federación (2 de julio del año 2007) se establece que una sustancia capaz de disminuir la tensión superficial del agua a un valor igual o menor de 45 mN/m a una concentración de 0.5% (equivalente a 5000 ppm) y que forme una solución estable por una hora a 20°C se denomina agente de superficie orgánico, la concentración a la que se probaron los BS producidos por CMS fue 143 veces menor en comparación a lo establecido en la fracción arancelaria, lo cual determina el potencial uso de los biosurfactantes, debido a su gran actividad para reducir la tensión superficial.

En el Anexo 5 se muestran los gráficos del cambio de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante, se muestran los gráficos para *B. plantarii* y *S. rubidaea* de los tratamientos con y sin aceite de soya, recuperados con AcOEt o MeOH.

En la Tabla 7.10 se muestra el valor de los parámetros A y k obtenidos con el modelo usando datos de tensión superficial reportados en la literatura. Los datos, punto a punto, de tensión superficial y concentración de BS se obtuvieron empleando la aplicación *WebPlotDigitizer*. El valor de k más alto encontrado fue para el RL reportado por Singh y Cameotra en 2013, a una concentración de 5 ppm la tensión superficial del agua disminuye desde 72 hasta 29.9 mN/m a 25°C, este RL fue sintetizado por *P. aeruginosa* A11 (microorganismo patógeno). Esta metodología es novedosa, ya que permite comparar a través de los parámetros del modelo el desempeño del BS en la disminución de tensión superficial con diferentes reportes de la literatura.

Por otra parte, el valor de k obtenido con *B. plantarii* en CMS usando aceite de soya y medio Gli-NO₃⁻ fue de 0.11 mN-ppm/m, este valor es ligeramente menor respecto a los resultados obtenidos por Costa *et al.* (2011) que usando la cepa AU6208 de *B. glumae* (no patógeno), ellos requirieron el triple de concentración de BS en comparación con la cantidad utilizada en esta tesis, para disminuir la tensión superficial del agua. Pornsunthorntawe *et al.* (2008) y Abdel-Mowgoud *et al.* (2009) emplearon diferentes cepas de *P. aeruginosa* (SP4 y Bs20 respectivamente, ambas patógenas), el RL que obtuvieron redujo la tensión superficial del agua hasta 30 mN/m pero requieren de concentraciones elevadas de RL (130 y 5.6 veces más comparado con la concentración de RL producido en CMS por *B. plantarii* ATCC 49704 en medio Gli-NO₃⁻). Hörmann *et al.* (2010) utilizaron *B. plantarii* DSM9509T y Kourmentza *et al.* (2018) con *B. thailandensis* E264, ambas cepas no patógenas, cuyo RL pudo disminuir la tensión superficial del agua a valores cercanos a 31.68 mN/m.

Tabla 7.10 Comparación de parámetros para datos reportados en la literatura.

Bs (ppm)	Parámetro			Coeficiente de correlación	Referencia
	K mN·ppm/m	A (mN/m)	B (mN/m)		
500.45	0.01	31.68	1.36	0.99	Kourmentza <i>et al.</i> , 2018.
0.50	27.52	30.69	0.90	0.98	Singh y Cameotra, 2013.
109.68	0.15	28.77	1.23	0.98	Costa <i>et al.</i> , 2011.
40.09	0.06	21.53	2.50	0.81	Hörmann <i>et al.</i> , 2010.
200.26	0.04	30.91	1.31	0.99	Abdel-Mowgoud <i>et al.</i> , 2009.
4649.35	0.01	29.60	0.82	0.98	Pornsunthorntaweewee <i>et al.</i> , 2008.
35.71	0.11	35.12	1.07	0.98	Este trabajo*
36.71	0.11	43.29	0.66	0.99	Extracto de aserrín AcOEt
35.71	0.13	41.75	0.73	0.99	Extracto de aserrín MeOH

* BS producido por *B. plantarii* en CMS usando medio Gli-NO₃⁻ con aceite de soya

7.9 Conclusiones de la determinación de la tensión superficial

Con la medición de la tensión superficial fue posible evaluar el desempeño de cada uno de los extractos recuperados con los dos disolventes de extracción, a pesar de que el extracto de aserrín disminuye la tensión superficial por sí solo, llegando a valores de hasta 41.75 mN/m en el extracto recuperado con MeOH. Se encontró que en los tratamientos evaluados el menor valor de tensión superficial se obtuvo con el BS producido por *B. plantarii* en CMS usando aceite de soya y medio Gli-NO₃⁻ recuperado con AcOEt, este BS cumple potencialmente con lo establecido en la fracción arancelaria para ser denominado como surfactante de origen orgánico, a una concentración de 35.71 ppm disminuye la tensión superficial del agua de 72.06 mN/m hasta 37.31 mN/m.

El valor de tensión superficial obtenido con el BS de *B. plantarii* es un indicativo de que el resultado del metabolismo de la bacteria también influye en el cambio de la tensión superficial. En los tratamientos control de ambos microorganismos se encontraron valores de tensión superficial mayores a 40 mN/m para los BS recuperados con AcOEt y MeOH. Esto indica que *B. plantarii* y *S. rubidaea* en algunas de las condiciones ensayadas no son capaces de producir BS.

7.9 Producción de BS en cultivo líquido

El cultivo en medio líquido se realizó como una estrategia para evaluar las moléculas que los microorganismos utilizados son capaces de producir en CL, por ello se empleó el mismo medio de cultivo que en el CMS suplementado con aceite de soya y mismo tiempo de incubación, los productos se recuperaron con AcOEt y la cuantificación se realizó por gravimetría, todos los productos se caracterizaron usando las técnicas de CCF, HPLC-ELSD, FTIR y tensión superficial.

La producción se expresó en gramos de biosurfactante por litro de solución de impregnación (g/L_{SI}) en la Tabla 7.11 se muestran los resultados obtenidos, para *B. plantarii* la producción más alta se alcanzó con el medio Gli-NH₄⁺, sin embargo, el error experimental fue alto (40.6%), mientras que en el caso de *S. rubidaea* esta fue de 3.56 g/L_{SI} con un 55.6% de error. En los otros tratamientos la producción es cercana a 0.5-2 g/L_{SI}, valores que son consistentes a los reportes de la literatura (Tabla 2.5).

Tabla 7.11 Producción de BS usando aceite de soya como inductor y cultivo en medio líquido luego de 12 días de incubación.

Medio	Producción (g/ L _{SI})	
	<i>B. plantarii</i>	<i>S. rubidaea</i>
Gli-NH ₄ ⁺	3.96 ± 1.61	1.54 ± 0.22
Gli-NO ₃ ⁻	1.67 ± 0.23	1.96 ± 0.10
Glu-NH ₄ ⁺	0.53 ± 0.08	3.56 ± 1.98
Glu-NO ₃ ⁻	1.49 ± 0.13	0.35 ± 0.04

El análisis por CCF de los productos obtenidos en CL se muestran en la Tabla 7.12 donde se reportan las manchas que se encontraron, estas se compararon con los FR del estándar de RL, el asterisco (*) indica la presencia de una mancha cuyo FR coincide con el de referencia mientras que (-) indica la ausencia.

En los BS de *B. plantarii* producidos en los medios Gli-NH₄⁺, Gli-NO₃⁻ y Glu-NH₄⁺ se encontró la mancha R2 que pudiera ser asignada a un Mono-RL, también se observaron las manchas R3, R4 mientras que, en los productos de *S. rubidaea* la mancha R2 se encontró en los extractos de los medios donde se usó glicerol en combinación con las dos fuentes de nitrógeno evaluadas.

Tabla 7.12 Factores de retención para los BS producidos luego de 12 días de cultivo en medio líquido por *B. plantarii* y *S. rubidaea*.

Mancha	Valor de Rf	<i>B. plantarii</i>				<i>S. rubidaea</i>			
		Glicerol		Glucosa		Glicerol		Glucosa	
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	*	*	*	-	*	*	*	*
R5	0.80 ± 0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
R4	0.73 ± 0.02	*	*	*	*	*	*	*	*
R3	0.60 ± 0.04	*	*	*	*	*	*	-	*
R2	0.45 ± 0.04	*	*	*	-	*	*	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	*	-	-	-

El análisis por HPLC-ELSD evidenció que *B. plantarii* fue capaz de producir especies de BS con tiempos de retención cercanos a 13 min.

En la Figura 7.16 se muestran los cromatogramas de los productos analizados, la línea en color negro corresponde a los tratamientos con sulfato de amonio y en azul los que tienen nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, la Figura 7.16a es de los BS producidos por *B. plantarii*-glicerol donde sobresalen los picos en 20 y 24 min, ocurre algo similar al sustituir la fuente de carbono (Figura 7.16c). Los productos de *S. rubidaea*-glicerol (Figura 7.16 b) se observan picos en 17 y 24 min, sin embargo, los productos de los medios con glucosa sólo se observa señal alrededor de 1.5 min (Figura 7.16 d).

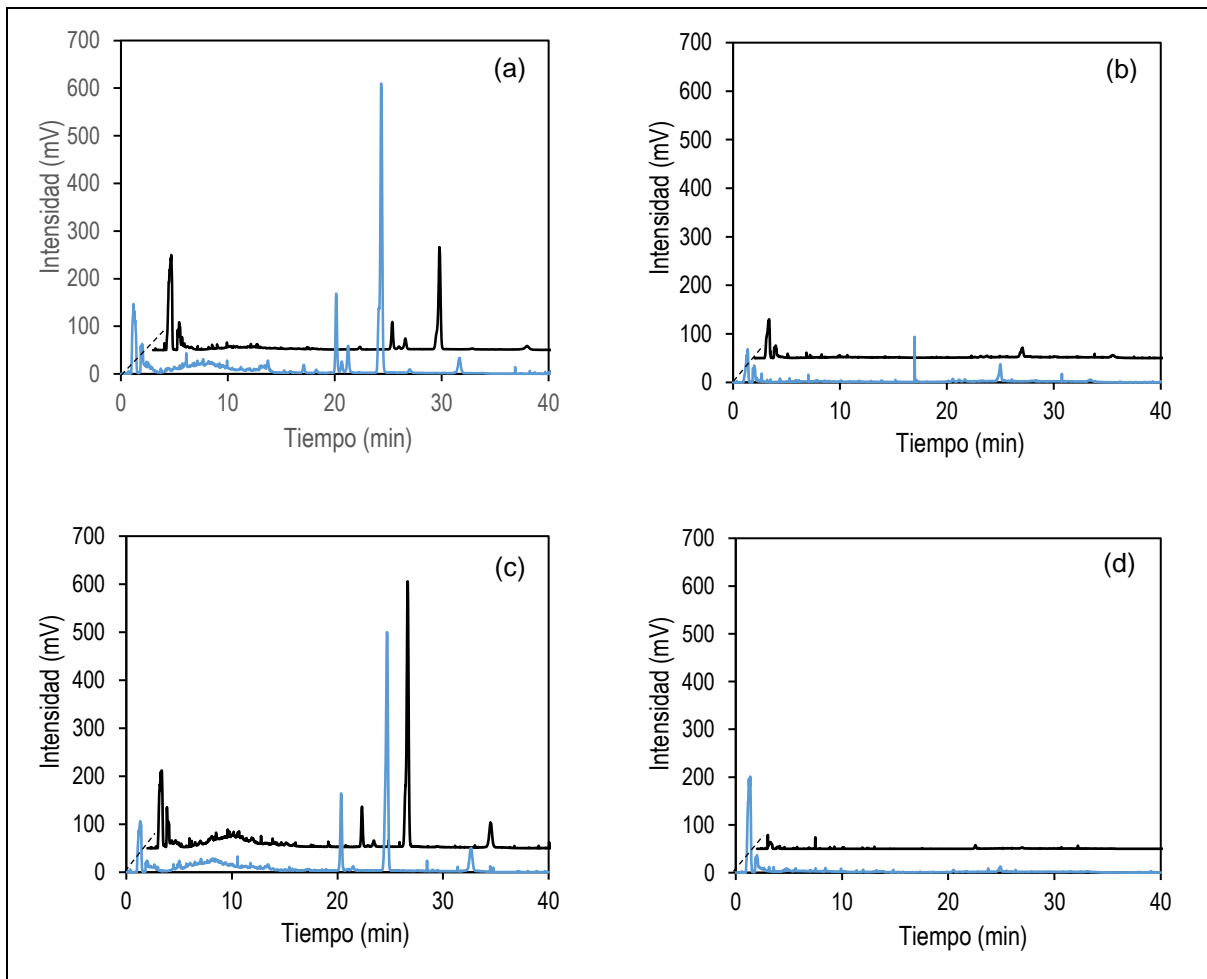


Figura 7.16 Cromatogramas de los BS producidos por *B. plantarii* (a-glicerol, c-glucosa) y *S. rubidaea* (b-glicerol, d-glucosa) en cultivo líquido con aceite de soya, la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se distingue por línea negra- NH_4^+ y línea azul- NO_3^- .

En la Tabla 7.13 se muestran los tiempos de retención y áreas de cada una de las especies encontradas en los BS producidos por *B. plantarii* después de 12 días de incubación usando cultivo en medio líquido, en los productos donde se usó

medio Gli-NO₃⁻ y Glu-NH₄⁺ se encontraron tres señales con tiempos de retención alrededor de los 13 min cuyos porcentajes de área oscilan entre 0.14 y 1.55%. A los 20 y 24 min se observan picos con porcentajes de área mayores al 40%, estos también se encontraron en los productos de CMS (Tabla 7.2).

Tabla 7.13 Análisis por HPLC-ELSD: BS producidos por *B. plantarii* en cultivo líquido.

Gli-NH ₄ ⁺		Gli-NO ₃ ⁻		Glu-NH ₄ ⁺		Glu-NO ₃ ⁻	
tr min	área %	tr min	área %	tr min	área %	tr min	Área %
1.7	41.66	1.2	15.31	1.4	16.58	1.3	16.67
19.3	0.57	13.1	0.81	13.1	0.30	20.4	13.81
22.4	6.46	13.4	1.01	13.3	0.14	24.7	61.42
23.6	3.05	13.7	1.55	13.9	0.19		
26.8	32.68	20.1	9.08	20.3	4.24		
		24.3	46.77	24.7	40.46		

tr- tiempo de retención

Para los BS producidos por *S. rubidaea* en cultivo líquido no se encontraron picos que coincidieran en tiempo de retención con el estándar de RL, en la Tabla 7.14 se muestran los tiempos de retención y áreas relativas de las especies producidas por esta bacteria.

Tabla 7.14 Análisis HPLC-ELSD: productos de *S. rubidaea* obtenidos en cultivo líquido, tiempos de retención y áreas relativas.

Gli-NH ₄ ⁺		Gli-NO ₃ ⁻		Glu-NH ₄ ⁺		Glu-NO ₃ ⁻	
tr min	área %	tr min	área %	tr min	área %	tr min	área %
1.3	65.58	1.4	46.77	1.3	57.21	1.4	85.17
25.1	14.20	20.6	2.65	20.6	16.32	20.5	1.03
33.5	1.50	21.2	2.12			24.9	3.38
		21.7	2.27				
		25.0	21.70				

tr- tiempo de retención

El análisis por espectroscopia infrarroja de los productos del cultivo líquido permitió la identificación de diferentes grupos funcionales presentes en los extractos, en las Figuras 7.17 y 7.18 se muestran los espectros de *B. plantarii* mientras que las Figuras 7.19 y 7.20 corresponden *S. rubidaea*.

Para los extractos de *B. plantarii* y *S. rubidaea* en los tratamientos evaluados se encontraron las bandas correspondientes al estiramiento de enlace en el grupo –OH (alrededor 3430 - 3240 cm^{-1}), los correspondientes a –CH₂–, –CH₃ (2920 a 2850 cm^{-1}) y alrededor de 1740 cm^{-1} el estiramiento simétrico de un grupo funcional éster, aunque en el espectro del extracto producido en medio Gli-NH₄⁺ de *B. plantarii* la banda en 1706 cm^{-1} corresponde a la vibración en el carbonilo de un ácido carboxílico y se aprecia una banda de intensidad baja en 723.31 cm^{-1} que pudiera ser asigna a la cadena lipídica.

Cada uno de los extractos presentaron *huellas digitales* (bandas de absorción entre 1500-400 cm^{-1}) distintas, pero es de resaltar que el porcentaje de transmitancia de las bandas en 2920 y 2850 cm^{-1} para el extracto del cultivo líquido de *B. plantarii* en medio Gli-NO₃⁻ presentan una intensidad y perfil similar al estándar de RL utilizado como referencia. En los productos de *S. rubidaea* obtenidos de los medios Gli-NH₄⁺, Gli-NO₃⁻ y Glu-NO₃⁻ se observan bandas en 2920, 2850 y 1740 cm^{-1} con intensidad marcada, en el producto del medio Glu-NH₄⁺ se observa la presencia de dichas bandas con menor intensidad.

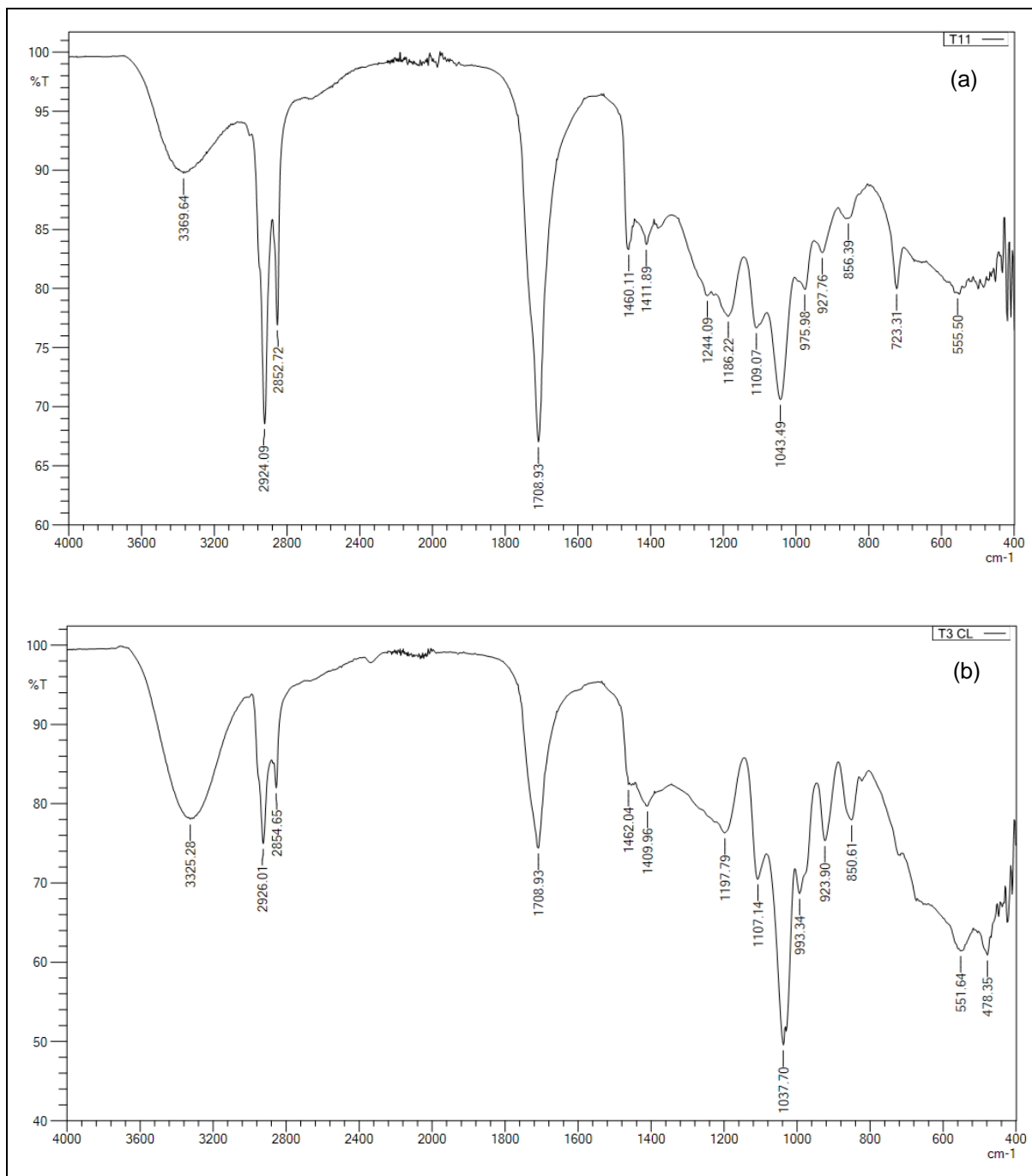


Figura 7. 17 Espectro FTIR de los productos de *B. plantarii* obtenidos por cultivo líquido utilizando aceite de soya en combinación con medio Gli-NH₄⁺ (a), Gli-NO₃⁻ (b).

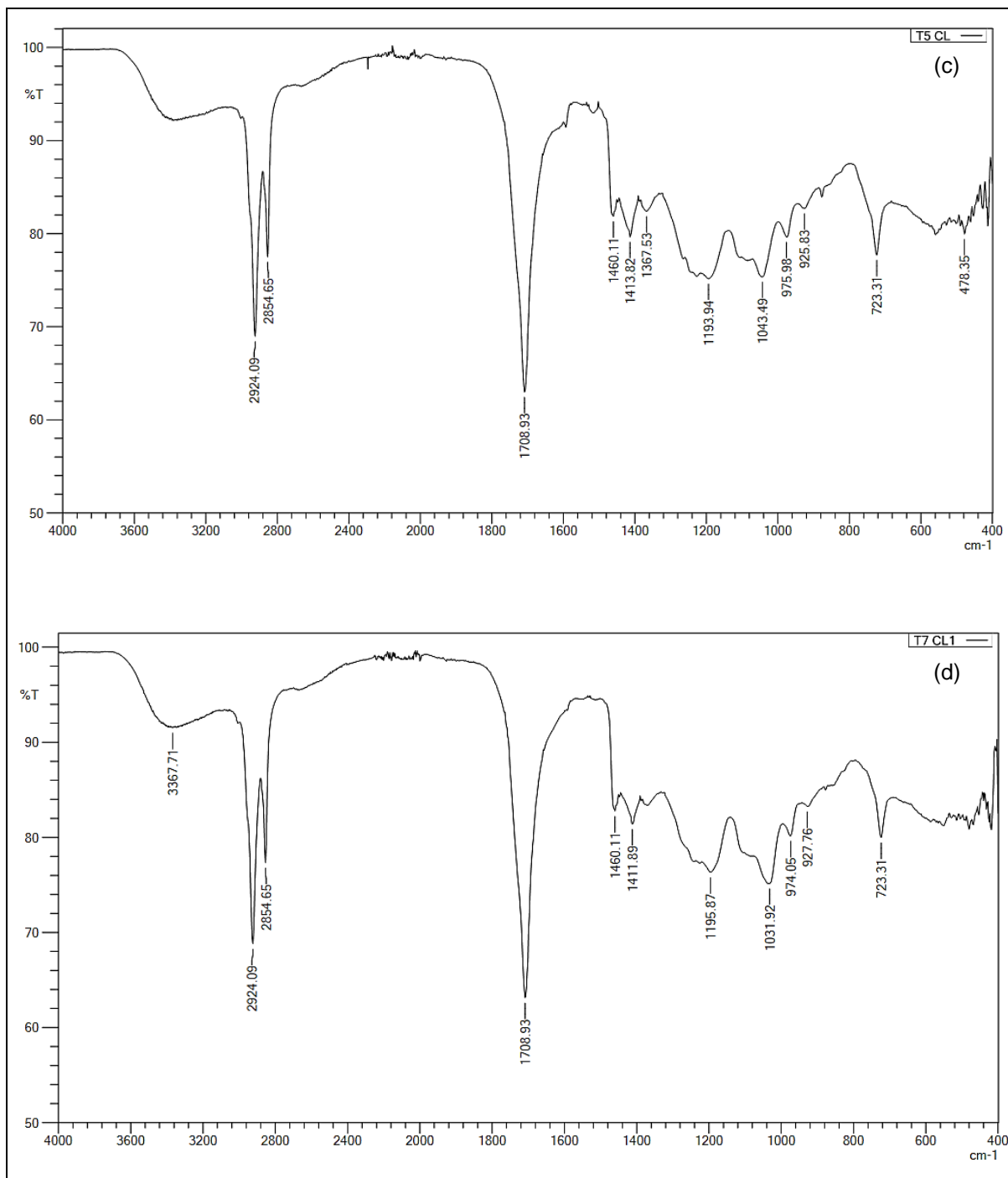


Figura 7.18 Espectro FTIR de los productos de *B. plantarii* obtenidos por cultivo líquido utilizando aceite de soja en combinación con medio Glu-NH₄⁺ (c), Glu-NO₃⁻ (d)

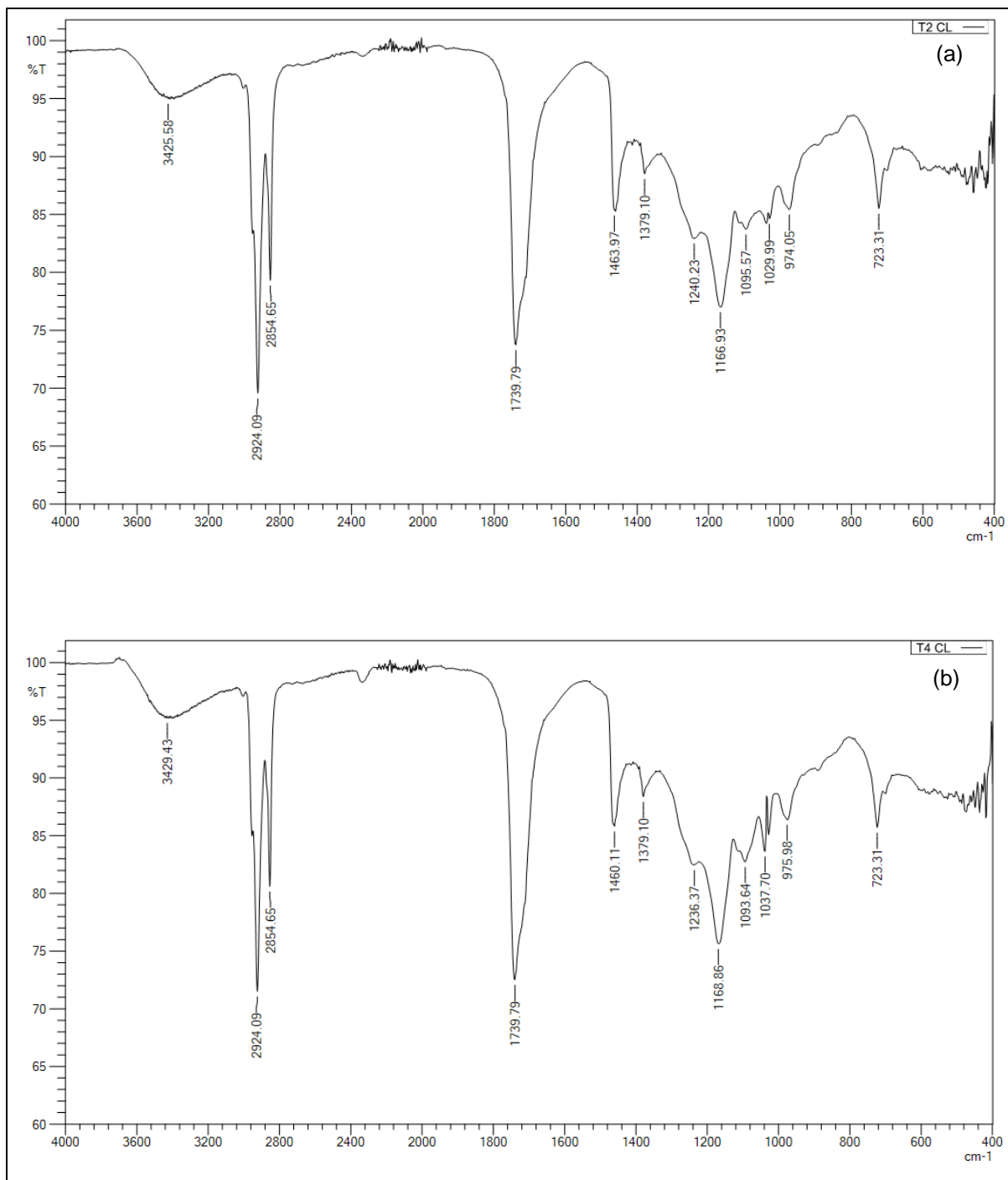


Figura 7. 19 Espectros FTIR de los productos de *S. rubidaea* al crecer durante 12 días en un sistema líquido con medio Gli-NH₄⁺ (a), Gli-NO₃⁻ (b).

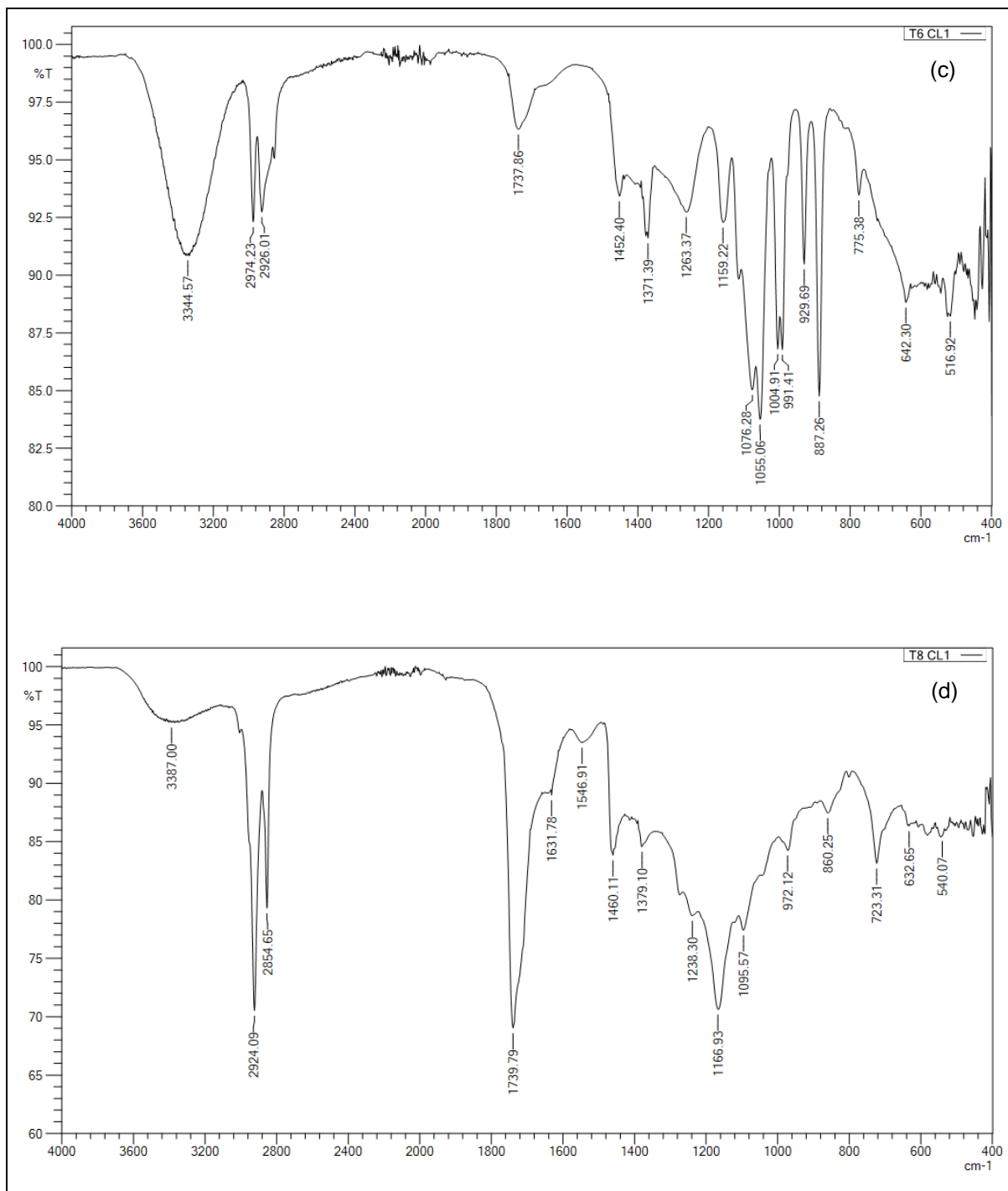


Figura 7.20 Espectros FTIR de los productos de *S. rubidaea* al crecer durante 12 días en un sistema líquido con medio Glu-NH₄⁺ (c), Glu-NO₃⁻ (d) adicionados con aceite de soya.

El cambio en la tensión superficial para los productos del cultivo líquido se determinó a 7.1 ppm en la Tabla 7.15 se presentan los valores obtenidos, a la concentración de BS evaluada, solo el producido por *B. plantarii* en medio Gli-NH₄⁺ disminuyó hasta 35.63 mN/m la tensión superficial.

Tabla 7.15 Análisis de la tensión superficial de los BS producido en cultivo líquido

Medio	Tensión superficial (mN/m)			
	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
<i>B. plantarii</i>	35.62	47.55	47.26	46.82
<i>S. rubidaea</i>	51.07	50.28	70.87	56.91*

* valor obtenido para 10.7 ppm

Al ser el producto de *B. plantarii* del medio Gli-NH₄⁺ el que disminuyó más la tensión superficial, se elaboró una curva de tensión superficial y se comparó con el estándar de ramnolípido. En la Figura 7.18 se observa que la velocidad de disminución de la tensión superficial usando el producto de *B. plantarii* es mayor respecto al estándar de RL R90, también se muestra el perfil del estándar R90 al haber considerado la pureza (marcador en cruz).

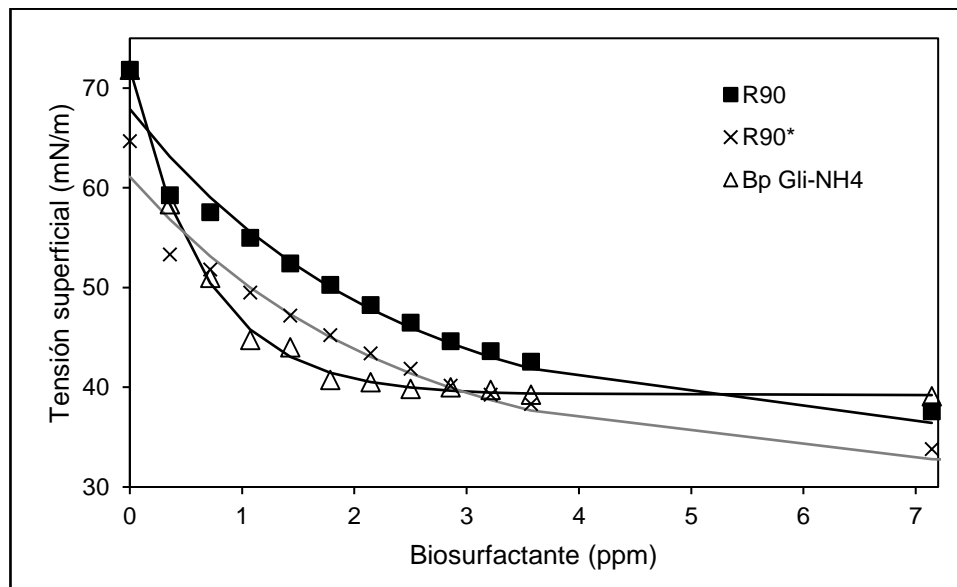


Figura 7.21 Perfil de tensión superficial del BS de *B. plantarii* producido en medio Gli-NH₄⁺ usando sistema de cultivo líquido (triángulos vacíos) y estándar de RL R90 (cuadrados rellenos), el marcador en cruz representa el equivalente al estándar a 100% de pureza, las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo matemático propuesto.

Al modelar los datos experimentales siguiendo la metodología descrita en la sección 6.6.2 se obtuvieron valores de $k= 1.50$ mN·ppm/m, $A= 39.22$ mN/m, $B=0.83$ mN/m para el producto de *B. plantarii*, los valores para el estándar de ramnolípido fueron $k=0.44$ mN·ppm/m, $A=34.99$ mN/m, $B=32.91$ mN/m, si se considera la pureza del estándar los valores de los parámetros serían 0.44, 31.49 y 29.62 respectivamente.

7.10 Comparación de sistemas de cultivo

En esta sección se retoman algunos de los resultados que se mostraron anteriormente con el fin de comparar los resultados obtenidos en CMS respecto a CL para ambas bacterias. En la Tabla 7.16 se muestran las producciones de RL alcanzadas en ambos sistemas de cultivo, aunque la cuantificación del extracto recuperado con AcOEt desde el CMS, considerado como BS crudo (es decir que aún contenía aceite residual) se realizó por triplicado, sin embargo, la cuantificación realizada como gramos equivalentes de RL se logró con el análisis por HPLC-ELSD de uno de los extractos recuperados del CMS.

Tabla 7.16 Producción de BS en CMS y CL

Microorganismo	<i>B. plantarii</i>		<i>S. rubidaea</i>	
	CMS	CL*	CMS	CL*
Medio de cultivo	(g _{Eq} RL/ L _{Sl})	(g RL /L _{Sl})	(g _{Eq} RL/ L _{Sl})	(g RL /L _{Sl})
Gli-NH ₄ ⁺	3.13	3.96 ± 1.61	3.33	1.54 ± 0.22
Gli-NO ₃ ⁻	2.87	1.67 ± 0.23	2.68	1.96 ± 0.10
Glu-NH ₄ ⁺	3.32	0.53 ± 0.08	3.2	3.56 ± 1.98
Glu-NO ₃ ⁻	2.71	1.49 ± 0.13	2.71	0.35 ± 0.04

L_{Sl} litros de solución de impregnación

*Resultados representados como media ± desviación estándar, de tres unidades experimentales

Hubo diferencia en la producción de RL debida a las combinaciones de entre fuente de carbono y nitrógeno, en cuanto al sistema de cultivo se observó que *B. plantarii* tuvo mayor producción en CMS respecto a CL a pesar de que el error experimental en el CL con medio Gli-NH₄⁺ haya sido del 50%. Para *S. rubidaea* también se encontró diferencia en la producción debida al sistema de cultivo, en CMS la producción fue ligeramente mayor cuando se utiliza NH₄⁺ en combinación

con las fuentes de carbono respecto a los resultados obtenidos con NO_3^- , en cuanto a los resultados obtenidos en CL con medio Glu-NH_4^+ se registró la mayor producción.

A continuación, se presentan los cromatogramas para los productos del CMS y CL, en la Figura 7.22 se muestran el análisis de los productos de *B. plantarii*, cuando el glicerol es la fuente de carbono en CMS se encontraron picos similares entre los sistemas de cultivo alrededor de los 20 y 24 min, se observó que en el tratamiento con medio Gli-NO_3^- tuvo mayor intensidad respecto a los productos obtenidos en CL, mientras que en el medio Gli-NH_4^+ se encontraron señales en 20 y 24 min con mayor intensidad en los extractos del CL respecto al CMS.

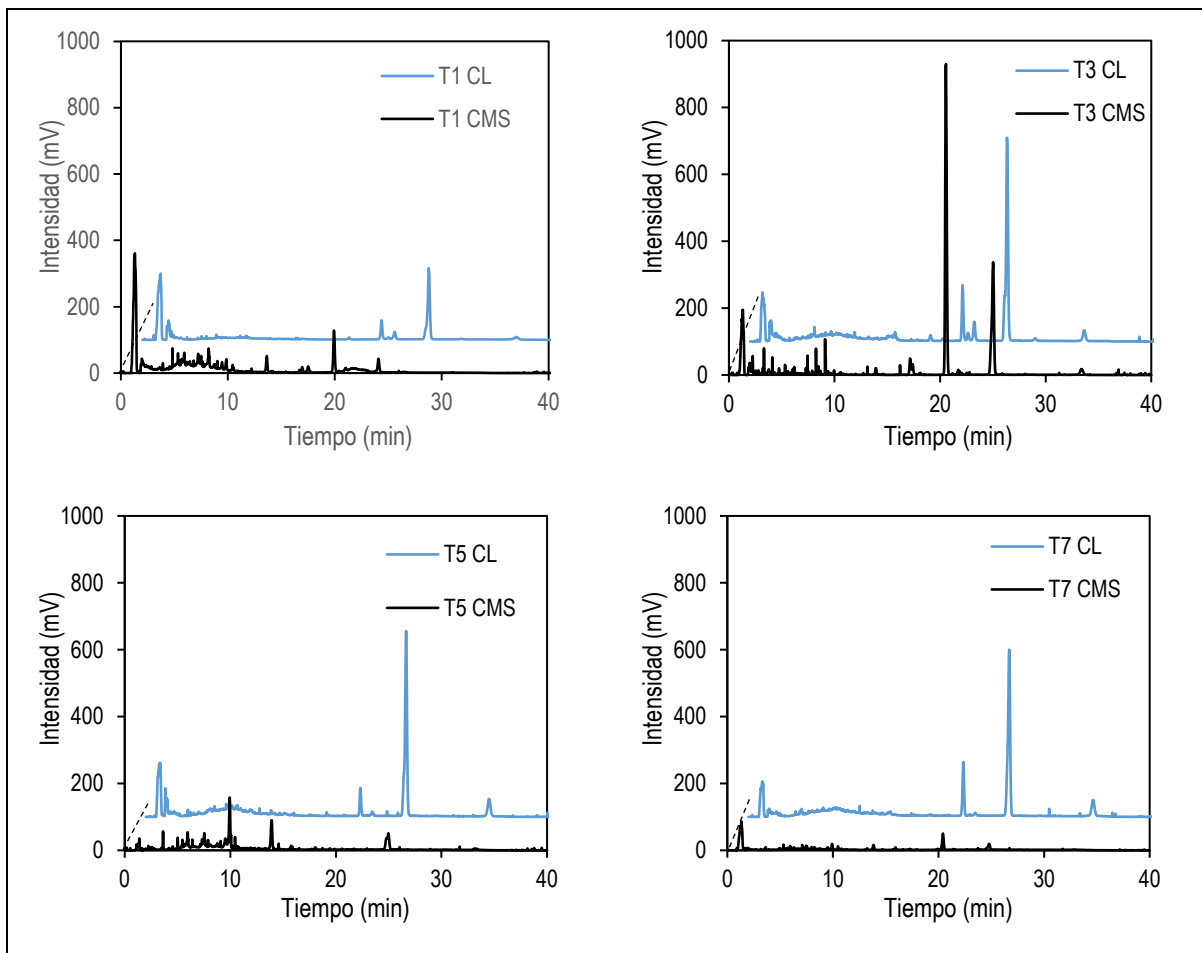


Figura 7. 22 Cromatogramas de los RL producidos por *B. plantarii* en CMS (negro) y CL (azul), T1: Gli-H₄⁺; T3: Gli-NO₃⁻; T5: Glu-NH₄⁺; T7: Glu-NO₃⁻.

Los extractos obtenidos del CMS de *S. rubidaea* dieron señal a los 20 y 24 min en los medios con glicerol mezclados con las fuentes de nitrógeno evaluadas, con NH₄⁺ en CMS se apreció una señal a los 20 min mientras en CL solo se encontraron señales en los primeros minutos. En los medios con glucosa en combinación con las fuentes de nitrógeno se detectaron señales en los primeros 5 min del análisis que de acuerdo con el gradiente de disolventes empleado se trata de especies polares, muy probablemente la fuente de carbono.

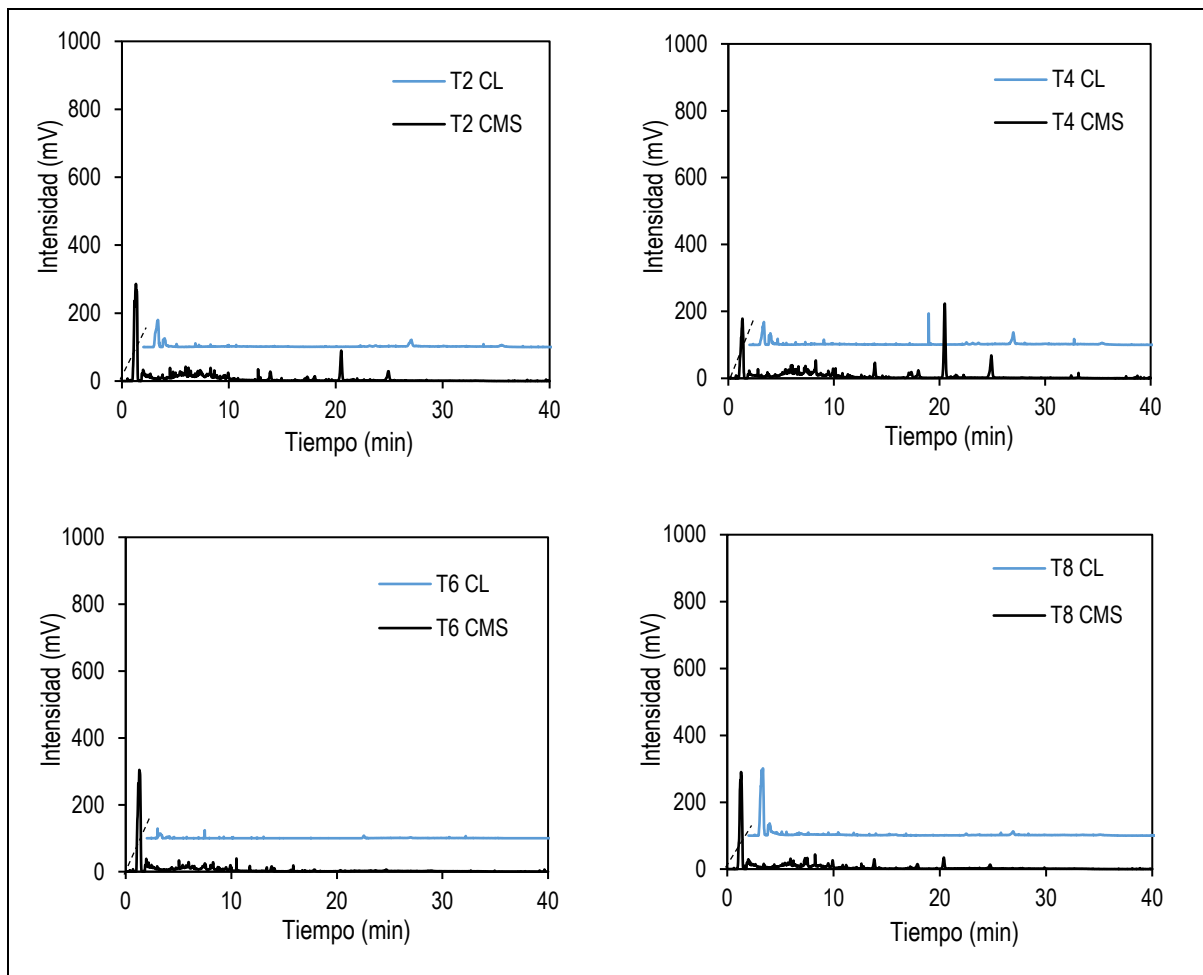


Figura 7. 23 Cromatogramas de los RL producidos por *B. plantarii* en CMS (negro) y CL (azul), T1: Gli-H₄⁺; T3: Gli-NO₃⁻; T5: Glu-NH₄⁺; T7: Glu-NO₃⁻.

El extracto de aserrín que se recuperó con AcOEt presentó señales a los 1.2, 13.7, 17.6, y 24.2 min, algunas de estas señales se encontraron en los productos recuperados del CMS, con base en los cromatogramas de los productos del CMS y CL se encontraron perfiles similares en los productos de *B. plantarii* usando medio Gli-NO₃⁻ en ambos sistemas de cultivo, lo que es un indicativo de que los compuestos presentes en el extracto no sólo provienen del soporte (aserrín) sino que hay contribución de los cultivos bacterianos. Por otro lado, con la caracterización de los productos mediante HPLC-ELSD se pudo observar que hay una menor presencia de compuestos de interés en los productos de *S. rubidaea*.

En la Tabla 7.17 se resumen los números de onda de las bandas de absorción en el análisis por FTIR para los extractos recuperados del CMS y CL de *B. plantarii*, las Figuras 7.24 y 7.25 muestran los espectros FTIR de los BS producidos en CMS y CL usando los medios de cultivo evaluados. En la Tabla 7.18 se resumen las bandas coincidentes en número de onda entre los productos de CMS y CL de *S. rubidaea*, las Figuras 7.26 y 7.28 se muestran los espectros FTIR.

Se puede observar que hay coincidencia y similitud entre las bandas presentes en los extractos recuperados del CMS y CL. Se encontró que la vibración del grupo carbonilo en los productos de *B. plantarii* es característico de un ácido carboxílico (alrededor de 1700 cm^{-1}) mientras que, en los productos de *S. rubidaea* la banda aparece en 1740 cm^{-1} que responde al carbonilo presente en un grupo éster.

La deformación de tipo balanceo para el grupo -OH se observó en los extractos del CMS, CL y del soporte para ambas bacterias. La banda del estiramiento simétrico en el enlace -C-O-C- presente en el anillo de ramnosa se encontró en los productos de ambas bacterias, excepto para el extracto del CMS y CL de *B. plantarii* con medio Gli-NH_4^+ . Otra de las bandas de interés que sugiere la vibración de los enlaces en la cadena hidrocarbonada (aparece en 723cm^{-1}) se registró en los extractos del CMS y CL de *B. plantarii* en los medios con glucosa y ambas fuentes de nitrógeno. En los extractos de *S. rubidaea* dicha banda fue encontrada en los extractos de todos los cultivos en CL y en el extracto del CMS con medio Gli-NO_3^- .

Tabla 7. 17 Resumen de las bandas de absorción presentes en los extractos recuperados con AcOEt del CMS y CL con *B. plantarii*.

Extracto de aserrín	Gli-NH ₄ ⁺		Gli-NO ₃ ⁻		Glu-NH ₄ ⁺		Glu-NO ₃ ⁻	
	CL	CMS	CL	CMS	CL	CMS	CL	CMS
33340	3369.64	3400	3325.28	3313.71	3429	3431.36	3367.71	3352.28
2926.06	2924.09	2926.01	2926.01	2927.94	2924.09	2926.01	2924.09	2924.09
2864.65	2852.72	2852.72	2854.65	2852.72	2854.65	2854.65	2854.65	2854.65
1703.14	1708.93	1707	1708.93	1703.14	1708.93	1708.93	1708.93	1708.93
1462.04	1460.11	1460.11	1462.04		1460.11	1460.11	1460.11	1462.04
1381.03	1411.89	1382.96	1409.96	-	1413.82		1411.89	-
1247.94	1244.09	1240.23		1224.8		1236.37		1238.3
1176.58	1186.22	1172.72	1197.79	-	1193.94	-	1195.87	-
1128.36	1109.07	1107.14	1107.14	-		1097.5	-	-
-	1043.49	-	1037.7	-	1043.49	1037.7	1031.92	-
1026.13	-	-	-	1029.99	-	1029.99	-	1029.99
823.6	856.39	-	850.61	-	-	-	-	-
-	-	831.32	-	-	-	831.32	-	821.68
-	723.31	-	-	-	723.31	725.23	723.31	721.38
-	555.5	-	551.64	553.57	-	-	-	547.78

Tabla 7. 18 Resumen de las bandas de absorción presentes en los extractos recuperados con AcOEt del CMS y CL con *S. rubidaea*.

Extracto de aserrín	Gli-NH ₄ ⁺		Gli-NO ₃ ⁻		Glu-NH ₄ ⁺		Glu-NO ₃ ⁻	
	CL	CMS	CL	CMS	CL	CMS	CL	CMS
33340	3425.58	3323.35	3429.43	3360	3344.57	3383.14	3387	3398.57
2926.06	2924.09	2927.94	2924.09	2926.01	2926.01	2924.09	2924.09	2924.09
2864.65	2854.65	2856.58	2854.65	2854.66		2854.65	2854.65	2854.65
-	1739.79		1739.79		1737.86		1739.79	1739.79
1703.14	-	1710.86	-	1708.93	-	1708.93	1631.78	1512.19
1462.04	1463.97	1452.40	1460.11	1452.4	1452.4	1462.04	1460.11	1462.04
1381.03	1379.10		1379.1	1375.25	1371.39	1381.03	1379.1	1369.46
-	-	1267.23	-	1267.23	-	-	-	-
1247.94	1240.23	-	1236.37	1238.3	1263.37	1238.3	1238.3	-
1176.58	1166.93	1159.22	1168.86	1159.22	1159.22	1161.15	1166.93	1161.15
1128.36	-	1111.00	-	1112.93	-	-	-	-
1026.13	1029.99	1035.77	1037.7	1035.77	1004.91	1022.27	-	1026.13
823.6	-	852.54	-	823.6	887.26	-	860.25	-
-	723.31	-	723.31	694.37	775.38	-	723.31	-

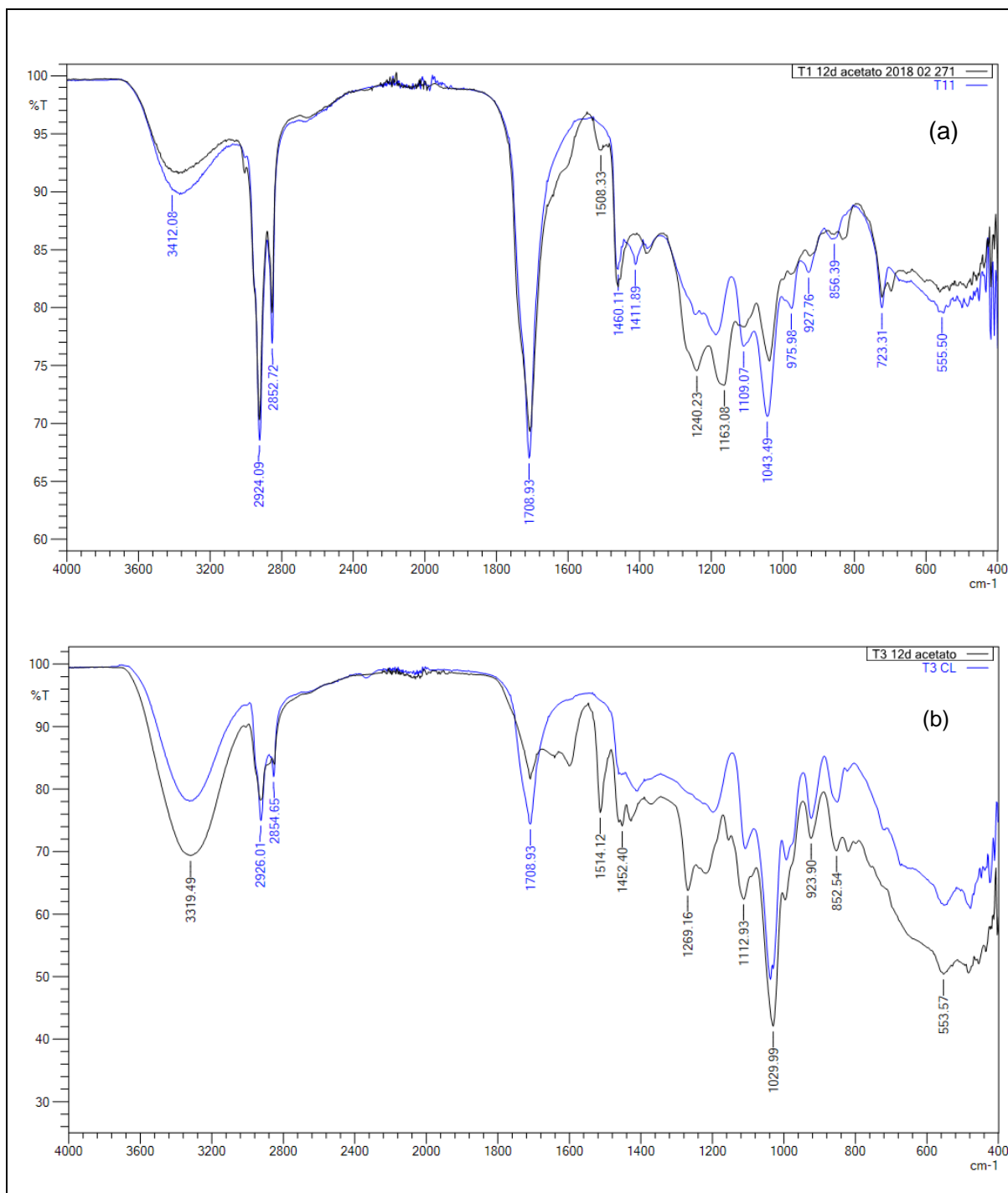


Figura 7. 24 Comparativa producidos por *B. plantarii* en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Gli-NH₄⁺ (a) y Gli-NO₃⁻ (b).

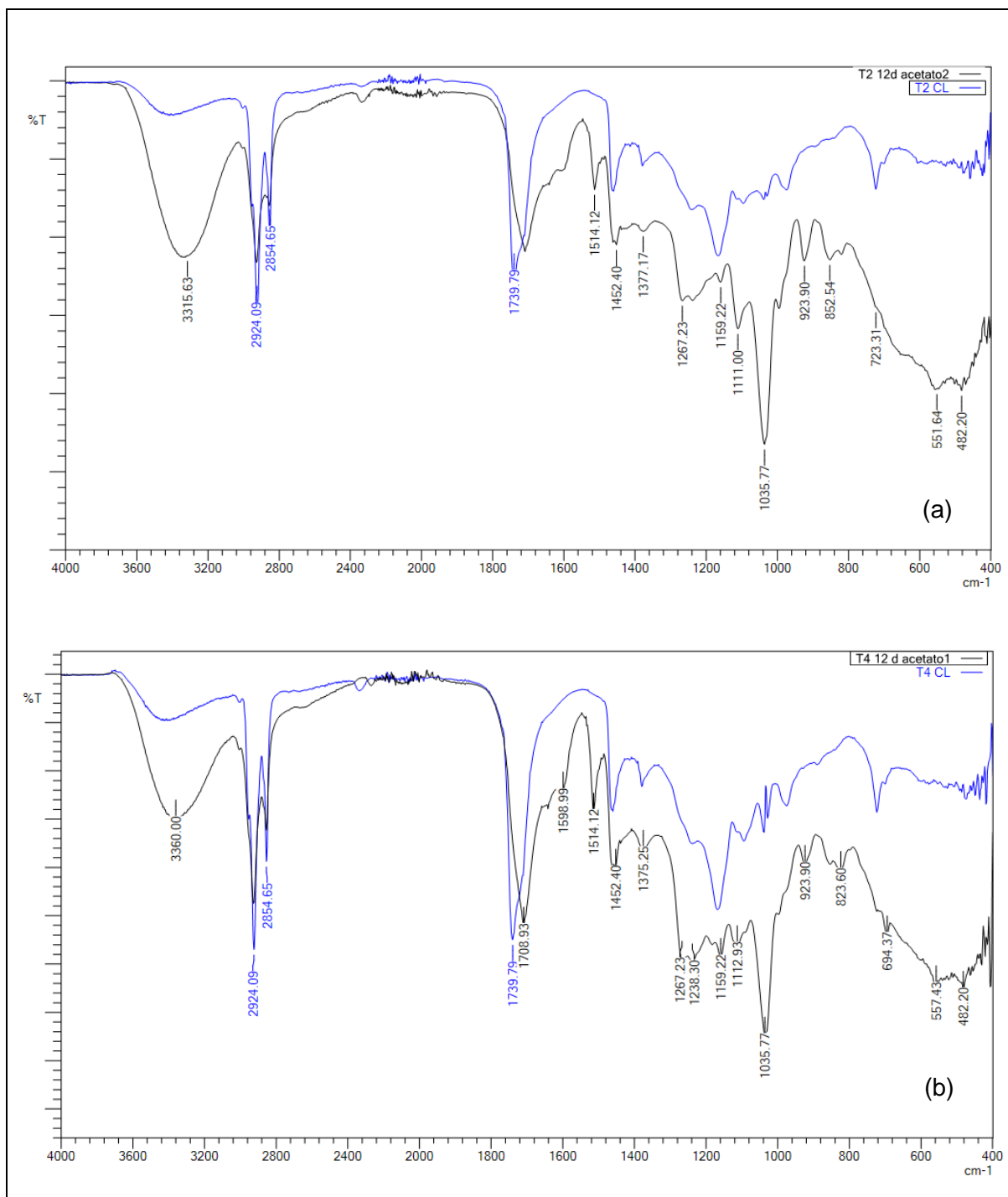


Figura 7. 25 Comparativa producidos por *B. plantarii* en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Glu-NH_4^+ (a) y Glu-NO_3^- (b).

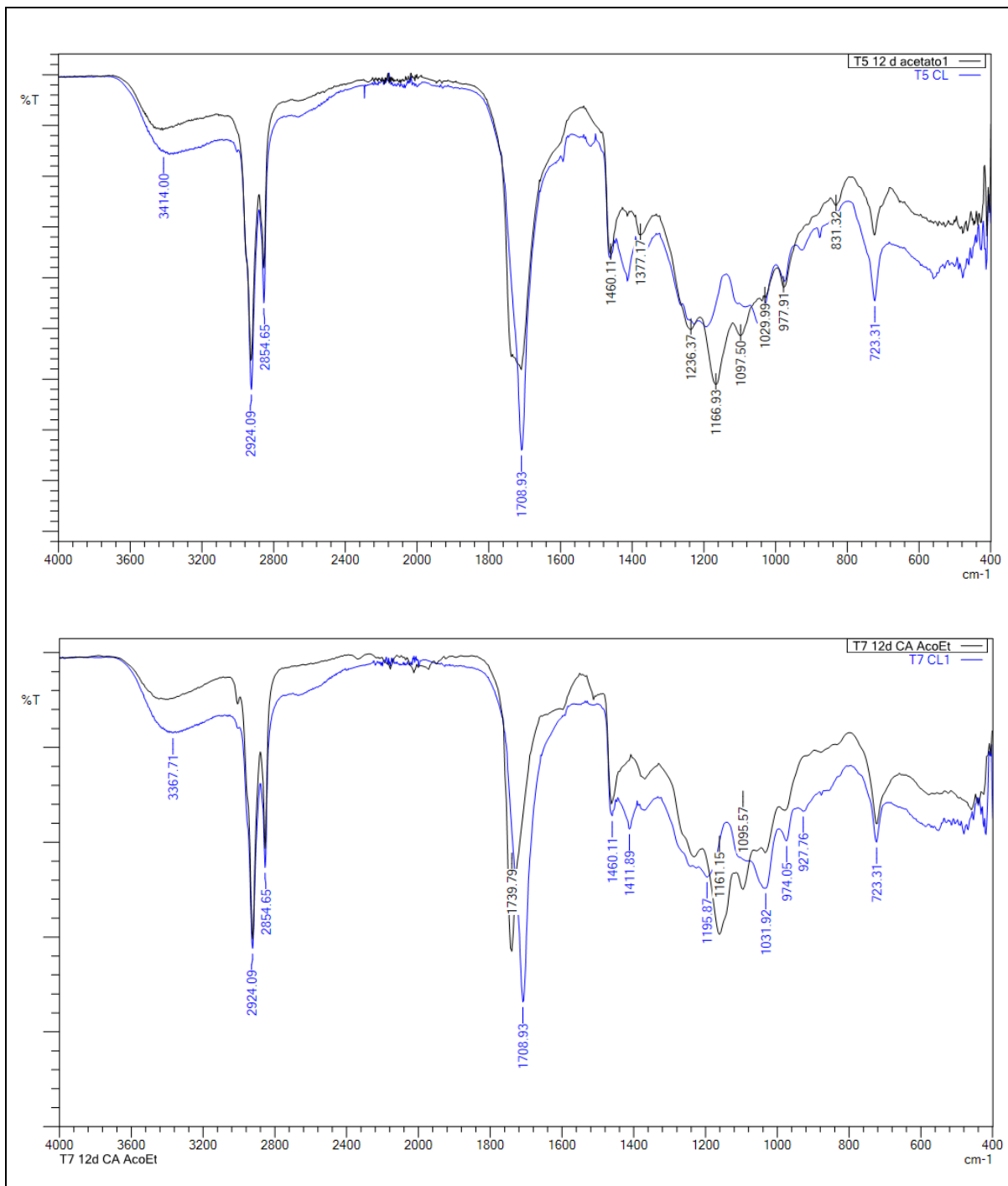


Figura 7. 26 Comparativa producidos por *S. rubidaea* en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Gli-NH₄⁺ (a) y Gli-NO₃⁻ (b).

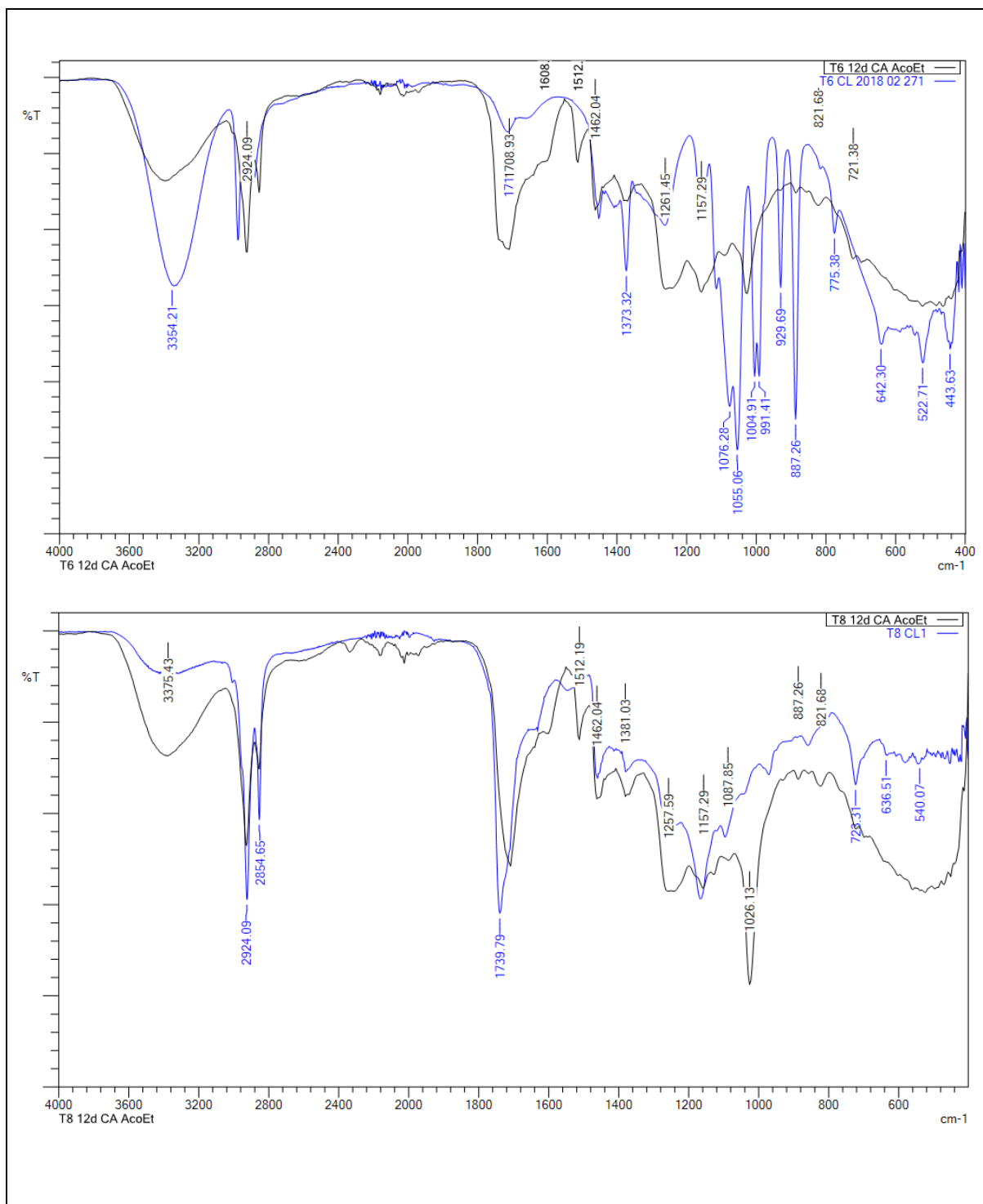


Figura 7. 27 Comparativa producidos por *S. rubidaea* en CMS (línea negra) y CL (línea azul) creciendo en medio Glu-NH₄⁺ (a) y Glu-NO₃⁻ (b).

En cuanto al cambio de la tensión superficial del agua empleando los extractos obtenidos de los diferentes cultivos usando una concentración de 7.1 ppm se encontró que el BS producido en CL por *B. plantarii* en medio Gli-NH₄⁺ fue el que dio el valor más bajo, sin embargo la tensión superficial es una función dependiente de la concentración, ahora bien el objetivo principal de este trabajo fue la producción de BS en CMS, los extractos del CL se utilizaron para hacer la diferenciación de las moléculas que produce el microorganismo y poder diferenciarlas del aporte que da la resina del aserrín.

Tabla 7. 19 Cambio en la tensión superficial del agua con los extractos recuperados del CMS y CL.

Medio de cultivo	<i>B. plantarii</i>		<i>S. rubidaea</i>	
	CMS	CL	CMS	CL
	(mN/ m)			
Gli-NH ₄ ⁺	54.53	35.62	58.56	51.07
Gli-NO ₃ ⁻	55.55	47.55	50.07	50.28
Glu-NH ₄ ⁺	60.34	47.26	65.97	70.87
Glu-NO ₃ ⁻	64.79	46.82	66.77	56.91*

* valor obtenido a 10.7 ppm

7.11 Conclusiones de la producción de BS en sistema de cultivo líquido y comparación entre CL y CMS

De acuerdo con los análisis realizados por CCF, HPLC-ELSD y FTIR a los productos obtenidos en sistema de cultivo en medio líquido se encontró que *B. plantarii* produce una molécula con actividad tensoactiva que tiene similitud con el estándar de ramnolípido. El BS producido por *B. plantarii* es capaz de reducir la tensión superficial del agua a un valor menor al establecido en la fracción arancelaria empleando una concentración menor que el estándar de ramnolípido.

B. plantarii y *S. rubidaea* en sistema de cultivo líquido y sólido producen moléculas que modifican la tensión superficial y que son más eficientes en comparación con un estándar de ramnolípido comercial. Por la revisión bibliográfica y con los resultados obtenidos en los diferentes análisis es muy probable que los biosurfactantes producidos en ambos sistemas de cultivo sean ramnolípidos, para hacer la confirmación de dicha premisa es recomendable realizar análisis especializados que permitan elucidar la estructura química y masa de la molécula,

así como la confirmación de la presencia de los genes responsables de la síntesis de ramnolípidos, su expresión y la presencia de las enzimas involucradas.

Se encontró que el sistema de cultivo influye en la producción de BS y la composición de éste. La producción de RL por *B. plantarii* usando medio Gli-NO₃⁻ y aceite de soya fue mayor en CMS (2.87 g_{E_q} RL/ L_{Sl}) respecto al CL (1.67 g RL/L_{Sl}), el análisis de estos extractos (recuperados con AcOEt) mediante HPLC-ELSD dio evidencia de especies menos polares alrededor de los 20 y 24 min, que en el análisis por FTIR presentaron bandas de absorción en números de onda característicos de grupos -OH, -C=O de un ácido carboxílico, -C-O-C- presentes en las cadenas hidrocarbonadas que forman parte del azúcar, cabe señalar que el extracto del CMS tiene gran similitud con el espectro del aserrín, pero el extracto del CL permitió corroborar que la capacidad de modificar la tensión superficial del extracto del CMS no es sólo efecto de la resina presente en el aserrín sino también de la actividad metabólica del microorganismo.

A pesar de que el BS producido por *B. plantarii* no dio señales iguales al estándar de RL en los análisis por CCF, HPLC-ELSD y FTIR la diferencia es explicable debido a que el estándar de RL R90 fue producido con alguna cepa de *Pseudomonas*, que en su gran mayoría tiene cadenas lipídicas C₁₀-C₁₀, mientras que el género *Burkholderia* produce RL con cadenas lipídicas de longitud C₁₄-C₁₄ (Kourmentza *et al.*, 2018).

8. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se produjeron biosurfactantes empleando un medio de cultivo reportado en la literatura y microorganismos no patógenos usando sistemas de cultivo en medio sólido y líquido. El uso de aceite de soya en el medio de cultivo favoreció la producción de especies con actividad surfactante.

Las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de los productos permitieron identificar las especies producidas y su similitud con un estándar comercial de ramnolípido. Los resultados obtenidos de la cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos, la espectroscopia infrarroja y la medición de la tensión superficial fueron consistentes entre los productos obtenidos en cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido, se observó diferencia en la composición de los productos obtenidos en los sistemas de cultivo empleados.

Las estrategias de recuperación del biosurfactante producido en sistema de cultivo sólido no resultaron ser selectivas, por lo que la cuantificación del producto presentó interferencias, debido a que la producción de RL favorece la solubilización del aceite residual del medio de cultivo.

El cultivo en medio sólido empleando glicerol como fuente de carbono en combinación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NaNO_3 y aceite de soya, con *B. plantarii* y *S. rubidaea* resultó en la producción de biosurfactante, hecho que concuerda con resultados de la medición de tensión superficial. La reducción de la tensión superficial no solo se debe a la presencia de la resina del aserrín sino también a la actividad metabólica de los microorganismos, hecho que se demostró con los extractos recuperados de los cultivos en medio líquido.

El análisis del producto por medio de la cromatografía en capa fina puso en evidencia la coincidencia en el valor del factor de retención (FR) entre el estándar de ramnolípido y algunos de los extractos del CMS (*B. plantarii*: medio Gli- NO_3^- / NH_4^+ y *S. rubidaea* cuando crece en glucosa combinada con NaNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

es posible que la mancha hallada corresponda a un Mono-RL que además de ser parecida al FR del estándar también ha sido reportado en la literatura.

El análisis por espectroscopia infrarroja permitió elucidar la estructura del RL producido por *B. plantarii* usando el medio glicerol- sulfato de amonio, ya que éste presenta vibraciones similares al estándar de RL con 90% de pureza y que es consistente con algunos espectros de ramnolípido reportados en la literatura.

La cromatografía en capa fina reveló la presencia de bandas con factores de retención similares a los de un ramnolípido comercial en los cultivos en medio sólido de *B. plantarii* en los tratamientos Gli- NH_4^+ ; Glu- NH_4^+ .

En términos del cambio en tensión superficial la combinación glicerol- NaNO_3 y aceite de soya usando el sistema de cultivo sólido y *B. plantarii* dio como resultado un biosurfactante que redujo la tensión superficial hasta 37.31 mN/m. En el sistema de cultivo líquido *B. plantarii* con medio glicerol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -aceite de soya produjo un BS más efectivo que el estándar de ramnolípido para reducir la tensión superficial. El BS de *B. plantarii* (Gli- NH_4^+) a 7.1 ppm disminuye la tensión superficial del agua desde 72.06 hasta 39.27 mN/ m, mientras que el ramnolípido comercial a la misma concentración disminuye la tensión superficial del agua hasta 37.59 mN/m.

Si bien el estándar llega a un valor similar de tensión superficial, la constante k en el modelo es mayor para el producto de *B. plantarii* (1.50 mN·ppm/m) en comparación con el estándar de ramnolípido (0.44 mN·ppm/m), lo cual indica que la rapidez de la disminución de la tensión superficial en función de la concentración del BS es mayor, cabe destacar que se emplearon concentraciones de BS menores a lo establecido en la fracción arancelaria. Esta metodología es novedosa, ya que permite la comparación sistemática y objetiva del desempeño del BS en la disminución de tensión superficial con diferentes reportes de la literatura.

Se recomienda utilizar en el cultivo en medio sólido otros soportes diferentes al aserrín para evitar interferencias de BS naturales, asimismo se recomienda el uso de glicerol como fuente de carbono en combinación con NaNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuentes de nitrógeno. Además, es importante que para la identificación del BS se

empleen técnicas analíticas más especializadas como RMN o HPLC-MS que den mayor información acerca de la estructura de la molécula producida.

Este trabajo aporta evidencia experimental para la producción de moléculas con actividad surfactante a partir de un sistema de cultivo en medio sólido utilizando microorganismos no patógenos y plantea nuevas estrategias para la producción de los ramnolípidos mediante el aprovechamiento de subproductos agroindustriales que sirvan como soporte- sustrato.

9. Referencias

1. Ábalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., García, F., y Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 17 (5), 1367-1371.
2. Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., y Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157 (2), 329-345.
3. Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., y Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (5), 1323-1336.
4. Abdel-Mawgoud, A. M., Hausmann, R., Lépine, F., Müller, M. M., y Déziel, E. (2011). Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. En: *Biosurfactants*. (pp. 13-55). Springer, Berlin, Heidelberg.
5. Ahmed, E. F., y Hassan, S. S. (2013). Antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Serratia marcescens* S10. *Journal of Al-Nahrain University-Science*, 16 (1), 147-155.
6. Almatawah, Q. (2017). An Indigenous Biosurfactant Producing *Burkholderia cepacia* with High Emulsification Potential towards Crude Oil. *J Environ Anal Toxicol*, 7 (528), 2161-0525.
7. Álvarez-Ordóñez, A., y Prieto, M. (2012). Technical and methodological aspects of fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology research. En: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology*. (pp. 1-18). Springer, Boston, MA.
8. Andrä, J., Rademann, J., Howe, J., Koch, M. H., Heine, H., Zähringer, U., y Brandenburg, K. (2006). Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biological chemistry*, 387 (3), 301-310.
9. Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A., y Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3 7(2), 144-152.
10. Bages, S., White, D. A., Winterburn, J. B., Webb, C., y Martin, P. J. (2018). Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. *Biochemical Engineering Journal*. 139. 85-94.
11. Babu, P. S., Vaidya, A. N., Bal, A. S., Kapur, R., Juwarkar, A., y Khanna, P. (1996). Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnology letters*, 18 (3), 263-268.
12. Bondarenko, O., Rahman, P., Rahman, T., Kahru, A. y Ivask, A. (2010). Effects of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* DS10- 129 on luminescent bacteria: toxicity and modulation of cadmium bioavailability. *Microbial Ecology*. 59, 588-600.
13. Burger, M. M., Glaser, L., y Burton, R. M. (1963) The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 238 (8): 2595-2602.
14. Camilios-Neto, D., Alexandre- Meira, J., Araújo, J. M., Mitchel, D. A. y Krieger, N. (2008). Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid- state culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 81, 441- 448.
15. Camilios-Neto, D., Bugay, C., de Santana-Filho, A. P., Joslin, T., de Souza, L. M., Sasaki, G. L., y Krieger, N. (2011). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of

- sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (5), 1395-1403.
16. Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J., y Miller, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170 (2), 569-574.
 17. Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., y Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (2), 589-602.
 18. Costa, S. G., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., y Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, 41 (2), 483-488.
 19. Costa, S. G. V. A. O., Déziel, E., y Lépine, F. (2011). Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Letters in Applied Microbiology*, 53 (6), 620-627.
 20. Daverey, A., y Pakshirajan, K. (2010). Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (7), 2090-2101.
 21. De, S., Malik, S., Ghosh, A., Saha, R., y Saha, B. (2015). A review on natural surfactants. *RSC advances*, 5 (81), 65757-65767.
 22. De Rienzo, M. D., Kamalanathan, I. D., y Martin, P. J. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*, 51 (7), 820-827.
 23. Draper, N. R. Smith, H. (1998). *Applied Regression Analysis*. John Wiley, New York.
 24. Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., y Lépine, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology*, 9 (1), 263.
 25. Ewing, W. H., Davis, B. R., Fife, M. A., y Lessel, E. F. (1973). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb *et al.* (formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23 (3), 217-225.
 26. Funston, S. J., Tsaousi, K., Rudden, M., Smyth, T. J., Stevenson, P. S., Marchant, R., y Banat, I. M. (2016). Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (18), 7945-7956.
 27. Giraud, M. F., Leonard, G. A., Field, R. A., Berlind, C., y Naismith, J. H. (2000). RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7 (5), 398-402.
 28. Goossens, E., Wijnants, M., Packet, D., y Lemièrre, F. (2016). Enhanced separation and analysis procedure reveals production of tri-acylated mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma aphidis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43 (11), 1537-1550.
 29. Govindammal, M. (2014). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* isolated from Mangrove Ecosystem. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 5 (2), 108- 115.
 30. Griffin, W., 1954. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5, 235-249.

-
31. Gunther, N. W., Nunez, A., Fett, W., y Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5), 2288-2293.
 32. Gudiña, E. J., Rodrigues, A. I., Alves, E., Domingues, M. R., Teixeira, J. A., y Rodrigues, L. R. (2015). Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresource technology*, 177, 87-93.
 - 33.- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. y Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 379-387.
 34. Hausmann y Sylđatk (2015). Types and classification of microbial surfactants. En: Kosaric y Vardar-Sukan *Biosurfactants Production and utilization- processes, technologies, and economics*. (pp. 3-17). CRC Press Ed. E.U.A.
 35. Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T. H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., y Berensmeier, S. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (5), 1579-1590.
 36. Hörmann, B., Müller, M. M., Sylđatk, C., y Hausmann, R. (2010). Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112 (6), 674-680.
 37. Hořková, M., Ježdík, R., Schreiberová, O., Chudoba, J., Šír, M., Čejková, A. y Řezanka, T. (2015). Structural and physicochemical characterization of rhamnolipids produced by *Actinobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 193, 45-51.
 38. Irorere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (10), 3941-3951.
 39. Jiménez, I. D., Medina, R. S. A. y Gracida R. J. N. (2010). Propiedades, Aplicaciones y Producción de Biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient* 26: 65-84.
 40. Jork, H., Funk, W., Fischer, W. y Wimmer, H. (1990). Physical methods of detection. En: *Thin-Layer Chromatography*. (pp 9-47). VCH. Weinheim.
 41. Khire, J. M. (2010). Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). En *Biosurfactants* (pp. 146-157). Springer, New York, NY.
 42. Khoshdast, H., Sam, A., Vali, H., y Noghabi, K. A. (2011). Effect of rhamnolipid biosurfactants on performance of coal and mineral flotation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (8), 1238-1243.
 43. Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, B. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M., y Yoon, B. D. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70 (4), 391-396.
 44. Konishi, M. y Makino, M. (2018). Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125 (1), 105-110.
 45. Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., y Reis, M. A. M. (2018). *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresource Technology*, 247, 829-837.
 46. Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., y Yin, X. (2015). Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical engineering journal*, 101, 44-54.

-
47. Li, Q. (2017). Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11 (1), 27-36.
 48. Makkar, R.S., Cameotra, S.S. y Banat, I.M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1:5.
 49. Marchant, R. and Banat, I. (2012). Microbial biosurfactantes: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.* 30, 558-565.
 50. Mardigan, M.T. (2009). Fundamentos de biología molecular. En (Ed.10), *Brock: Biología de los microorganismos* (pp.203). Madrid, España: Pearson.
 51. Matsumaya, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. y Yano, I. (1990). Surface-Active Novel Glycolipid and Linked 3-Hidroxy Fatty Acids Produced by *Serratia rubidaea*. *J. Bacteriol.* 172 (6):3015-3022.
 52. McClements, D. J., y Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.
 53. Mitchell, D. A., von Meien, O. F., Krieger, N., y Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17 (1), 15-26.
 54. Mnif, I., y Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (13), 4310-4320.
 55. Moussa, T. A. A., Mohamed, M. S., y Samak, N. (2014). Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31 (4), 867-880.
 56. Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., y Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids—next generation surfactants?. *Journal of Biotechnology*, 162 (4), 366-380.
 57. Mulligan, C. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*. 133, 183-198.
 58. Nalini, S. y Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology*. 173: 231–238.
 59. Noordman, W.H. y Janssen, D.B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4502–4508.
 60. Ochsner, U.A., Hembach, T., y Fiechter, A. (1996). Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 53: 89–118.
 61. Pekin, G., Vardar- Sukan, F. y Kosaric, N. (2005). Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using turkish corn oil and honey. *Engineering in Life Sciences*. 5 (4), 357-362.
 62. Pornsunthorntawe, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M., y Rujiravanit, R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*. 99 (6), 1589-1595.
 63. Rao, X. (2012). Synthesis and application of rosin-based surfactants. En *Rosin-based chemicals and polymers*. *Smithers Rapra Publishing, Shrewsbury, Shropshire, UK*, 250.

-
64. Radzuan, M. N., Banat, I. M., y Winterburn, J. (2017). Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. *Bioresource Technology*, 225, 99-105.
65. Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., y Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: production and applications. *Biodegradation: life of science*, 978-953.
66. Saharan, B., Sahu R. and Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genet Eng Biotechnol.* 29, 1-39.
67. Santiago, M. y Strobel, S. (2013). Thin layer chromatography. *Methods in Enzymology.* 533, 303-324.
68. Sarachat, T., Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., y Rujiravanit, R. (2010). Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresource Technology*, 101 (1), 324-330.
69. Sarubbo, L. A., do Carmo Marçal, M., Neves, M. L. C., Maria da Paz, C. S., Porto, L. F., y Campos-Takaki, G. M. (2001). Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95 (1), 59-67.
70. Saucedo, G. C., González, P. B., Revah, S. M., Viniegra, G. G., y Raimbault, M. (1990). Effect of lactobacilli inoculation on cassava (*Manihot esculenta*) silage: fermentation pattern and kinetic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50 (4), 467-477.
71. Saucedo-Castaneda, G., Trejo-Hernandez, M., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D., y 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.
72. Saucedo- Castañeda, J. G., Favela-Torres, E., Viniegra- González, G., Torres-Mancera, M.T., Figueroa-Montero, A. A. y Rosales-Zamora, G. 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. México, 336733. (Int.Cl.8: C12Q1/02; G01N33/497). 22 enero 2016. 25 abril 2033.
73. Secretaría de Economía. Acuerdo por el que se dan a conocer las Notas Explicativas de la Tarifa Arancelaria (2007). 34.02 Agentes de superficie orgánicos (Excepto el jabón). Diario Oficial de la Federación, 2 de julio de 2007.
74. Shah, M. U. H., Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., Talukder, M. M. R., Yusup, S. B., y Goto, M. (2017). Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 60-67.
75. Silva, R., Almeida, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., y Sarubbo, L. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (7), 12523-12542.
76. Singh, A. K., y Cameotra, S. S. (2013). Rhamnolipids production by multi-metal-resistant and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (5), 1038-1056.
77. Skoog, D. A., Holler, F. J. y Nieman, T.A. (2016). Cromatografía de líquidos. En: *Principios de análisis instrumental*. (pp. 746-781). Cengage Learning. España.
78. Smith, B. C. (2011). Introduction to infrared spectroscopy. En: *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. (pp. 1-17). CRC press. Florida.
79. Smyth, T. J., Rudden, M., Tsaousi, K., Marchant, R., y Banat, I. M. (2014). Protocols for the detection and chemical characterisation of microbial glycolipids. En: *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. (pp. 29-60). Springer, Berlin, Heidelberg.

-
80. Soberón, G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa*. En: Martínez-Romero, E. y Martínez-Romero, J., editores. *Microbios en línea*. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>. (Fecha de consulta: 09-04-2019).
81. Soberón-Chávez, G., Lépine, F., y Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (6), 718-725.
82. Spangenberg, B., Poole, C. F., y Weins, C. (2011). The stationary phase in thin-layer chromatography. En: *Quantitative thin-layer chromatography: a practical survey*. (pp. 53-79). Springer Science & Business Media. Berlín.
83. Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U., y Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas species* DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 40 (1-2), 61-67.
84. Tadros, T. F. (2014). General classification of surfactants. En: *An introduction to surfactants*. (pp.5-28). Walter de Gruyter.
85. Tavares, L. F., Silva, P. M., Junqueira, M., Mariano, D. C., Nogueira, F. C., Domont, G. B., y Neves, B. C. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (5), 1909-1921.
86. Thompson, J. M. (2018). Some fundamentals of infrared spectroscopy. En: *Infrared spectroscopy*. (pp. 1-33). Pan Stanford. Singapur.
87. Toribio, J., Escalante, A. E., y Soberón-Chávez, G. (2010). Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112 (10), 1082-1087.
88. Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T., y Stoineva, I. (2009). Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. *Process Biochemistry*, 44 (2), 135-141.
89. University of Tartu, Institute of Chemistry. *Database of ATR-FT-IR spectra of various materials*. Disponible en: http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/paint/binders/pine-tree-resin/. (Fecha de consulta: 05-05-2019).
90. Varjani, S. J., y Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232, 389-397.
91. Velioglu, Z., y Urek, R. O. (2015). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120 (5), 526-531.
92. Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., ... y Hausmann, R. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10 (1), 80.
93. Wittgens, A., Kovacic, F., Müller, M. M., Gerlitzki, M., Santiago-Schübel, B., Hofmann, D., y Syldatk, C. (2017). Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (7), 2865-2878.
94. Wu, J., Zhang, J., Wang, P., Zhu, L., Gao, M., Zheng, Z., y Zhan, X. (2017). Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40 (11), 1611-1619.
95. Zhang, L. (2011). *Effects of fatty acid substrates on rhamnolipid (biosurfactant) biosynthesis and congener distribution*. The University of Arizona.

ANEXOS

A1. Cinética de crecimiento

Cada microorganismo se reactivó partiendo de cepas conservadas en glicerol. Tubos de ensaye con tapón de algodón que contenían 3 mL de caldo nutritivo (CN), se inocularon con 3 μL y fueron incubados durante 24h con agitación de 200 rpm a 30°C. Para la cinética se emplearon matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL CN, estos fueron inoculados con el contenido de los tubos de ensaye, se emplearon las mismas condiciones de cultivo y se tomaron muestras cada 2 horas.

El crecimiento se determinó por densidad óptica y por unidades formadoras de colonias, para ello se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina estéril (10^{-1} hasta 10^{-8}).

En placas de Petri con agar nutritivo se inocularon 20 μL cada una de las diluciones y se realizó el conteo de colonias luego de 24 h de incubación a 30°C. La densidad óptica se cuantificó a 600 nm.

En la Figura A1 se muestra la cinética de crecimiento de *S. rubidaea* y *B. plantarii*, el conteo en placa se realizó en la dilución 10^6 y la densidad óptica se midió en la dilución 10^1 , el máximo crecimiento de *B. plantarii* se alcanza a las 12 h y se tienen 8.2×10^7 UFC/ mL, mientras que con *S. rubidaea* se tienen 7.9×10^7 UFC/ mL en el mismo tiempo de cultivo.

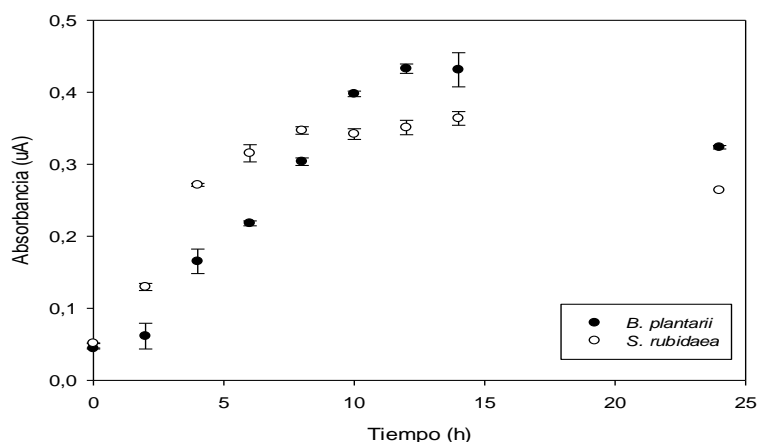


Figura A.1 Cinética de crecimiento en cultivo líquido para *S. rubidaea* y *B. plantarii* expresado en unidades de densidad óptica

A2. Análisis por HPLC-ELSD

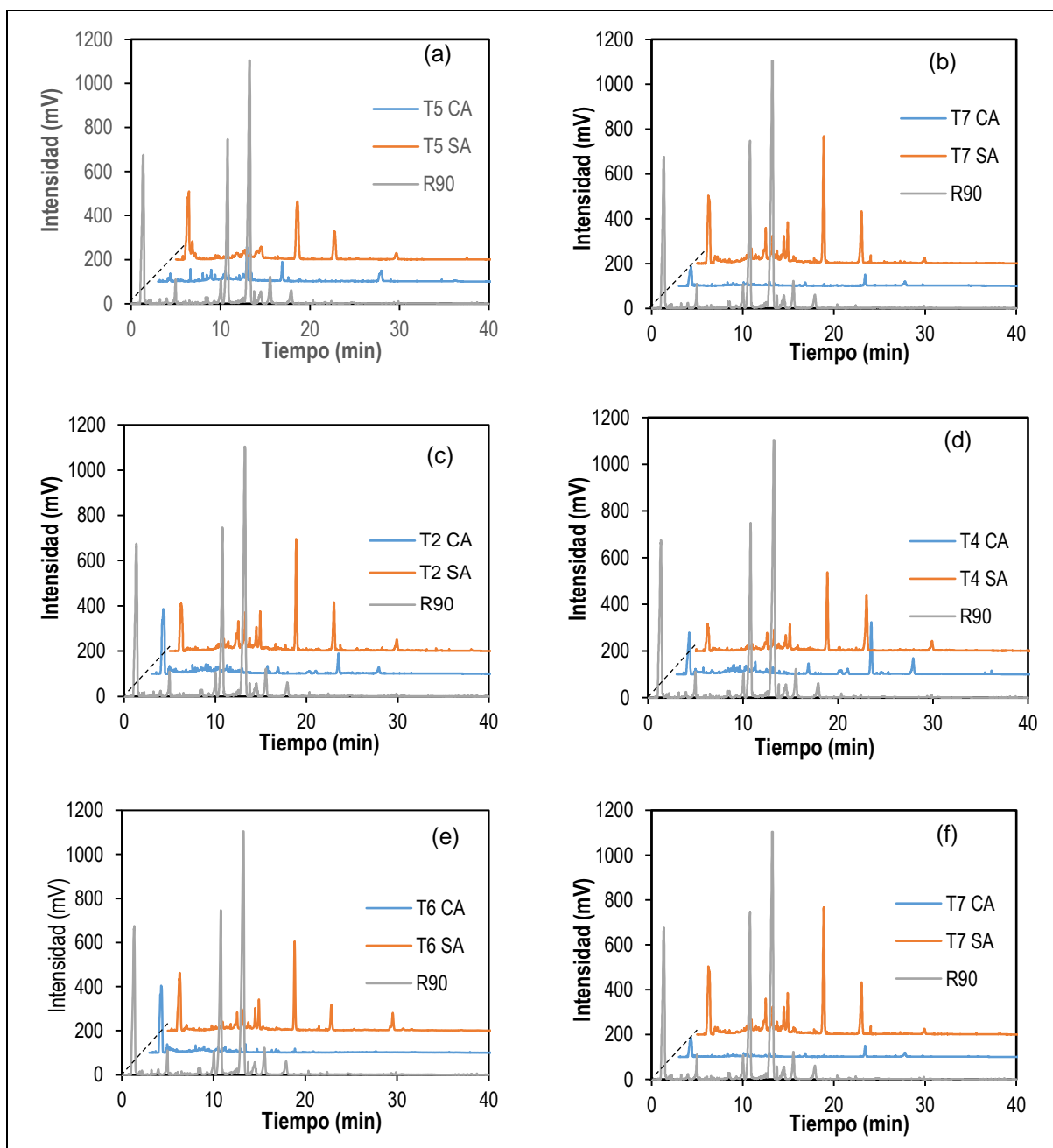


Figura A.2 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 d de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS *B. plantarii* usando medio Glu-NH_4^+ (a) y medio Glu-NO_3^- (b) mientras que, (e) y (d) corresponden a *S. rubidaea*. En c y d se muestra el análisis de los productos del medio Gli-NH_4^+ y Gli-NO_3^- sintetizados por *S. rubidaea*, la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%; los productos se recuperaron con AcOEt.

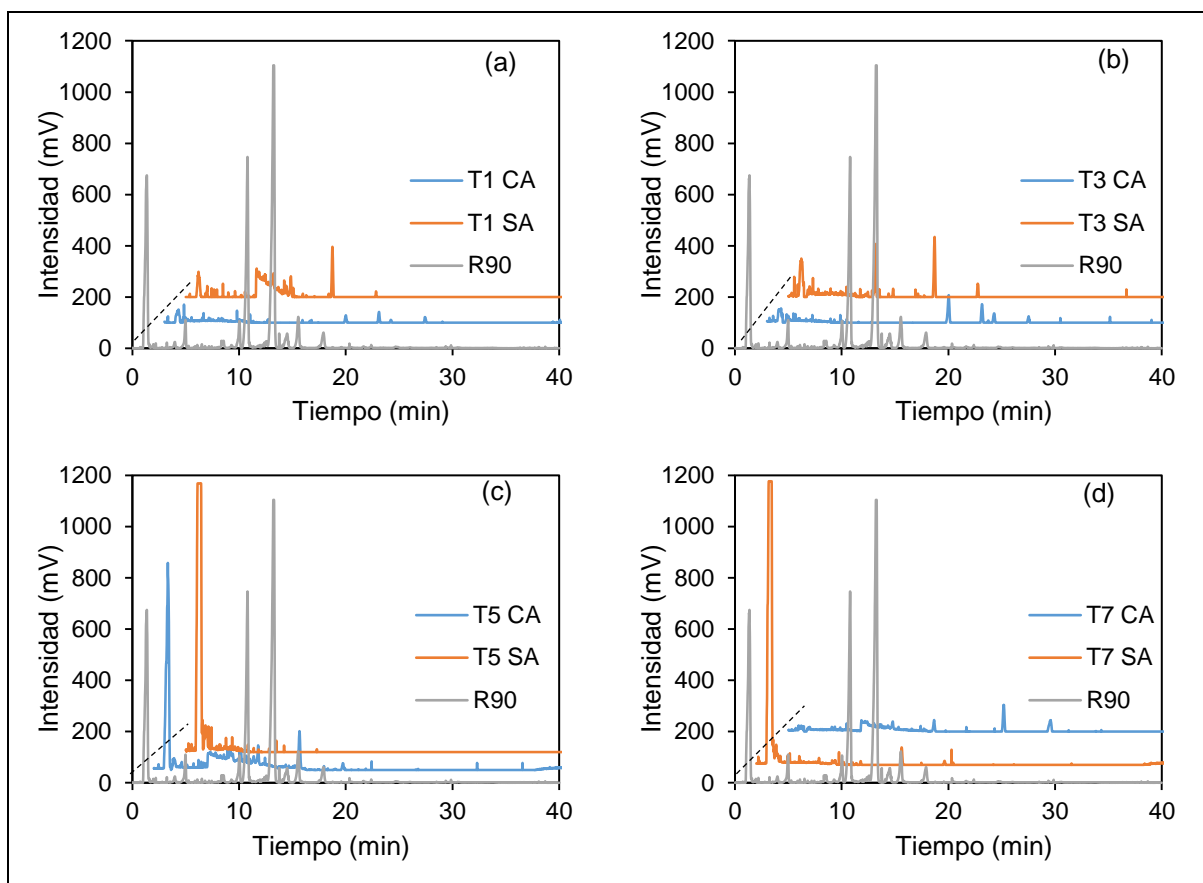


Figura A.3 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 días de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS *B. plantarii* usando los medios Gli-NH_4^+ (a), Gli-NO_3^- (b), Glu-NH_4^+ (c), Glu-NO_3^- (d); solvente de extracción: MeOH, la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%.

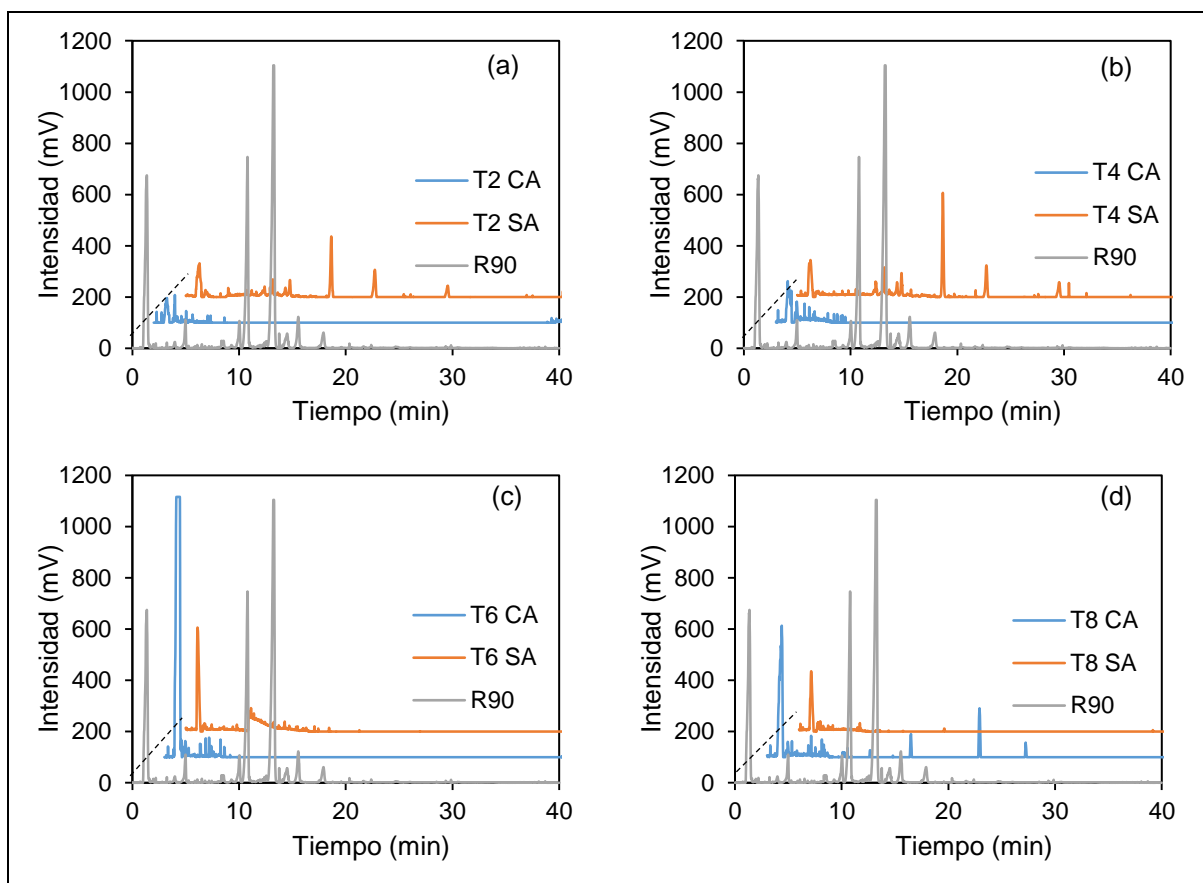


Figura A.4 Cromatogramas del análisis HPLC-ELSD luego de 12 días de cultivo realizado a los productos obtenidos por CMS *S. rubidaea* usando los medios Gli-NH_4^+ (a), Gli-NO_3^- (b), Glu-NH_4^+ (c), Glu-NO_3^- (d), productos recuperados con MeOH, la línea naranja es del tratamiento sin aceite, y en azul se indica el tratamiento con aceite, en gris se muestra el estándar R90%.

A3. Factores de retención- CCF

A continuación, se presentan las tablas donde se resumen las bandas encontrados en las BS producidos por CMS, en cada una se muestran de acuerdo al solvente de extracción empleado para la recuperación, y el agente revelador y microorganismo utilizado

Tabla A.1 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* en presencia de aceite de soya, producto extraído con AcOEt

Banda	Factores de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	-	*	*	*	*	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	-	-	*	-	-	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	*	*	*	*	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	*	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	*	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	*	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	*	-
R2	0.45 ± 0.04	-	*	*	-	-	-	*	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.2 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* sin aceite, solvente de extracción: AcOEt.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	*	*	*	-	*	-	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	*	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	*	*	*	-	-	*	-	*
A3	-	0.65 ± 0.02	-	*	-	-	*	*	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	*	-	-	*	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	*	-	*
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.3 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* en presencia de aceite de soya, producto extraído con MeOH.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	*	-	*	*	-	-	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	*	*	-	*	*	*	-
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	*	-	*	*	*	*	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	*	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.4 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *B. plantarii* sin aceite, solvente de extracción: MeOH.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	*	*	-	*	-	-	-	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	*	-	-	-	*	-

Tabla A.5 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* en presencia de aceite de soya, producto extraído con AcOEt.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	-	*	*	*	*	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	*	*	-	*	*	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	*	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	*	*	*	*	*
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	*	*
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	*	*
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	*	-	*	*
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.6 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* sin aceite, solvente de extracción: AcOEt.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	*	-	-	-	*	*	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	*	*	-	-	*	*	*	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	-	*
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	*	*	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	*	*	*	-	-	*	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.7 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* en presencia de aceite de soya, producto extraído con MeOH.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	-	*	*	*	*	*	*
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	*	-	-	-	*	*	*	*
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	*	-	-	-	*	-	-	*
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	*	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	*	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A.8 Resultados del análisis por CCF de los BS producidos en CMS por *S. rubidaea* sin aceite, solvente de extracción: MeOH.

Banda	Factor de retención		Agente revelador							
			Solución de <i>p</i> -anisaldehído				Vapores de yodo			
	R 90%	Aserrín	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻	Gli-NH ₄ ⁺	Gli-NO ₃ ⁻	Glu-NH ₄ ⁺	Glu-NO ₃ ⁻
R6	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.01	*	-	*	-	*	*	*	-
R5	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	*	-
R4	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	0.65 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R3	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	*	-
A1	-	0.49 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	0.45 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	0.24 ± 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A4. Caracterización por FTIR de los productos obtenidos en CMS

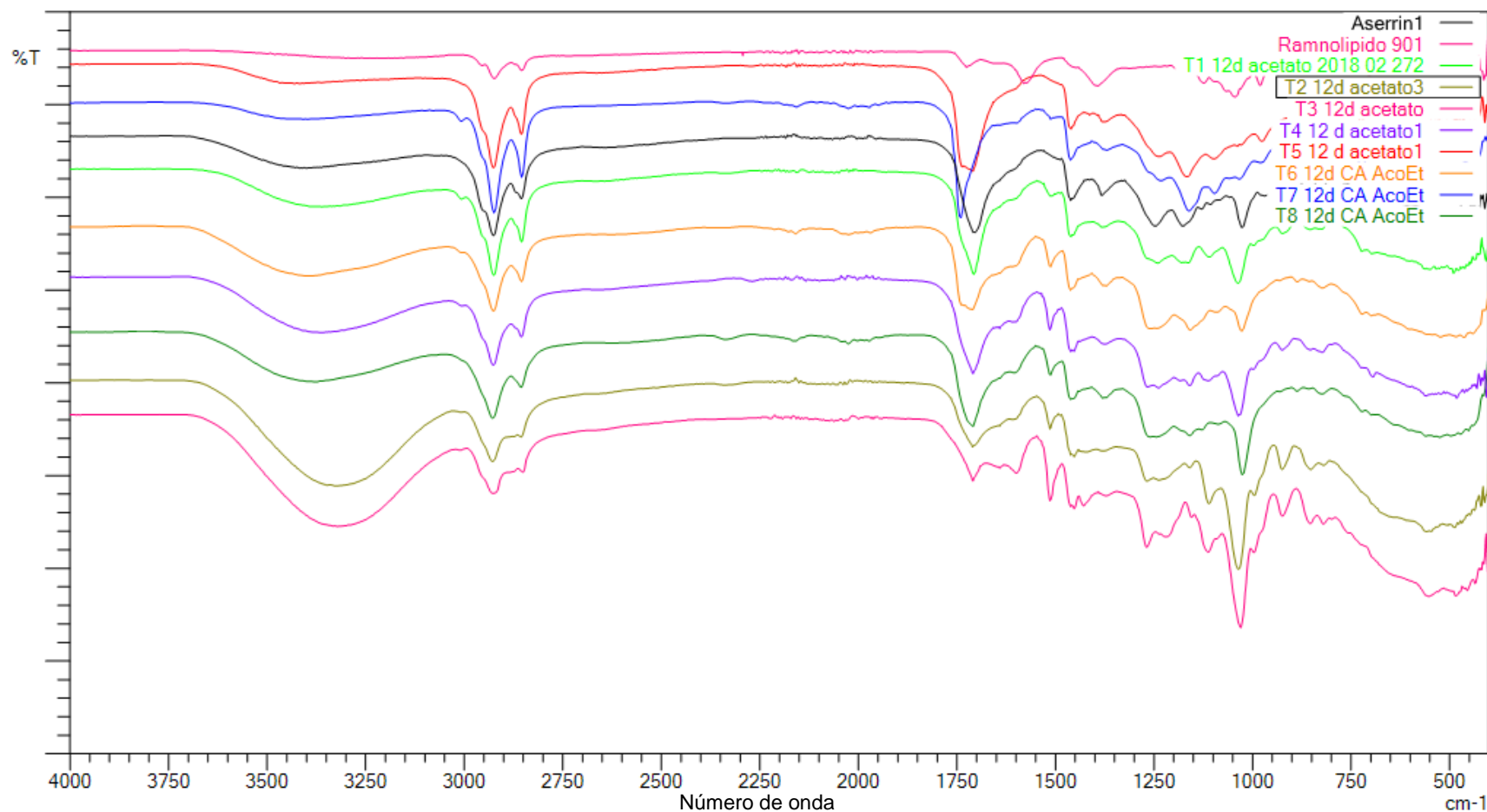


Figura A.5 Espectros FTIR de los extractos recuperados con AcOEt luego de 12 d de cultivo creciendo en presencia de aceite de soya, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃⁻; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃⁻; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃⁻; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃⁻.

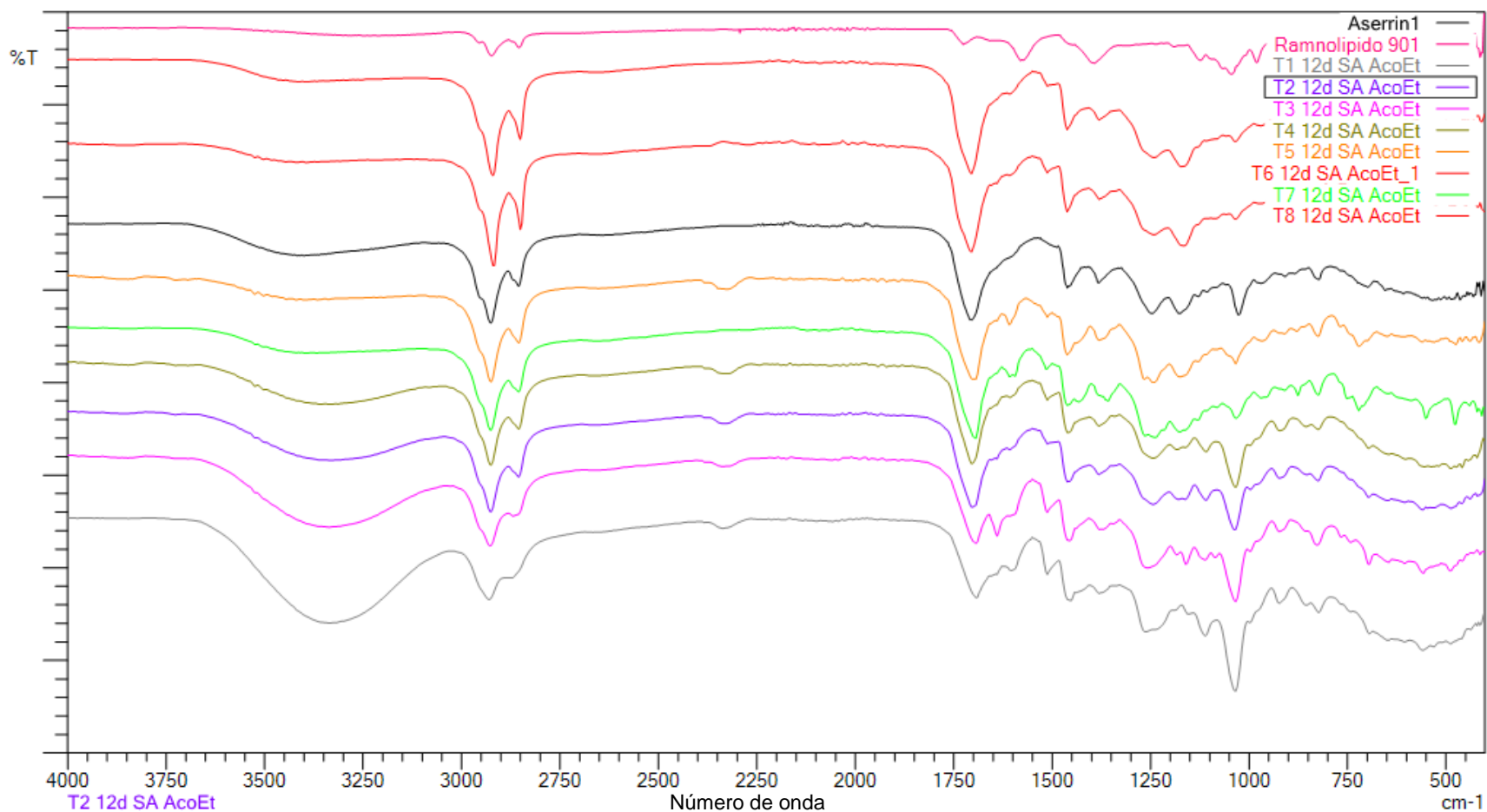


Figura A.6 Espectros FTIR de los extractos recuperados con AcOEt, tratamientos sin aceite de soya luego de 12 días de cultivo, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃⁻; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃⁻; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃⁻; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃⁻.

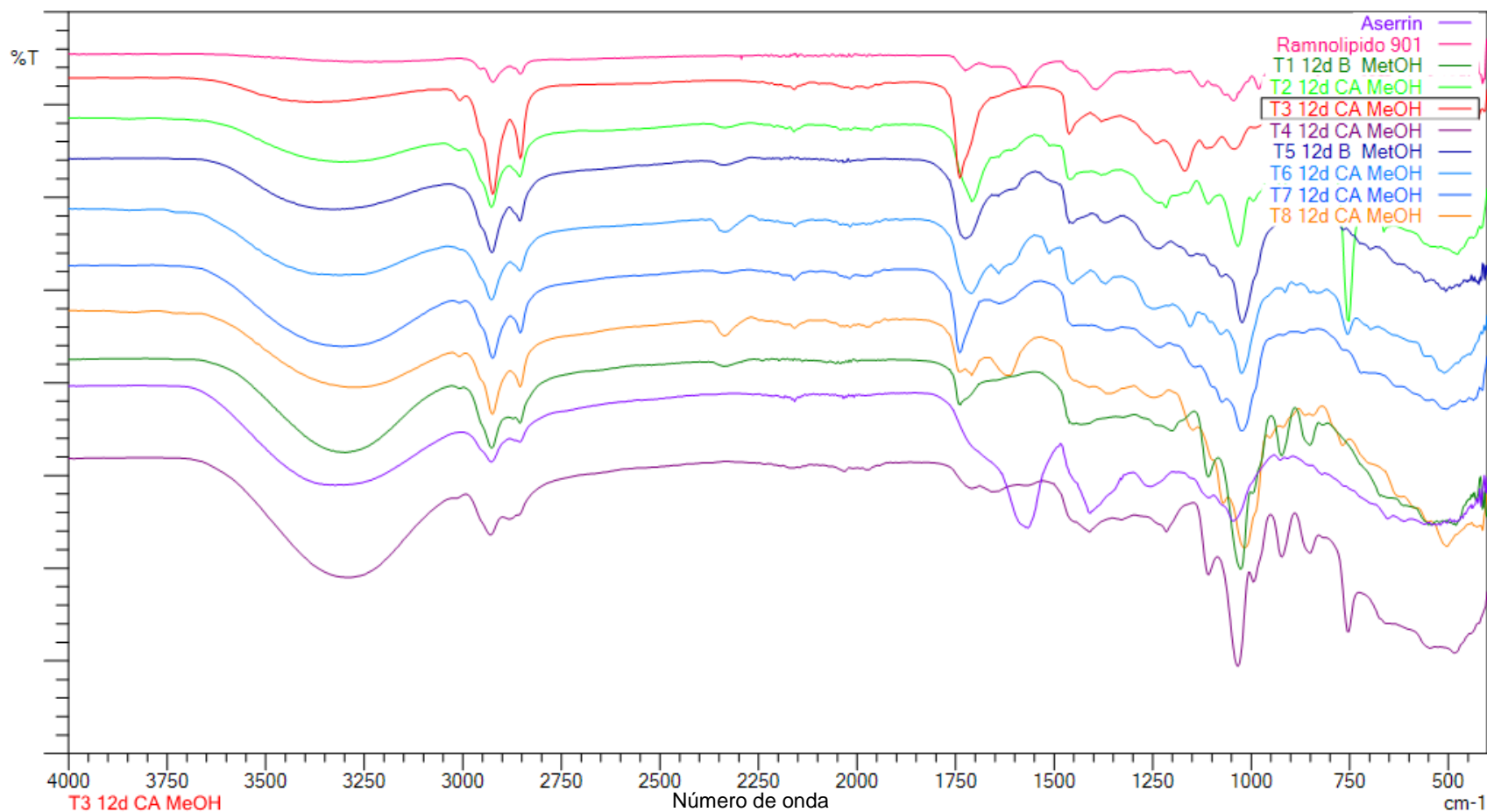


Figura A.7 Espectros FTIR de los extractos recuperados con MeOH luego de 12 días de cultivo creciendo en presencia de aceite de soya, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃⁻; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃⁻; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃⁻; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃⁻.

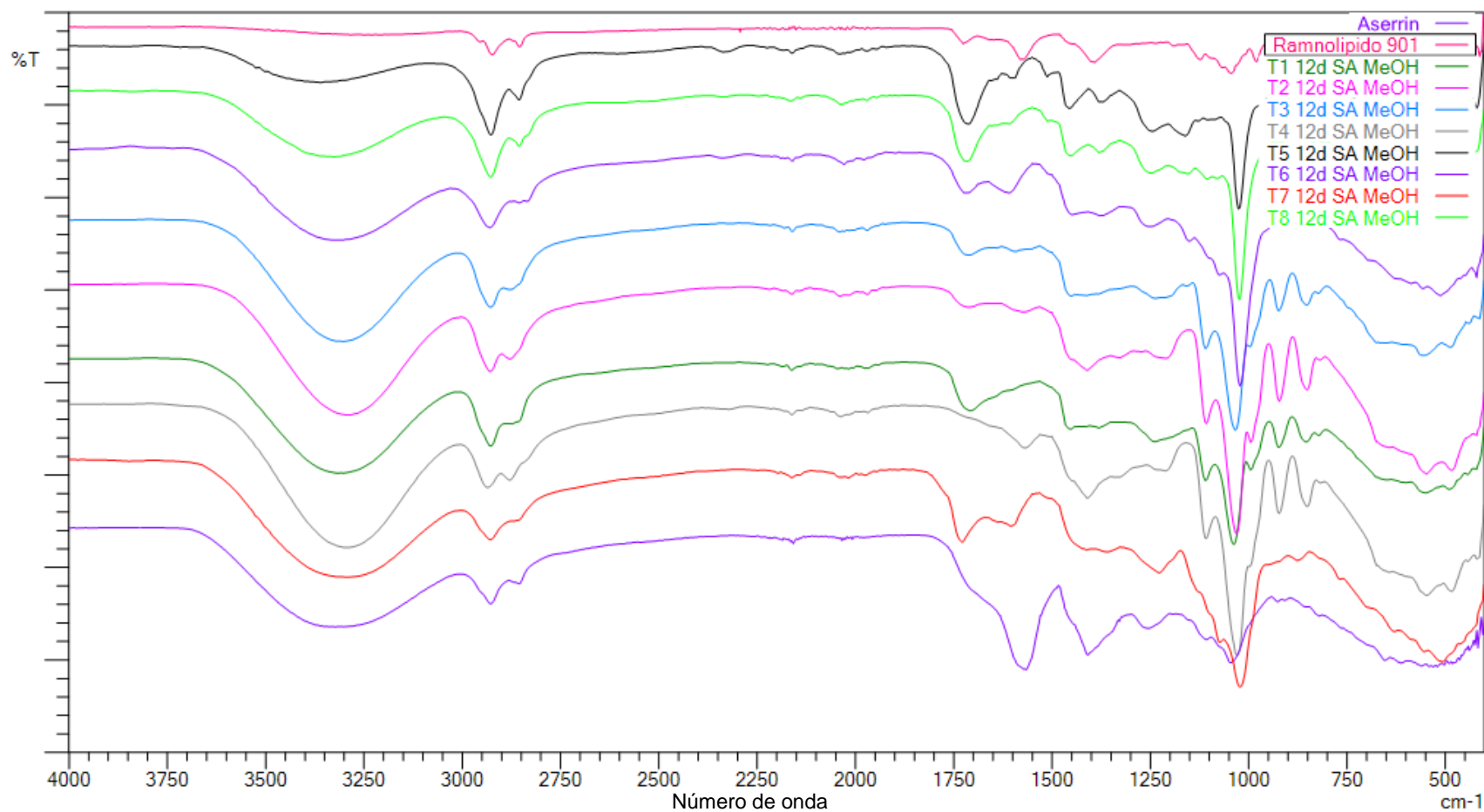


Figura A.8 Espectros FTIR de los extractos recuperados con MeOH, tratamientos sin aceite luego de 12 días de cultivo, T1: *B. plantarii* Gli-NH₄⁺; T2: *S. rubidaea* Gli-NH₄⁺; T3: *B. plantarii*, Gli-NO₃; T4: *S. rubidaea* Gli-NO₃; T5: *B. plantarii* Glu-NH₄⁺; T6: *S. rubidaea* Glu-NH₄⁺; T7: *B. plantarii*, Glu-NO₃; T8: *S. rubidaea* Glu-NO₃.

A.5 Modelamiento de la tensión superficial

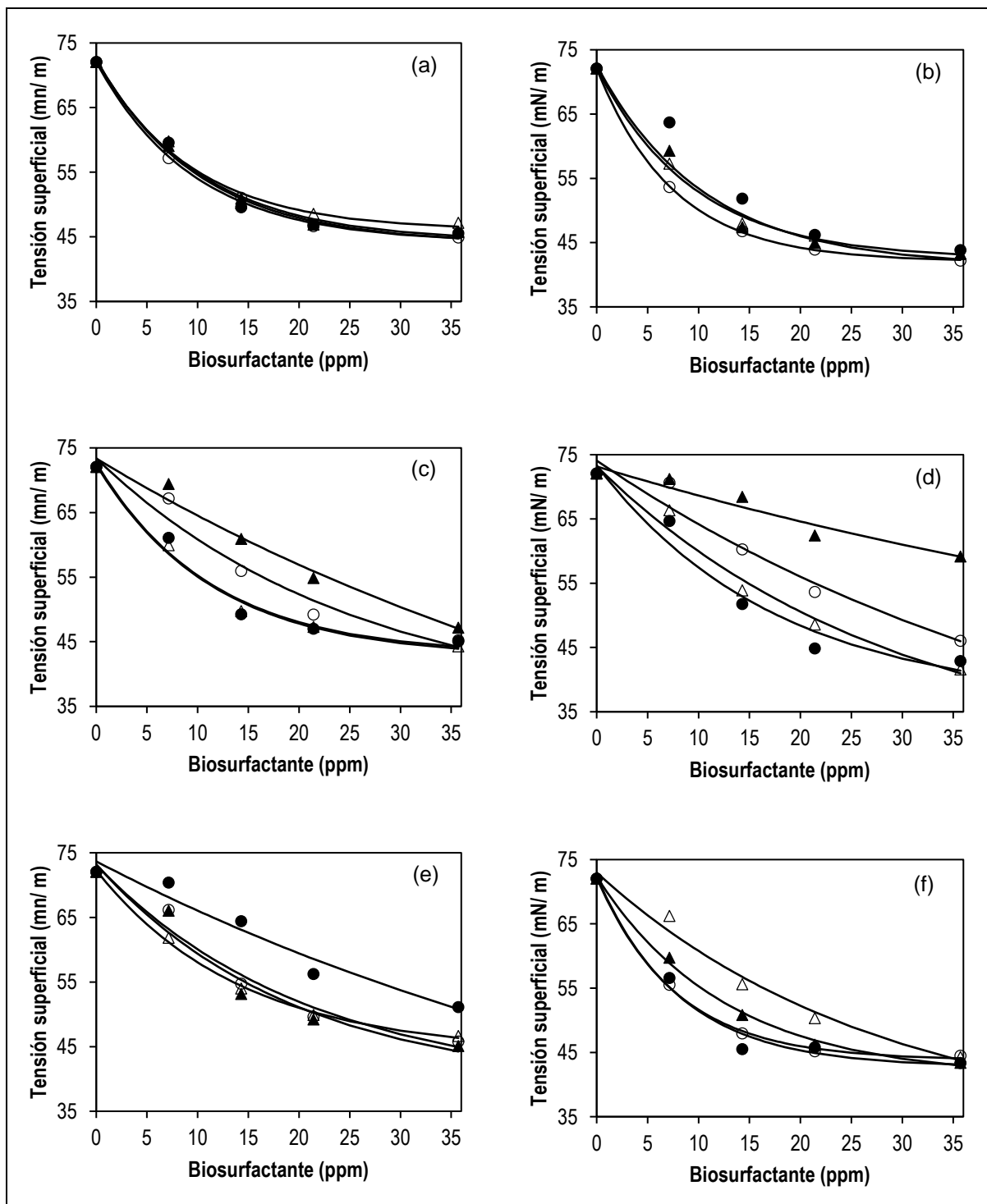


Figura A.9 Cambio de la tensión superficial usando los productos del CMS, los triángulos corresponden a glicerol, círculos a glucosa, marcador sin relleno contiene NH_4^+ y con relleno NO_3^- en (a) *B. plantarii* y (b) *S. rubidaea* sin aceite recuperados con AcOEt; en (c) y (d) están los productos de los tratamientos con aceite recuperados con MeOH para *B. plantarii* y *S. rubidaea* respectivamente, mientras que (e) y (f) corresponden a los productos del tratamiento sin aceite recuperados con MeOH.

A6. Determinación de pH y humedad

Tabla A.9 Medición de pH del cultivo en medio sólido y líquido.

Microorganismo	Medio de cultivo	Cultivo en medio sólido				Cultivo líquido	
		Con aceite		Sin aceite		Con aceite	
		pH		pH		pH	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>B. plantarii</i>	Gli-NH ₄ ⁺	6.9*	6.3 ± 0.1	7.0 ± 0.0	6.7 ± 0.0	---	6.12
	Gli-NO ₃ ⁻	7.0*	6.8 ± 0.0	7.1 ± 0.0	7.2 ± 0.0	---	6.8 ± 0.0
	Glu-NH ₄ ⁺	6.9*	3.7 ± 0.1	7.1 ± 0.0	3.7 ± 0.0	---	3.6 ± 0.2
	Glu-NO ₃ ⁻	6.8*	4.0 ± 0.1	7.1 ± 0.0	3.8 ± 0.0	---	5.5 ± 0.0
<i>S. rubidaea</i>	Gli-NH ₄ ⁺	7.0*	5.3 ± 0.1	7.1 ± 0.0	5.2 ± 0.0	---	4.9 ± 0.0
	Gli-NO ₃ ⁻	7.0*	5.5 ± 0.3	7.1 ± 0.0	5.5 ± 0.1	---	5.1 ± 0.0
	Glu-NH ₄ ⁺	6.5*	3.8 ± 0.1	---	3.8 ± 0.0	---	3.9 ± 0.1
	Glu-NO ₃ ⁻	7.0*	3.9 ± 0.0	---	3.7 ± 0.0	---	5.3 ± 0.0

--- Datos pendientes

* No se cuenta con la medición en la réplica

Tabla A.10 Humedad (%) de los cultivos en medio sólido al inicio y final del tiempo de incubación.

Microorganismo	Medio de cultivo	Con aceite (%H)		Sin aceite (%H)	
		Inicial	Final	Inicial	Final
<i>B. plantarii</i>	Gli-NH ₄ ⁺	56.4*	58.1 ± 4.1	61.8 ± 1.9	59.0 ± 2.3
	Gli-NO ₃ ⁻	57.1*	60.8 ± 1.3	64.0 ± 3.1	58.8 ± 2.4
	Glu-NH ₄ ⁺	59.4*	60.9 ± 2.6	59.7 ± 2.4	59.1 ± 1.0
	Glu-NO ₃ ⁻	60.3*	59.7 ± 1.1	57.3 ± 3.9	60.9 ± 1.3
<i>S. rubidaea</i>	Gli-NH ₄ ⁺	56.4*	60.1 ± 3.3	61.6 ± 2.7	61.5 ± 0.5
	Gli-NO ₃ ⁻	56.4*	59.8 ± 2.8	60.4 ± 1.8	61.4 ± 0.8
	Glu-NH ₄ ⁺	58.4*	61.7 ± 0.7	58.8 ± 3.9	60.9 ± 0.8
	Glu-NO ₃ ⁻	62.1*	61.5 ± 0.8	60.4 ± 2.6	59.5 ± 1.0

* No se cuenta con la medición en la réplica



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00259

Matrícula: 2163805581

PRODUCCIÓN DE
BIOSURFACTANTES EN CULTIVO
EN MEDIO SÓLIDO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
MTRA. LORENA LETICIA PEDRAZA SEGURA
DR. JOSE DE JESUS CAZARES MARINERO

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

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA ALEJANDRA PICHARDO SANCHEZ

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

Aprobar

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



MARIA ALEJANDRA PICHARDO SANCHEZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

VOCAL

MTRA. LORENA LETICIA PEDRAZA SEGURA

SECRETARIO

DR. JOSE DE JESUS CAZARES MARINERO