



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
CIBA-IPN TLAXCALA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO
Y EL NIVEL DE OXÍGENO DISUELTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
BIOSURFACTANTES A PARTIR DE *Bacillus subtilis***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN TECNOLOGÍA
AVANZADA**

PRESENTA

MARIA LOURDES MEJÍA FARFÁN

Director de Tesis: Dr. Víctor Eric López y López

Tepetitla de Lardizabal Tlax.

Abril del 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

PROYECTO IPN SIP 20060507

**Dr. Eric, a la Dra. Martha, a la Dra. Carmen,
a la Dra. Diana y al Dr. Sergio.**

A los profesores del CIBA

DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis a Lulú, Dani, Beto y Paco.

CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	13
II. 1. Biosurfactantes de alto peso molecular (mayor a 1500 Da)	13
II. 2. Biosurfactantes de bajo peso molecular (menor a 1500 Da)	13
II. 3. Producción de biosurfactantes	15
II. 4. Medios de cultivo para la producción de biosurfactantes	16
II. 5. Producción de biosurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i>	17
II. 6. Biosíntesis de lipopéptidos en <i>Bacillus subtilis</i>	20
II. 7. Control genético en la síntesis de surfactina	23
III. JUSTIFICACION	25
IV. OBJETIVO GENERAL	26
IV. 1. Objetivos específicos	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
V. 1. Microorganismo	27
V. 2. Inóculos	27
V. 3. Medios de cultivo	27
V. 4. Métodos analíticos	29
V. 4.1. Cuentas celulares	29
V. 4.2. Determinación de actividad superficial	29
V. 4.3. Velocidad específica de crecimiento (μ)	30
V. 4.4. Número estandarizado de bacilos	31
V. 4.5. Actividad superficial específica	31
V. 4.6. Determinación de glucosa	31
V. 4.7. Prueba de actividad antimicrobiana y actividad hemolítica	31
V. 4.8. Extracción de lipopéptidos	32
V. 4.9. Determinación de lipopéptidos totales	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
VI. 1. Evaluación del crecimiento celular y la producción de biosurfactantes con los medios AQ y KS a nivel matraz	33
VI. 2. Evaluación de la relación de C:N sobre el crecimiento celular y la producción de biosurfactantes a nivel matraz.	35
VI. 4. Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica de los biosurfactantes producidos en medios de cultivo a nivel matraz	43
VI. 5 Evaluación del efecto del nivel de OD sobre la producción de biosurfactantes con los medios KS y KSAH, en fermentador.	48
VI. 5.1. Evaluación del medio KS en fermentador	48
VI. 5.2. Evaluación del medio KSHA en fermentador	52
VI. 5.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica de biosurfactantes con sobrenadantes liofilizados a partir de fermentador	58
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. PERSPECTIVAS	65
IX. BIBLIOGRAFÍA	66
X. ANEXO I. GLOSARIO	71

Índice de Figuras

Figura 1. Solubilización micelar.....	11
Figura 3. Lipopéptidos biosurfactantes producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 4. Activación de un ácido graso.....	21
Figura 6. Organización molecular de los genes para la producción de surfactina	24
Figura 8. Prueba de tensión superficial.....	30
Figura 9. Asignación arbitraria de actividad superficial ajustando valores por tiempos de colapso en segundos..	30
Figura 10. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio AQ (C:N 2.6)	34
Figura 12. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio KSAH (C:N 11.6)	36
Figura 13. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio KSBH (C:N 5.7)	37
Figura 15. Cinética de crecimiento y actividad superficial. Medio KSBP (C:N 5.7).....	38
Figura 16. Actividad superficial en función de la relación C:N.....	41
Figura 18. Actividad superficial específica en función de la velocidad específica (μ) a nivel matraz	42
Figura 20. Actividad sobre <i>Fusarium</i> sp. con los medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH a nivel matraz	44
Figura 21. Actividad hemolítica con los medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH a nivel matraz.	44
Figura 23. Actividad superficial, inhibición sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y actividad hemolítica con el medio KS (C:N 8) a nivel matraz.....	46
Figura 24. Inhibición sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y actividad hemolítica con el medio KSAH (C:N 11.6) a nivel matraz.....	46
Figura 25. Inhibición sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y actividad hemolítica en el Medio KSBH (C:N 5.7) a nivel matraz.....	47
Figura 26. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa y oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KS-1 en fermentador.....	49
Figura 27. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KS-2 en fermentador.....	51
Figura 28. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KSAH-1 en fermentador.....	53
Figura 29. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KSAH-2 en fermentador.....	55
Figura 30 Cromatograma de HPLC estándar de surfactina (Sigma).....	56
Figura 31 Cromatograma de HPLC de la muestra de KS-2 de 12 horas de crecimiento en fermentador.....	56
Figura 32 Cromatograma de HPLC de la muestra de KSAH-2 de 12 horas de crecimiento	57
Figura 33 Curva de calibración con el estándar de surfactina (Sigma) por HPLC	57
Figura 34 Actividad sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo sumergido en fermentador.	59
Figura 35 Actividad hemolítica de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador.	60
Figura 36 Actividad sobre <i>Fusarium</i> sp de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador.....	60
Figura 37 Actividad sobre <i>Pythium</i> sp de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador.....	61
Figura 38. Actividad biológica sobre <i>Sacharomyces cerevisiae</i> y actividad hemolítica de sobrenadantes liofilizados de pruebas en fermentador.	62

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Biosurfactantes producidos por diferentes microorganismos.</i>	15
<i>Tabla 2. Medio de cultivo AQ utilizado comercialmente para la producción de biosurfactantes (Heins, 2000)</i>	28
<i>Tabla 3. Medios de cultivo con variación de C:N.</i>	28
<i>Tabla 4. Resultados de cinéticas de crecimiento y Actividad superficial.</i>	40
<i>Tabla 5. Resumen de evaluación del efecto de OD sobre la producción de lipopéptidos biosurfactantes en fermentador</i>	58

RESUMEN

Es conocido que cepas de *Bacillus subtilis* producen lipopéptidos con actividad surfactante y tienen una amplia aplicación a nivel industrial. En la literatura se han descrito diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para mejorar la producción de éstos compuestos. Sin embargo, no se ha establecido la influencia de la relación C:N y por otro lado no existen estudios sobre el efecto de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en la producción de biosurfactantes. El objetivo del presente trabajo fue el encontrar el efecto de la relación carbono nitrógeno (C:N) y la concentración de OD sobre la producción de biosurfactantes en cultivos en matraz y a nivel fermentador respectivamente. Para esto se utilizó una cepa de *B. subtilis* con probada capacidad de producción de biosurfactantes aislada a partir de un producto comercial. La producción de dichos compuestos se evaluó por medio de la actividad superficial de sobrenadantes de los medios de cultivo, así como por actividad biológica (sobrenadantes liofilizados) a diferentes tiempos. Se evaluaron las relaciones C:N: 2.6, 5.7, 8 y 11.6, siendo los medios a una relación C:N 8 y C:N 11.6 los que mostraron la mayor actividad superficial, y el medio a una relación C:N de 5.7 presentó una mejor actividad antimicrobiana sobre *Saccharomyces*, una actividad hemolítica moderada y ligera actividad antimicrobiana sobre *Fusarium*. En el caso del oxígeno disuelto (OD) en cultivo por lote en fermentador se observó una mayor producción de biosurfactantes a un nivel alto de OD evaluado tanto por actividad superficial como por actividad biológica.

ABSTRACT

It is well-known that strains of *Bacillus subtilis* produce lipopeptides with surfactant activity which has a wide application at industrial level. In scientific literature different carbon and nitrogen sources have been described to increase biosurfactant production, although, there has not been established the influence of C:N ratio on its production. On the other hand, there is a lack of studies about the oxygen dissolved (OD) effect on biosurfactant production. The aim of the present study was to find the effect of the carbon:nitrogen ratio (C:N) and OD concentration on biosurfactant production at flask and reactor level respectively. We use a *B. subtilis* strain with a proved capability for producing biosurfactants and it was isolated from a commercial product. In our case, the biosurfactant production was evaluated by superficial activity in supernatant as well as biological activity (supernatant freeze dried) at different times. It was evaluated the C:N ratio 2.6, 5.7, 8 and 11.6, being the cultures with C:N ratio 8 and C:N ratio 11.6 that showed a better antimicrobial activity against *Saccharomyces*, a moderate hemolytic activity and slight activity against *Fusarium*. In the case of oxygen dissolved (OD) in batch culture it was observed a bigger biosurfactant production at high level of OD evaluating as superficial as biological activity.

I. INTRODUCCIÓN

Desde finales de los 70's los niveles de contaminantes en agua y suelo se han incrementado notablemente, debido a acciones como drenado indiscriminado de materiales, abandono de plantas de manufactura, insuficientes métodos de almacenaje de desperdicios y disposición de residuos de forma inadecuada. Los desechos químicos orgánicos generados incluyen pesticidas, solventes y aceites en todas sus variedades. En su mayoría la contaminación del suelo ha sido consecuencia de derrames y fugas, por limpieza de equipos y por residuos en contenedores. Existen rellenos sanitarios que no se han acondicionado apropiadamente y están dañando el suelo.

En la industria de refinación del petróleo se generan distintos tipos de residuos entre los cuales se encuentran los acumulados en el fondo de tanques de almacenamiento de petróleo crudo. Estos residuos comúnmente llamados lodos se han convertido en un grave problema debido a que causan deterioro ecológico, por lo que las regulaciones ambientales existentes los clasifican como residuos peligrosos. Los métodos de disposición y tratamiento, generalmente son costosos, sin embargo, mediante apropiados sistemas tecnológicos, se pueden convertir en materiales de valor energético o pueden ser dispuestos de manera conveniente. Entre las tecnologías existentes para resolver el problema de disposición de residuos del petróleo se han utilizado: surfactantes químicos, biosurfactantes ó agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el ozono.

El mercado mundial de surfactantes en 1997 fue de 10 billones de US dlls. La producción mundial de surfactantes en el año 2000 fue de 11 millones de toneladas, con un crecimiento promedio del 3.5% anual. La región asiática es la mayor productora de estos productos con el 45%, seguida, por Europa con 28% y América con 22%. (Specialty surfactants 2004).

La importancia de la utilización de biosurfactantes reside en que pueden sustituir a los surfactantes químicos, pueden presentar actividad antimicrobiana y son biodegradables.

Los surfactantes son sustancias que disminuyen la tensión superficial de los líquidos, lo cual les confiere la capacidad de actuar como agentes humectantes o detergentes. Generalmente son moléculas anfipáticas, que pueden o no estar ionizadas. La forma en la que reducen la tensión superficial es por alteración en las fuerzas intermoleculares del líquido, ocasionada por el alineamiento de la parte hidrofóbica e hidrofílica en la interface. El decaimiento de la tensión superficial es una forma de cuantificar la concentración de los surfactantes (Reis et al. 2004).

Los surfactantes en general se pueden clasificar en función de su aplicación en: tensoactivos, detergentes, humectantes, dispersantes, agentes espumantes o antiespumantes, emulsionantes, desemulsionantes, inhibidores de corrosión, agentes antiestáticos y estabilizantes. De ahí que una sustancia con propiedades de surfactante pueda ser utilizada en diversas aplicaciones.

Los surfactantes producen la micelización, ésta es un tipo de microprecipitación en la cual un surfactante se sustrae parcialmente de la fase acuosa. La analogía con un fenómeno de precipitación está reforzada por el hecho de que la micelización se produce a una concentración particular llamada "Concentración Micelar Crítica" (CMC) (Salager 1993).

Los efectos que favorecen la micelización producen un descenso de la CMC. Los mismos fenómenos se producen en medios no polares. Las micelas son responsables de una propiedad fundamental de las soluciones de surfactantes: su poder solubilizante.

La Figura 1 muestra la variación de la concentración de hidrocarburo solubilizado en una solución de surfactante en función de la concentración de este último. A partir de la CMC, la solubilización aumenta considerablemente, ya que el hidrocarburo penetra el centro de las micelas, esta propiedad es la que ayuda a la solubilización de compuestos del petróleo, por lo que se utilizan en procesos de recuperación (Salager 1993).

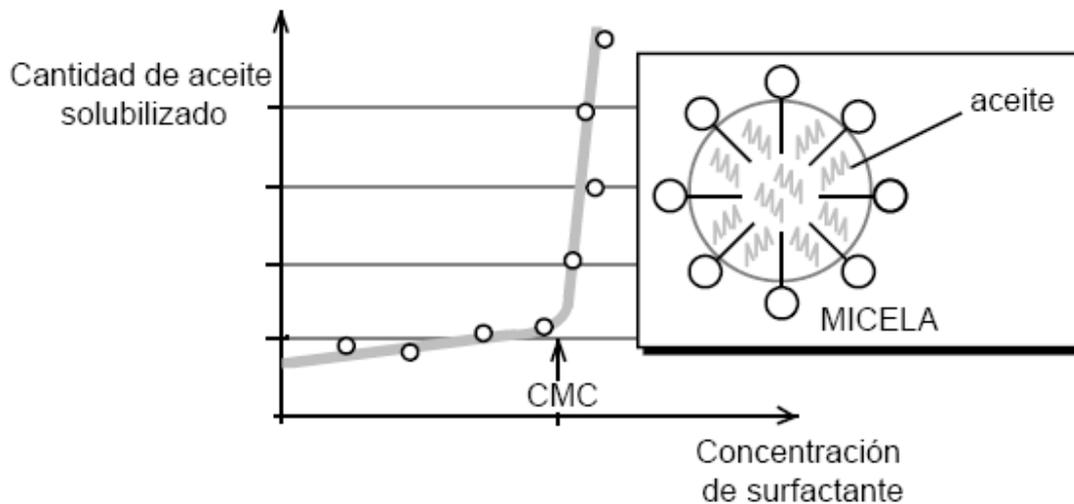


Figura 1. Solubilización micelar

Los biosurfactantes son grupos estructuralmente diversos, parecidos químicamente a los surfactantes sintéticos y se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo polar, por su composición química y su origen microbiano principalmente bacterias y levaduras.

Dentro de los biosurfactantes se incluyen glucolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos, ácidos grasos, surfactantes poliméricos y surfactantes simples.

Los biosurfactantes tienen aplicación potencial en la industria de cosméticos, pinturas, farmacéuticos, agricultura, tratamiento de lodos, tratamiento de desechos, transporte en contenedores y recuperación de petróleo (Banat et al. 2000).

Algunas sustancias químicas contaminantes de la industria pueden ser degradadas por algunos microorganismos. Esto se produce mediante la acción de sistemas enzimáticos de los microorganismos aprovechando estos compuestos como fuente de carbono y energía por la mineralización molecular, puede obtenerse la transformación de estos contaminantes en productos menos dañinos. Este proceso se conoce como biorremediación en el cual es necesaria la presencia de otros compuestos para lograr la degradación de los contaminantes tales como nutrientes, donantes y/o aceptores de electrones.

Los microorganismos capaces de degradar contaminantes son una alternativa para resolver este tipo de problema ambiental, las bacterias productoras de biosurfactantes son un ejemplo de este tipo de microorganismos (Mulligan 2005).

Por otro lado en la industria agrícola para atacar el problema de enfermedades vegetales se utilizan fungicidas o pesticidas químicos disminuyendo los rendimientos en cosechas y por lo tanto causando pérdidas económicas. Adicionalmente restos de estas sustancias se han encontrado en frutas y hortalizas causando efectos negativos en la salud. El reto actual es reemplazar los pesticidas químicos por pesticidas biológicos. Los biosurfactantes pueden utilizarse para humectar suelos y facilitar la aplicación de fertilizantes y pesticidas. También se utilizan en la formulación de pesticidas de baja solubilidad como los órgano-fosforados. Se ha encontrado que la adición de biosurfactantes de *Bacillus subtilis* ha favorecido la biodegradación de pesticidas hidroclorados en un 30 a 40% (Banat et al. 2000). Adicionalmente algunos biosurfactantes tienen aplicación farmacéutica (Ron et al. 2002).

II. ANTECEDENTES

Existen dos tipos de biosurfactantes producidos por bacterias o levaduras: los constituidos por moléculas de bajo peso molecular y los polímeros de elevado peso molecular (Mulligan 2005).

II. 1. Biosurfactantes de alto peso molecular (mayor a 1500 Da)

Un gran número de especies de bacterias de diferentes géneros producen surfactantes poliméricos extracelulares y pueden ser polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, o mezclas complejas de estos biopolímeros. Estos son menos efectivos para reducir la tensión superficial que los de bajo peso molecular. Sin embargo, son eficientes para cubrir las gotas de hidrocarburos e impedir que éstas se unan, emulsionando así a estas sustancias y aumentando su área superficial (Ron et al. 2002). Se caracterizan por poseer una elevada afinidad a determinados compuestos, por ejemplo, algunos emulsifican eficientemente mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, pero no a hidrocarburos puros; otros pueden emulsificar hidrocarburos de elevado peso molecular. Un ejemplo es Bioemulsan[®] el cual es un complejo de un heteropolisacárido y una proteína, producido por diferentes especies de *Acinetobacter*, cuya actividad superficial se debe a la presencia de ácidos grasos que están unidos a polisacáridos (Ron et al. 2002).

II. 2. Biosurfactantes de bajo peso molecular (menor a 1500 Da)

En general la estructura de los biosurfactantes de bajo peso molecular incluye en su grupo hidrofílico: aminoácidos, aniones o cationes pépticos, mono, di o polisacáridos y en su grupo hidrofóbico: ácidos grasos saturados.

Dentro de los biosurfactantes de bajo peso molecular se encuentran los glucolípidos y los lipopéptidos. Los primeros son carbohidratos unidos a cadenas largas de ácidos alifáticos mediante un enlace glucosídico y los segundos son ácidos alifáticos unidos a péptidos de 5 a 10 aminoácidos, ambos tienen una CMC baja e incrementan la solubilidad aparente de los

Algunos microorganismos y los biosurfactantes más destacados producidos por éstos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Biosurfactantes producidos por diferentes microorganismos.
(Desai et al.1997)

BIOSURFACTANTE		MICROORGANISMO
Glucolípidos	Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
	Trealolípidos	<i>R. erithropolis</i> , <i>N. erithropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
	Soforolípidos	<i>T. bombicola</i> <i>T. epicola</i>
	Celobiolípidos	<i>T. petrophilum</i> <i>U. zae</i> , <i>U. maydis</i>
Lipopéptidos y lipoproteínas	Liquenicina	<i>B. licheniformis</i>
	Serrawetina	<i>S. marcescens</i>
	Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
	Surfactina	<i>B. subtilis</i>
	Subtilosina	<i>B. subtilis</i>
	Gramicidinas	<i>B. brevis</i>
	Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>
Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos	Ácidos grasos	<i>C. lepus</i>
	Lípidos neutros	<i>N. erythropolis</i>
	Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>
	Manan-lípido-proteína	<i>C. tropicalis</i>
	Liposan	<i>C. lipolytica</i>
	Carbohidrato-proteína-lípido	<i>P. fluorescens</i> <i>D. polymorphis</i>
Partículas biosurfactantes	Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>
	Vesículas y fimbriaes	<i>A. calcoaceticus</i>
	Células completas	Variedad de bacterias

II. 3. Producción de biosurfactantes

La producción de biosurfactantes tanto de bajo como de alto peso molecular puede ser inducida por señales moleculares. En algunos casos la producción está relacionada con el incremento de la densidad celular y el principio de la fase estacionaria. La cantidad liberada de los biosurfactantes por célula depende del sustrato utilizado y su disponibilidad, las condiciones ambientales y la

fase de crecimiento del microorganismo (Ron et al. 2002). Algunos biosurfactantes se producen en cultivos que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento y en su mayoría se producen aeróbicamente.

Algunas cepas de *Clostridium* y *Desulfovibrio* aisladas de contenedores de petróleo, producen compuestos extracelulares que reducen la tensión superficial a cerca de 50 mN/m.

Jenneman et al. (1983) aislaron *Bacillus liqueniformes* JF-2 a partir de un campo de petróleo en un inyector de agua. *Bacillus liqueniformes* produce el biosurfactante liquenicina en condiciones aerobias, el cual tiene propiedades potencialmente útiles para la recuperación de petróleo *in situ* (Yakimov et al. 1995).

Bacillus pumilus también produce lipopéptidos similares a surfactina. Estos tienen alta potencia emulsificante y espumante, además se utilizan en la industria de alimentos y en el sector agrícola (Vater et al. 2002).

II. 4. Medios de cultivo para la producción de biosurfactantes

Para la producción de biosurfactantes se han utilizado diversos tipos de medios de cultivo y la selección de estos ha sido clave en las investigaciones sobre su producción.

De 1981 a la fecha se han llevado a cabo trabajos sobre la producción de diferentes biosurfactantes. Cooper et al. (1984) utilizaron un medio mineral con 100 g/l de glucosa, 100 g/l de aceite vegetal, nitrato de amonio y de extracto de levadura con *Torulopsis bombicola* y obtuvieron 70 g/l de soforolípidos. Reiling et al. (1986) probaron un medio de sales minerales con 30 g/l de glucosa, con *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 2659) y obtuvieron 2.25 g/l de ramnolípidos. Mulligan et al. (1989) con *Pseudomonas aeruginosa*, y un medio de Proteosa

Peptona (peptona con nutrientes de alta calidad con una proporción alta de péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos libres y factores promotores del crecimiento) obtuvieron ramnolípidos disminuyendo la tensión superficial hasta 30mN/m. Yakimov et al. (1995) utilizando *Bacillus licheniformis* BAS50 en el medio mínimo de minerales de Cooper, probaron 2 niveles de glucosa: 20 y 40 g/l obteniendo 160 mg/l de liquenicina. Kim et al. (1997) utilizaron un medio de sales minerales, bicarbonato de amonio y 40g/l de glucosa, con *Bacillus subtilis* C9 y obtuvieron 7 g/l de biosurfactante. Heins et al. (2000) describen medios con nutrientes orgánicos como extracto de levadura, pasta de soya, proteína de soya y glucosa o sacarosa, además de sales minerales, obtuvieron rendimientos de 3 g/l de lipopéptidos totales. Reis et al. (2004) utilizando *Bacillus subtilis* ATCC6633 en un medio mineral y 10 g/l de azúcar comercial obtuvieron producción de biosurfactante durante la fase exponencial tardía, alcanzando el máximo valor (78.6 CMC^{-1}) al inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Nitschke et al. (2004 y 2006) probaron *Bacillus sp.* y LB5a, utilizaron efluentes industriales como sustrato para el medio de cultivo y obtuvieron la menor tensión superficial con el efluente de una harinera de casava (36 g/l de carbohidratos totales y 2.5 g/l de nitrógeno total) y obtuvieron 3 g/l de biosurfactante.

II. 5. Producción de biosurfactantes por *Bacillus subtilis*

Las cepas de *Bacillus subtilis* son una fuente de péptidos bioactivos con una gran aplicación potencial en el campo de la biotecnología y de la industria farmacéutica. Los lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* incluyen a surfactina, iturina, micosubtilina, y bacilomicina, tienen actividad sobre las membranas celulares y antibióticas y cada uno se presenta en varias isoformas (Figura 3) que difieren en longitud, unión al ácido graso y sustitución de aminoácidos en el grupo peptídico (Vater et al. 2002), la producción de estas isoformas depende de la fuente de carbono y otros nutrientes disponibles (Desai et al. 1997).

La surfactina (Figura 3) además de actividad superficial, tiene aplicaciones farmacológicas, como la inhibición de la formación de fibrina, lisis de eritrocitos y de esferoplastos bacterianos y propiedades antivirales. Debido a que la producción industrial de surfactina en específico es baja, se han desarrollado trabajos para incrementar rendimientos. Cooper et al. (1981) desarrollaron un método para producir surfactina por medio de la remoción de espuma al probar *Bacillus subtilis* ATCC21332, obteniendo un rendimiento de 0.7 a 0.8 g/l. Wei et al. (2003) desarrollaron un método adicionando alta concentración de hierro y obtuvieron 3.5 g/l de surfactina. Kim et al. (1997) reportaron 7 g/l de producción de biosurfactante similar a surfactina en un reactor utilizando un medio mineral definido.

La iturina A (Figura 3) es otro lipopéptido producido por *Bacillus subtilis*, con notable actividad biosurfactante y actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, presenta actividad antifúngica y hemolítica, forma poros conductores de iones en la bicapa lipídica de la membrana y por lo tanto deforma la estructura membranal por modificación de las vesículas de fosfolípidos (Aranda et al. 2005), se utiliza como biopesticida para la protección de cultivos agrícolas (Vater et al. 2002). La estructura de iturina consiste de un anillo de 7 aminoácidos y un residuo hidrofóbico de 11 a 12 carbonos. Las enfermedades fúngicas son las que causan mayores pérdidas económicas en la industria agrícola y los hongos patogénicos como *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* atacan a la mayoría de las plantas con importancia económica (Gohel et al. 2006).

La fengicina es un lipodecapéptido cíclico producido por *Bacillus subtilis* que contiene un hidroxi-ácido graso de 16 a 19 átomos de carbono. Tiene actividad biológica contra hongos filamentosos (Aranda et al. 2005).

En cuanto a la producción de iturina y surfactina Besson y Michel (1992) encontraron que las enzimas que catalizan las reacciones de intercambio de ATP-PPi se relacionan con los

II. 6. Biosíntesis de lipopéptidos en Bacillus subtilis

En la Figura 4 se ilustra un mecanismo de activación de un ácido graso que formará parte de un lipopéptido. La Coenzima A (CoA) que proviene de un grupo metabólico primario y modificado, está ligada a los precursores del ácido graso y es atacada por un complejo enzimático formado de oxidoreductasas y epoxidasas, entre otras.

El acil-graso-CoA es un intermediario y lo reconoce una enzima adenilante y una proteína acil acarreadora las cuales se acoplan al ácido graso para activarlo y dar inicio el proceso de formación de un lipopéptido (Figura 5).

La síntesis de lipopéptidos la realizan péptido sintetetas no ribosomales que fijan los aminoácidos, los activan en forma de tíoesteres y los enlazan entre sí para formar la cadena peptídica, estas enzimas son modulares, cada módulo reconoce un aminoácido concreto, a su vez cada módulo está constituido por varios dominios que catalizan cada una de las reacciones sucesivas necesarias. La secuencia del péptido viene determinada por el orden en que están dispuestos los módulos. Los aminoácidos se mantienen unidos a los módulos por un grupo tiol de estos.

El módulo mínimo consiste en un dominio A (Adenilación) y uno T (Tiolación), acompañados de un dominio C (Condensación).

En primer lugar actúa el dominio de adenilación (A), que reconoce selectivamente un aminoácido concreto y cataliza su adenilación, utilizando la energía de la hidrólisis del ATP, activando así el monómero. A continuación, el aminoácido se transfiere al segundo dominio, el de tiolación (T) para formar un tíoester con el cofactor fosfopantoteína unido al dominio T de la enzima. La siguiente etapa es la unión química de cada aminoácido con su antecesor rompiendo el enlace

éster por acción del dominio C (condensación). El dominio C está presente en todos los módulos excepto en el del aminoácido con el amino terminal. De esta forma se va alongando la cadena peptídica hasta construir la molécula completa del lipopéptido.

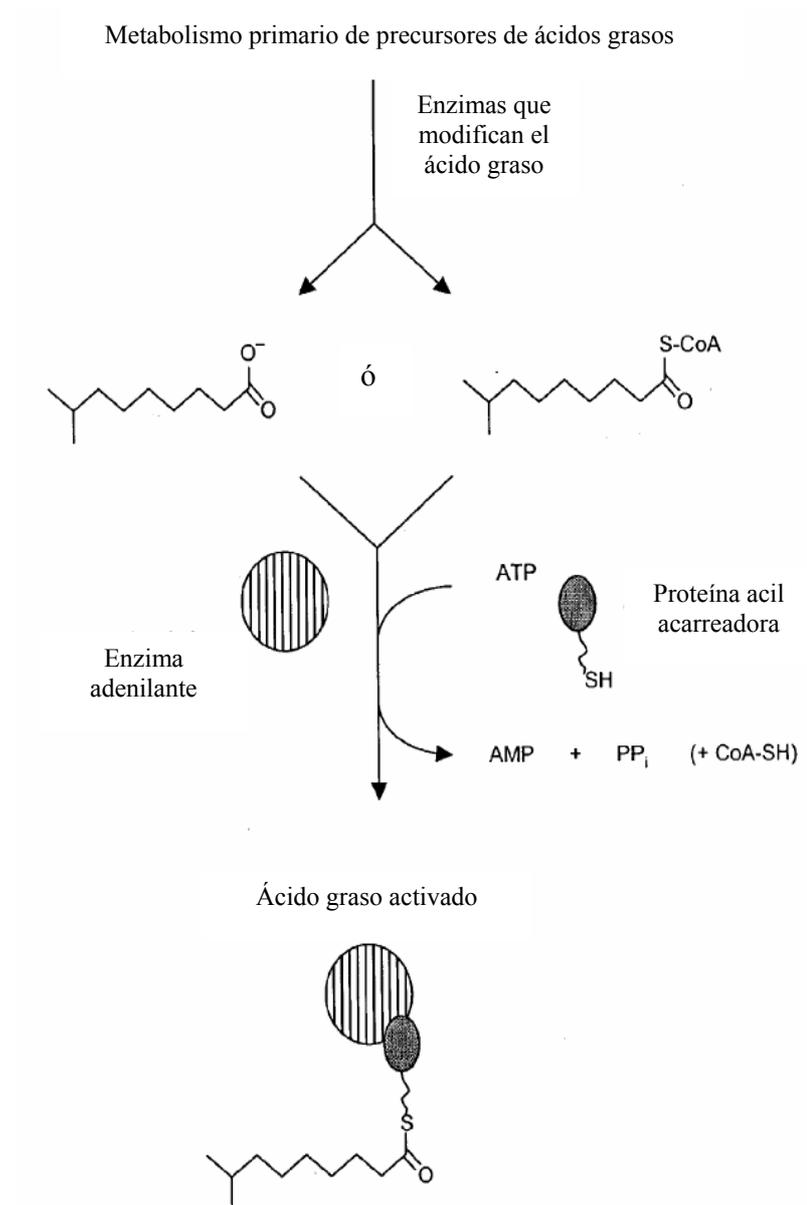


Figura 4. Activación de un ácido graso

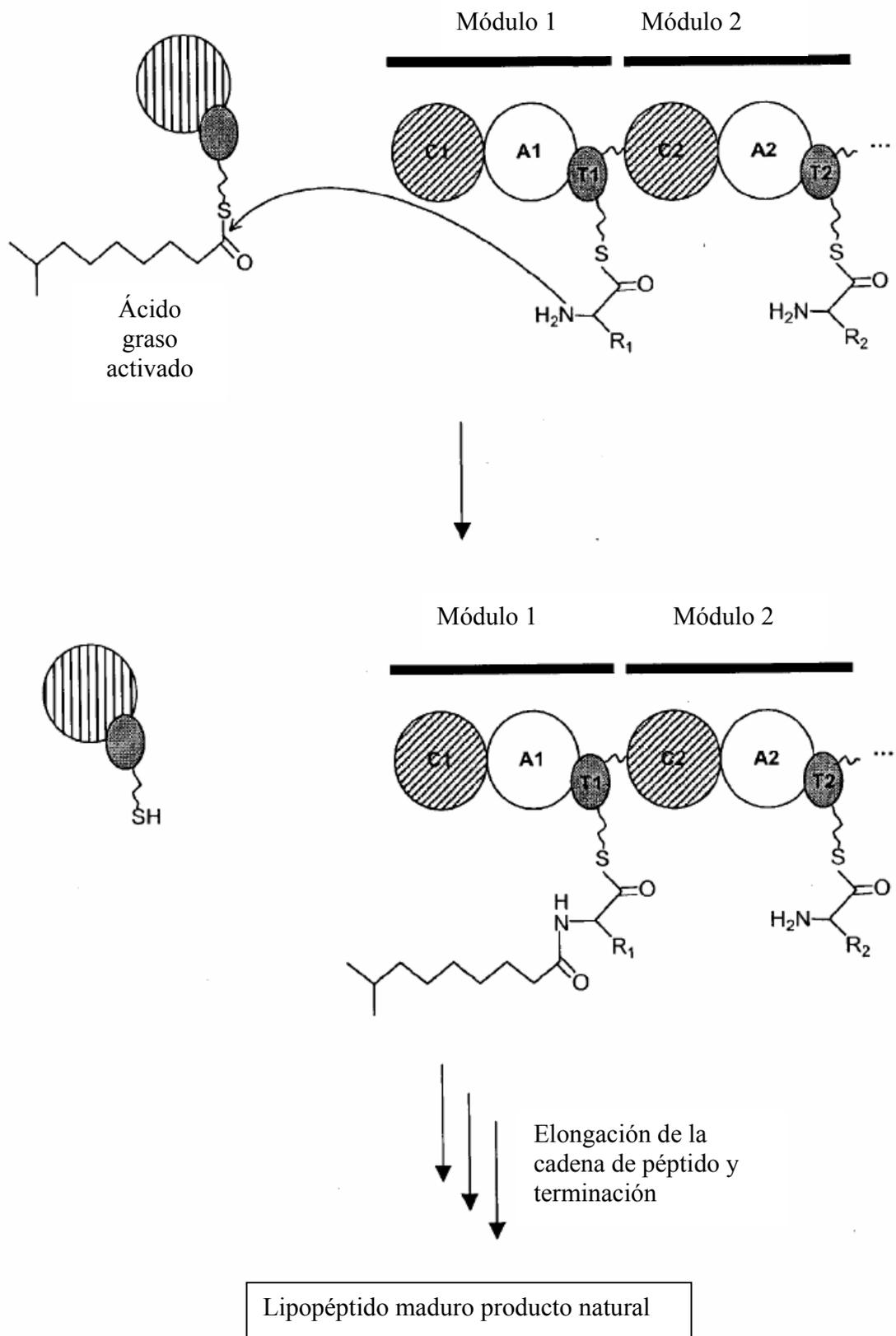


Figura 5. Formación de un lipopéptido

El ensamble del lipopéptido involucra tres fases: iniciación, elongación y terminación de la cadena. La iniciación se lleva a cabo por módulos que comprenden a los dominios A y T, la síntesis del lipopéptido se inicia con la activación del ácido graso, la elongación se lleva a cabo por los dominios C localizados junto a un dominio A y la terminación es catalizada por un dominio tioesterasa ((Farnet et al. 2003) [http://www2.uah.es/bioquimica/q-bp/8_contenidos]).

II. 7. Control genético en la síntesis de surfactina

La organización molecular de los genes, requerida para la producción de surfactina se muestra en la Figura 6. (Sullivan 1998) La péptido sintetasa que se requiere para la síntesis del grupo de aminoácidos de la molécula de surfactina se codifica por cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs) en el operón *srfA* fragmento de unos 27 Kb. El análisis de la secuencia de las péptido sintetasas revela dominios repetitivos, cuya función y orden coincide con el orden de los aminoácidos en el péptido; entre los que se incluyen SrfAA (SrfORF1) de la surfactin péptido sintetasa que contiene los dominios de activación para la adición de ácido glutámico, leucina y D-leucina; SrfAB (SrfORF2) que contiene los dominios para la adición de los aminoácidos valina, asparagina, y D-leucina; SrfAC (SrfORF3) que contiene los dominios para la adición de leucina y también codifica para una tioesterasa responsable de la terminación del péptido; y SrfAD (SrfORF4) que no se requiere para la producción del biosurfactante (Sullivan 1998).

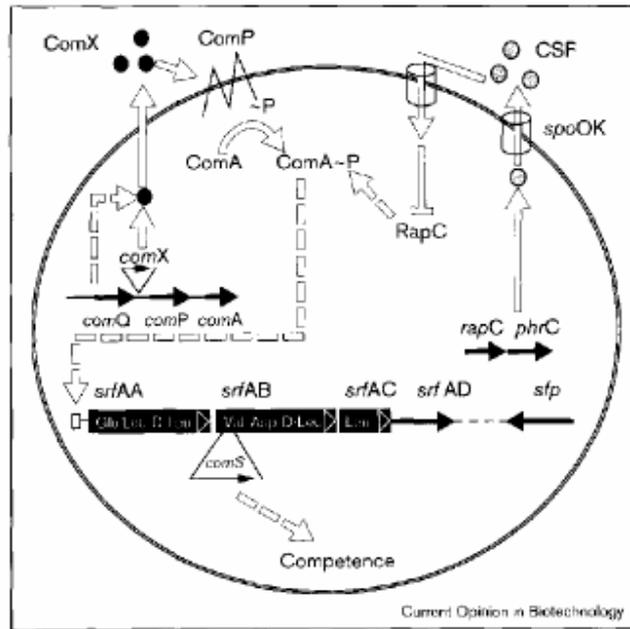


Figura 6. Organización molecular de los genes para la producción de surfactina

Bacillus subtilis es un género productor de biosurfactantes y es importante realizar estudios sobre los efectos que tienen la relación C:N de los medios de cultivo y el oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes, ya que a la fecha no hay reportes claros del efecto de estas variables sobre la síntesis de estos compuestos y en cuanto al oxígeno disuelto no se encontró información relevante al respecto. Por lo que este estudio pretende demostrar que la variación en las condiciones tiene efecto sobre la producción de biosurfactantes.

III. JUSTIFICACION

Debido a la falta de estudios sobre producción de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en los que se correlacionen la relación C:N y oxígeno disuelto (OD), el presente trabajo propone una alternativa de producción de lipopéptidos biosurfactantes que ayude a resolver los problemas ecológicos por el exceso de utilización de surfactantes químicos.

En la problemática de contaminación de la industria petroquímica, el uso de biosurfactantes es otra alternativa de solución.

Las pérdidas en la industria agrícola, causadas por afecciones bacterianas y fúngicas, podrían reducirse significativamente con la utilización de lipopéptidos biosurfactantes que además de tener actividad biosurfactante ayudan a humectar las superficies de los tejidos vegetales, pueden tener actividad antibacteriana y antimicótica.

En la industria farmacéutica, el uso del lipopéptido surfactina altamente purificado, es una alternativa como droga antibacteriana, antiviral, antitrombótico e hipocolesterolémico.

En la industria de los cosméticos, es factible el uso de biosurfactante purificados, para preparaciones en cosméticos que actualmente utilizan surfactantes químicos.

En la industria de alimentos, el uso de biosurfactantes es una alternativa en la limpieza y eliminación de microorganismos que causan mermas en los procesos de producción.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la relación C:N y oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes en cultivos por lote de *Bacillus subtilis*.

IV. 1. Objetivos específicos

- Formular medios de cultivo con relación C:N variable y evaluar su efecto sobre la producción de biosurfactantes a nivel matraz.
- Determinar la producción de biosurfactantes por medición de la actividad superficial, aplicando el método de colapso de gota a nivel matraz y a nivel fermentador.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del sobrenadante de los medios de cultivo sobre *Saccharomyces*, *Fusarium* y *Pythium* a nivel matraz y a nivel fermentador.
- Determinar la actividad hemolítica del sobrenadante de los medios de cultivo a nivel matraz y a nivel fermentador.
- Establecer el efecto de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo sobre la producción de biosurfactantes a nivel fermentador.
- Cuantificar los lipopéptidos totales producidos mediante HPLC a nivel fermentador.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1. Microorganismo

Bacillus subtilis se aisló de la siguiente manera: de un producto comercial se tomó un gramo del producto, la muestra se disolvió en 100 ml de agua destilada estéril se sembró en agar nutritivo a 32°C por 24 horas, se resembró cinco veces y se seleccionó una colonia definida que se sembró nuevamente en agar nutritivo a 32°C por 72 horas tiempo en el que microscópicamente se observó esporulación. El contenido de la placa se trasladó a 20 ml de agua destilada estéril y se determinó la concentración de esporas por cámara de Neubauer. De la solución preparada se tomaron 20 µl y se transfirieron a discos de papel filtro Whatman No. 1 estériles. Cada disco contenía 1.9×10^8 esporas, los discos se conservaron en refrigeración a 4°C (Figura 7).



Figura 7. Discos de papel con esporas de *Bacillus subtilis*

V. 2. Inóculos

Los inóculos se prepararon en matraces de 1000 ml con 250 ml de caldo nutritivo, a estos a su vez se les adicionó un disco de esporas por matraz y se incubaron a 30°C y 150 rpm por 12 horas.

Para los experimentos en matraz y en fermentador el volumen de inóculo fue el 5% v/v.

V. 3. Medios de cultivo

Para evaluar el efecto de la relación carbono nitrógeno (C:N), se prepararon diferentes medios de cultivo a nivel matraz (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2. Medio de cultivo AQ utilizado comercialmente para la producción de biosurfactantes (Heins, 2000)

Componentes	g/l
K ₂ HPO ₄	3.39
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.60
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.020
KH ₂ PO ₄	3.00
NH ₃ SO ₄ .	9.6
CaCl ₂	1.07
ZnCl ₂	0.011
FeCl ₂	0.16
MnCl ₂	0.011
Sacarosa	11.03
Peptona de soya	4.58
Extracto de levadura	6.71
Pasta de soya	8.24
*CST	49.65
C:N	2.6

Tabla 3. Medios de cultivo con variación de C:N

Componentes	g/l				
	KS	KSBH	KSAH	KSBP	KSAP
Glucosa	40	12	40	12	40
NH ₄ HCO ₃	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5
K ₂ HPO ₄	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
NaH ₂ PO ₄	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Extracto de levadura	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.00135	0.00135	0.00135	0.00135	0.00135
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0058	0.0058	0.0058	0.0058	0.0058
CoCl ₂	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
Harina o Pasta de Soya	-	12	12	12	12
*CST	66.57	50.57	78.57	50.57	78.57
C:N	8	5.7	11.6	5.7	11.6

KS: Medio utilizado por de Kim et al. 1997, con adición de sales minerales.

KSBH: Medio KS con adición de harina de soya con hidrólisis ácida, relación C:N baja.

KSAH: Medio KS con adición de harina de soya con hidrólisis ácida, relación C:N alta.

KSBP: Medio KSB con sustitución de la harina de soya por pasta de soya con hidrólisis ácida.

KSAP: Medio KSAH con sustitución de la harina de soya por pasta de soya con hidrólisis ácida.

***CST:** Cantidad de sólidos totales.

Los medios de cultivo KS a nivel matraz, se obtuvieron al mezclar una solución acuosa estéril de glucosa y una solución esterilizada que contenía los demás componentes disueltos en agua

destilada. Los medios de cultivo KSAH, KSBH, KSAP y KSBP a nivel matraz, se prepararon por mezclado de una solución de glucosa, pasta ó harina de soya y ácido fosfórico, que fue autoclaveada para realizar la hidrólisis ácido-térmica y una solución acuosa esterilizada que contenía los demás ingredientes.

Los medios de cultivo KS y KSAH para probar en fermentador se prepararon en un biorreactor de 13 litros con 6 litros de medio, con control de pH a 7.5, temperatura de 30°C, aireación de 1 vvm y agitación de 150 rpm para OD bajo y 600 rpm para OD alto.

Todos los medios se esterilizaron durante 30 min a 121°C. Se mezclaron las soluciones esterilizadas por separado. El pH inicial de los medios fue de 7.5.

V. 4. Métodos analíticos

V. 4.1. Cuentas celulares

Se determinaron por conteo microscópico en cámara de Neubauer. Se tomó una alícuota de medio de cultivo de 10 µl y se colocó en los dos extremos del cubreobjetos de la cámara, se observó en 40X al microscopio. Se contaron los bacilos de cada cuadro y se determinaron células/ml por duplicado.

$\text{Células /ml} = (\text{células en un cuadro de 1 mm por lado}) \times (1 \times 10^4) \times (\text{factor de dilución de la muestra})$

V. 4.2. Determinación de actividad superficial

La actividad superficial se determinó por el método de colapso de gota (Jain et al. 1991) en el cual se tomaron 10 µl de caldo de cultivo centrifugado a 8000 rpm, a 4°C y durante 7 minutos.

Las alícuotas se aplicaron sobre el área de círculos de 40 mm cubierta con una capa de aceite lubricante automotriz (compuesto de hidrocarburos) en una placa plástica impermeable. Se dejó reposar 60 segundos y se observó el colapso de la gota en estereoscopio. Se comparó con 10 µl

de agua como control negativo y una solución de lauril sulfato de sodio al 5% como control positivo (Figura 8). Se tomó como prueba positiva el aumento en el tamaño de la gota.

Para dar un seguimiento más concreto y debido a que los colapsos completos en algunos casos se presentaron antes de los 60 segundos establecidos por la técnica, se asignó una escala arbitraria de 0 a 7 por intervalos de tiempo para el colapso completo de la gota (Figura 9). El valor para agua destilada corresponde a 0 y el valor del control positivo para la solución al 5% de lauril sulfato de sodio es de 3.



(a) (b)

Figura 8. Prueba de tensión superficial agua (a) y para lauril sulfato de sodio al 5% (b)

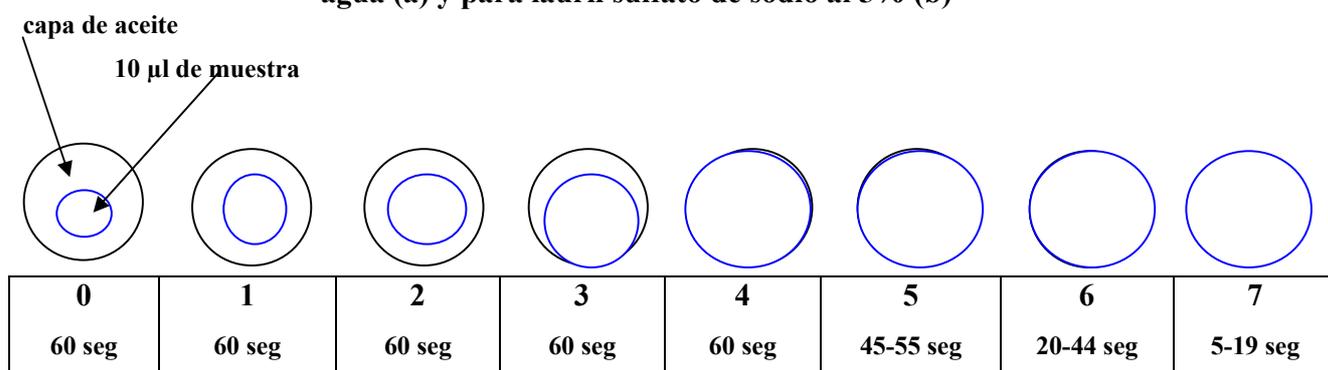


Figura 9. Asignación arbitraria de actividad superficial ajustando valores por tiempos de colapso en segundos.

V. 4.3. Velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó graficando los datos de cuentas celulares en función del tiempo y se ajustaron a un modelo exponencial, con la siguiente ecuación:

$$X=X_0e^{\mu t}$$

Donde

μ = velocidad específica de crecimiento y es constante

X= concentración de células en un tiempo t

X₀= concentración de células en un tiempo inicial t₀

t= tiempo

V. 4.4. Número estandarizado de bacilos

Para el manejo simplificado de la cantidad de células/ml el número estandarizado de bacilos se obtuvo multiplicando la máxima concentración celular de las pruebas por 10⁻¹⁰.

V. 4.5. Actividad superficial específica

La actividad superficial específica se obtuvo dividiendo el número estandarizado de bacilos entre el valor máximo de actividad superficial.

V. 4.6. Determinación de glucosa

La glucosa se determinó por medio de un Kit HK (Sigma-Aldrich) basado en el método de glucosa oxidasa.

V. 4.7. Prueba de actividad antimicrobiana y actividad hemolítica

Las muestras de caldos de fermentación de los distintos medios de cultivo se centrifugaron a 8000 rpm, durante 7 minutos, los sobrenadantes obtenidos se liofilizaron y se resuspendieron en 3 ml de agua destilada, alícuotas de 20 μ l se aplicaron sobre discos de papel estériles.

Para realizar la prueba de actividad antimicrobiana (inhibición), los discos de papel se colocaron sobre placas de agar papa dextrosa (PDA) que fueron inoculadas por separado con *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium sp.* y *Pythium sp.* Las placas se incubaron a 25°C durante

24 horas, tiempo en que se evaluó la inhibición. Para la prueba de hemólisis los discos mencionados se colocaron en placas de agar sangre las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Las actividades antimicrobiana y hemolítica se cuantificaron por medición de diámetros.

V. 4.8. Extracción de lipopéptidos

El caldo de cultivo se centrifugó a 8000 rpm, a 4°C durante 7 min y al sobrenadante libre de células se le ajustó el pH a 2 con HCl 2N, se refrigeró por 12 horas, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm, a 4°C durante 7 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con agua destilada y se le agregó cloroformo-metanol (2:1), se mezcló en vortex y se sonicó por 30 minutos, se centrifugó a 8000 rpm, a 4°C, durante 7 minutos dos veces, se colectó el sobrenadante el cual se evaporó por centrifugación con vacío a 65°C. Al residuo de la evaporación se le agregó acetonitrilo al 80% y carbón activado y se filtró por membrana de nylon con poro de 0.22 µm, el residuo filtrado se utilizó para determinación de lipopéptidos por HPLC (Razafindralambo et al. 1998, Heins et al. 2000 y Hsieh et al. 2004).

V. 4.9. Determinación de lipopéptidos totales

Los lipopéptidos extraídos se analizaron por HPLC (Hewlett Packard series 1100). La separación se realizó a través de una columna Zorbax C-18 de fase reversa estabilizada con metanol, con acetonitrilo al 80% y 0.05% de ácido tricloro acético como fase móvil, un flujo de 1 ml/min con un volumen de inyección de muestra de 20 µl, los lipopéptidos se detectaron a 254.4 nm con detector de diodos (Razafindralambo et al. 1998, Heins et al. 2000 y Hsieh et al. 2004).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. 1. Evaluación del crecimiento celular y la producción de biosurfactantes con los medios AQ y KS a nivel matraz

En la fase inicial de este proyecto se comprobó la producción de biosurfactante por determinación de actividad superficial. Para esto se probaron dos medios de cultivo reportados, que favorecen la producción de compuestos tanto con actividad superficial como con actividad microbiana.

Los medios de cultivo evaluados fueron: AQ (Heins 2000) y KS (Kim et al. 2007), el primero conteniendo nutrientes complejos como pasta de soya, peptona de soya y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno, sacarosa como fuente de carbono y sales minerales (Tabla 2), el segundo con componentes definidos como bicarbonato de amonio como fuente de nitrógeno, glucosa como fuente de carbono y sales minerales (Tabla 3).

En las Figuras 10 y 11 se muestran las cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactantes por determinación de actividad superficial por el método de Jain et al. (1991). Con el medio de cultivo AQ (Figura 10), se obtuvo una población máxima de 2×10^9 células/ml durante 8 horas, para después decaer y mantenerse menor la población hasta el final. (3×10^8 células/ml), la μ fue de 0.49 h^{-1} (Tabla 4). La máxima actividad superficial tuvo un valor de 3 y se mantuvo en ese valor desde el final de la fase exponencial hasta el final de la fermentación. Por observación microscópica no se detectaron esporas. La actividad superficial se evaluó como baja, por lo que este medio no fue recomendable para producción de biosurfactantes.

Con el medio KS (Figura 11) la máxima cantidad celular fue de 2.05×10^9 células/ml, con una μ de 0.45 h^{-1} , y sí se detectaron esporas. La actividad superficial aumentó al incrementar la población alcanzando un valor máximo de 6, se observó que al disminuir la población la

actividad superficial también disminuyó ligeramente para finalizar con un valor de 4. El medio KS mostró mayor producción de biosurfactantes.

La explicación para la disminución de actividad superficial puede deberse a que se produzcan proteasas en el medio y esto favorezca la degradación de biosurfactantes responsables en mayor medida de la actividad superficial. Peypoux et al. (1999), refieren que la presencia de endoproteasas microbianas, causa hidrólisis de la molécula de surfactina y por esto se considera que es una molécula con alto grado de biodegradabilidad.

Por los resultados obtenidos en la primera fase de pruebas se seleccionó el medio KS para evaluar la relación C:N.

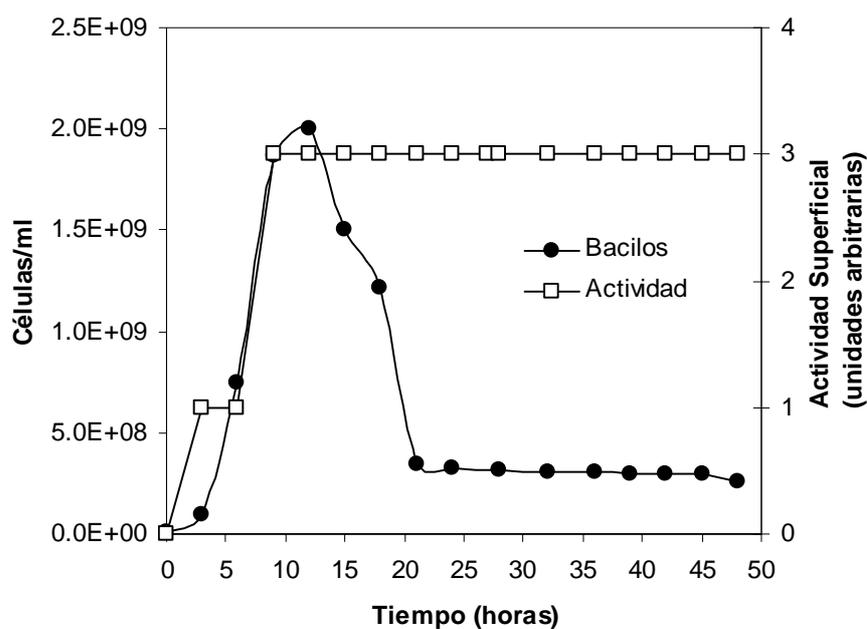


Figura 10. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio AQ (C:N 2.6)

Con los resultados obtenidos con estos experimentos se verificó la confiabilidad del método de colapso de gota (Jain et al. 1991) a dos condiciones de relación C:N diferentes.

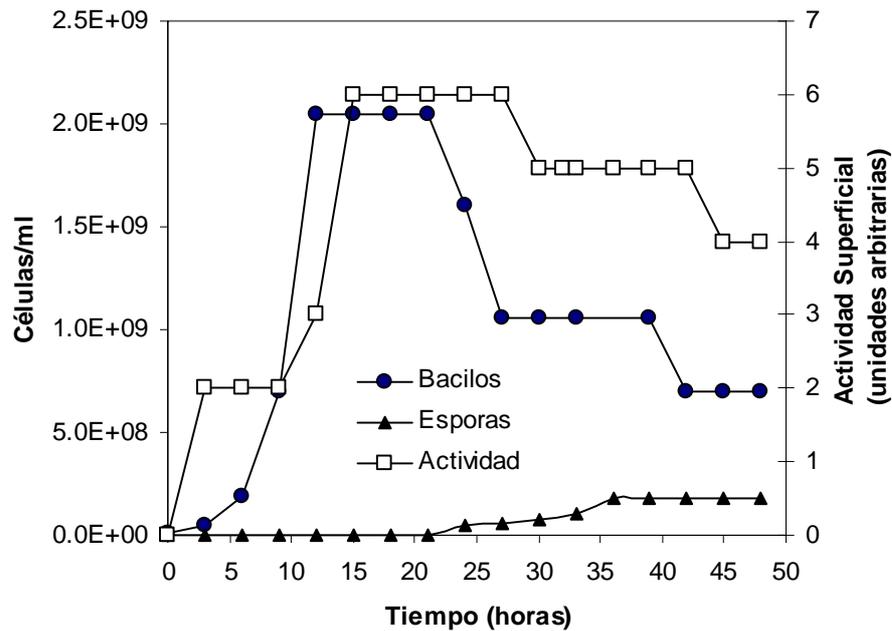


Figura 11. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio KS (C:N 8)

VI. 2. Evaluación de la relación de C:N sobre el crecimiento celular y la producción de biosurfactantes a nivel matraz.

Se probó aumentar y disminuir los niveles de C:N, teniendo como referencia el medio KS con el que se obtuvo mayor actividad superficial. Una primera modificación consistió en ajustar el nitrógeno por adición de harina de soya, mientras que la fuente de carbono se ajustó por adición ó disminución de glucosa.

Los resultados obtenidos con el medio de cultivo para el nivel alto de C:N , con el medio KSAH se muestran en la Figura (12), se obtuvo una μ de 0.64 h^{-1} , una población máxima de 3.27×10^9 , población mayor a la obtenida con el medio KS, la población se mantuvo alta durante 27 horas, probablemente debido a la mayor cantidad de nutrientes en el medio. Se llegó hasta el valor máximo de 7 de actividad superficial. Se tuvo una eficiencia de esporulación de 7.65%. De acuerdo a Ron et al. (2002) la producción de biosurfactantes depende del sustrato utilizado, en

este caso la adición de harina de soya, favoreció la producción de biosurfactante en fase estacionaria ya que el máximo se alcanzó hacia el final de la misma. La actividad superficial fue aumentando gradualmente, lo que indica que este medio fue propicio para producción de biosurfactantes.

Al disminuir la relación C:N a 5.7 en el medio KSBH (Figura 13), se determinaron 2.35×10^9 células/ml como población máxima, valor menor que con el medio KSAH pero mayor que el medio KS (Tabla 4), μ fue de 0.91 h^{-1} , un valor alto, lo que indicó que una C:N baja favoreció un rápido crecimiento, aunque no favoreció la producción de biosurfactante ya que el valor máximo de actividad superficial fue 3; durante casi toda la fermentación. La eficiencia de esporulación se cuantificó en 10.64%, porcentaje mayor que los medios KS y KSAH. Los resultados indican que un medio de cultivo con relación C:N baja, no es un medio propicio para la producción de biosurfactantes.

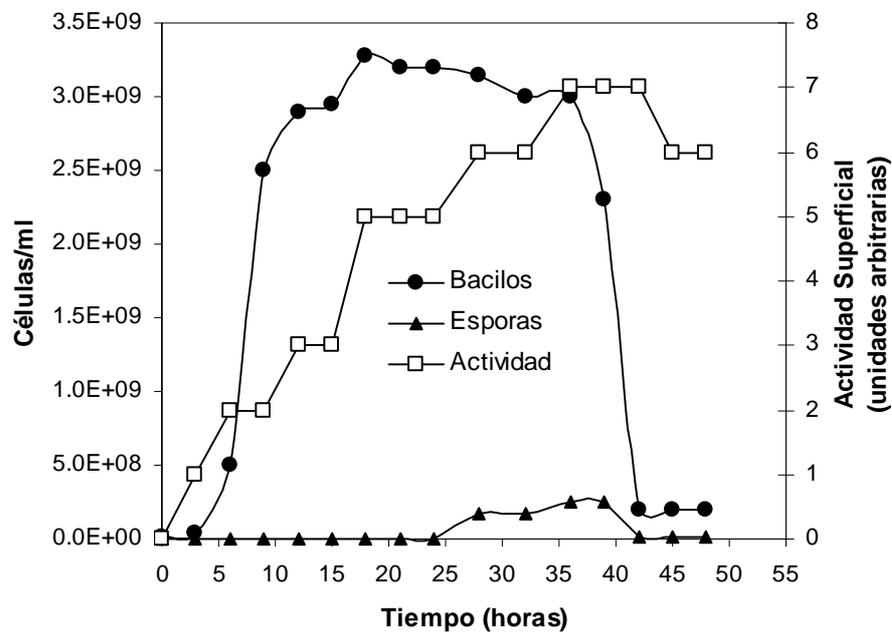


Figura 12. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio KSAH (C:N 11.6)

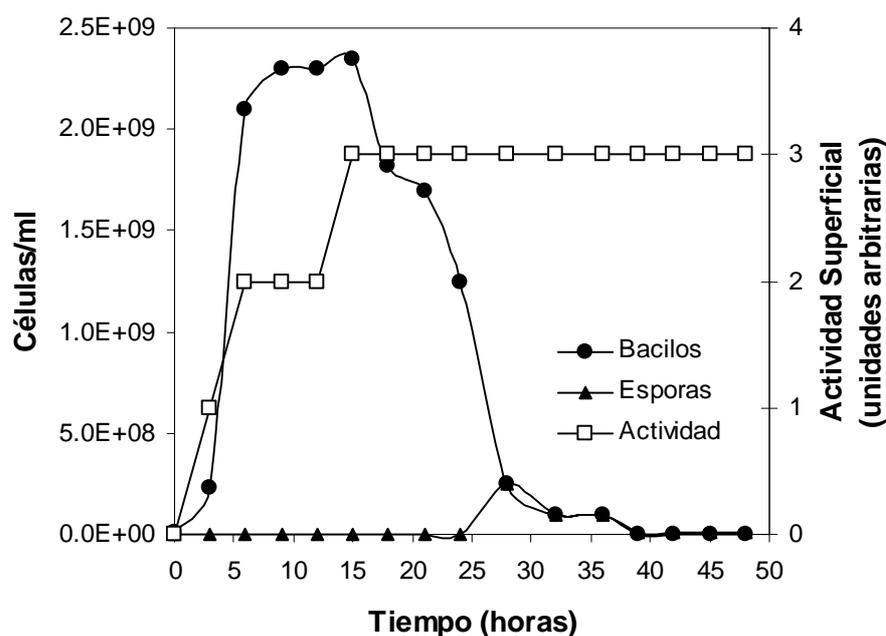


Figura 13. Cinética de crecimiento, cuenta de esporas y actividad superficial. Medio KSBH (C:N 5.7)

En otro experimento a una relación C:N alta (11.6) pero en el que se sustituyó la harina de soya por pasta de soya en el medio KSAP (Figura 14), se observó que la pasta de soya no favoreció la producción de biosurfactantes puesto que el valor máximo de actividad superficial fue de 3. El comportamiento de crecimiento mostró una alta μ (1.06 h^{-1}) para llegar a 3.8×10^9 células/ml, valores altos, lo que indicó que la pasta de soya favorece el crecimiento. Con este medio no se detectaron esporas, caso similar que con el medio AQ en que se utilizó pasta de soya.

Por otro lado al probar el medio con C:N bajo (5.7) con pasta de soya en el medio KSBP, se observó un crecimiento rápido, una μ de 1.07 h^{-1} , pero una disminución de población a las 9 horas (Figura 15). Se alcanzó una población máxima de 2.8×10^9 células/ml, la actividad superficial se mantuvo en 2 durante 30 horas, para disminuir a 1 al final de la fermentación. No se detectaron esporas. Este medio favoreció el crecimiento celular inicial, pero no la producción de biosurfactantes, ni de espumas.

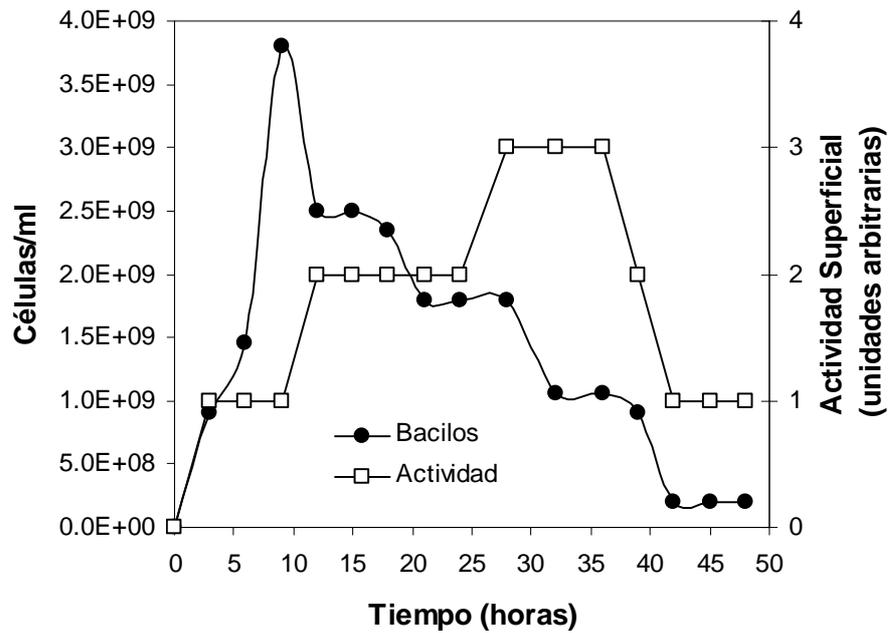


Figura 14. Cinética de crecimiento y actividad superficial. Medio KSAP (C:N 11.6)

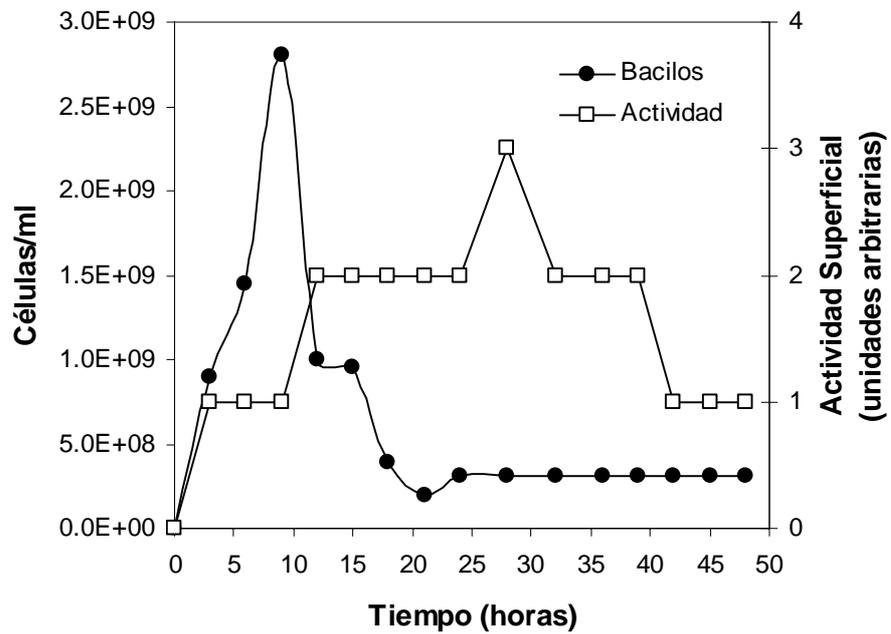


Figura 15. Cinética de crecimiento y actividad superficial. Medio KSBP (C:N 5.7)

Por el comportamiento de las cinéticas de crecimiento sobresale el mantenimiento de la población en fase estacionaria por mayor tiempo con el medio KSAH mientras que la mayor población y μ se alcanzaron con el medio KSAP.

Por actividad superficial, con el medio KSAH se obtiene el máximo valor (7) hacia el final del experimento, con el medio KSBP el máximo valor (3) se obtuvo desde las 15 horas hasta el final de la fermentación, lo que indica que la pasta de soya no fue favorable para la producción de biosurfactantes.

Kim et al. (1997) sugirieron que la producción de surfactina está asociada con el crecimiento celular, utilizando el medio basado en glucosa y bicarbonato de amonio, Reis et al. (2004) por su parte encontraron que la síntesis de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* se lleva a cabo durante la fase exponencial tardía y alcanza el valor máximo al inicio de la fase estacionaria, por lo que dedujeron que era un metabolito primario. En este trabajo se observó producción de biosurfactantes durante la fase exponencial y la fase estacionaria. Besson et al. (1992), por análisis de aminoácidos activados para la síntesis de surfactina e iturina, encontraron que iturina y surfactina se pueden encontrar presentes al mismo tiempo en un medio de cultivo y que se forma un complejo que podría estar involucrado en la regulación de crecimiento celular de *Bacillus subtilis* y que la formación de este complejo tiene un efecto sinérgico en la actividad biológica de estos dos lipopéptidos.

En la tabla 4 se observa que la menor μ corresponde al medio KS (0.45 h^{-1}), la adición de harina o pasta de soya favoreció a una mayor μ y mayor concentración celular. Los medios más favorables para la producción de biosurfactantes fueron los medios de cultivo KS y KSAH a valores de 8 y 11.6 de C:N respectivamente.

Tabla 4. Evaluación de crecimiento, esporulación y actividad superficial en cultivos de *Bacillus subtilis* a diferentes relaciones de C:N a nivel matraz.

MEDIO	C:N	Velocidad específica de crecimiento (μ) h⁻¹	Máxima cant. celular cel/ml	Actividad superficial (valores arbitrarios)	Eficiencia de esporulación
AQ	2.6	0.49	2.00x10⁹	3	No detectada
KS	8.0	0.45	2.05x10⁹	6	8.54%
KSAH	11.6	0.64	3.27x10⁹	7	7.65%
KSBH	5.7	0.91	2.35x10⁹	3	10.64%
KSAP	11.6	1.06	3.80x10⁹	3	No detectada
KSBP	5.7	1.07	2.80x10⁹	3	No detectada

Para explicar mejor los resultados obtenidos se correlacionaron los resultados. En la Figura 16 se muestra la tendencia de la actividad superficial en función de la relación C:N.

De un nivel medio a alto de C:N se obtiene alta actividad superficial. Sin embargo cuando se utiliza pasta de soya, no es favorable para obtener alta actividad superficial independientemente de la relación C:N.

Las relaciones C:N de 8 (medio definido KS) y 11.6 (medio KSAH) resultaron ser apropiadas para obtener alta actividad superficial.

En la Figura 17 se muestra la actividad superficial específica en función del número estandarizado de bacilos, se observa una tendencia de alta actividad superficial específica con bajas cuentas celulares, lo que puede indicar que haya una regulación del crecimiento por la presencia de lipopéptidos como lo sugiere Maget-Dana et al. (1992).

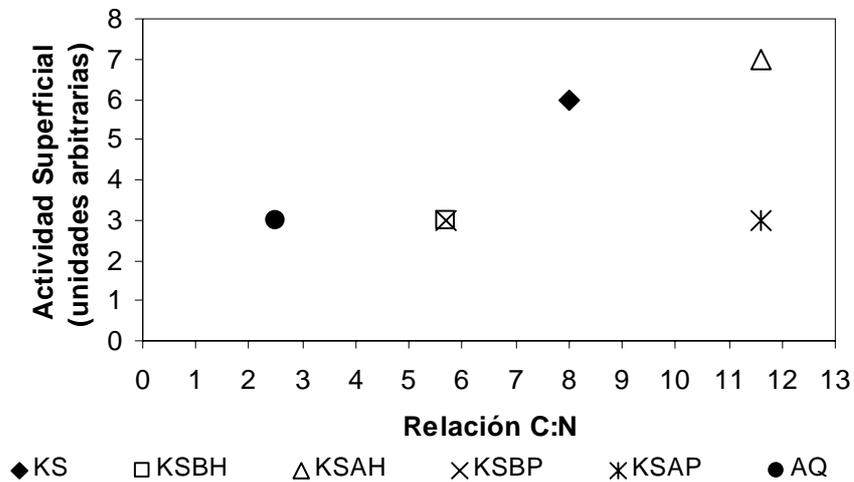


Figura 16. Actividad superficial en función de la relación C:N

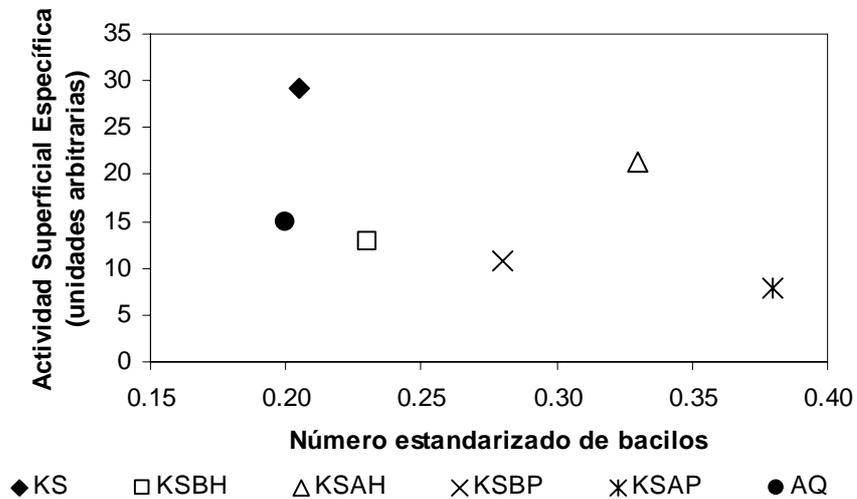


Figura 17. Actividad superficial específica en función del número estandarizado de bacilos a nivel matraz.

En la Figura 18 se muestra la tendencia de la actividad superficial en función de μ , observándose que cuando aumenta μ disminuye la actividad superficial específica y los valores de μ entre 0.4 y 0.6 h^{-1} fueron los más favorables, a excepción del medio AQ, el medio más complejo utilizado.

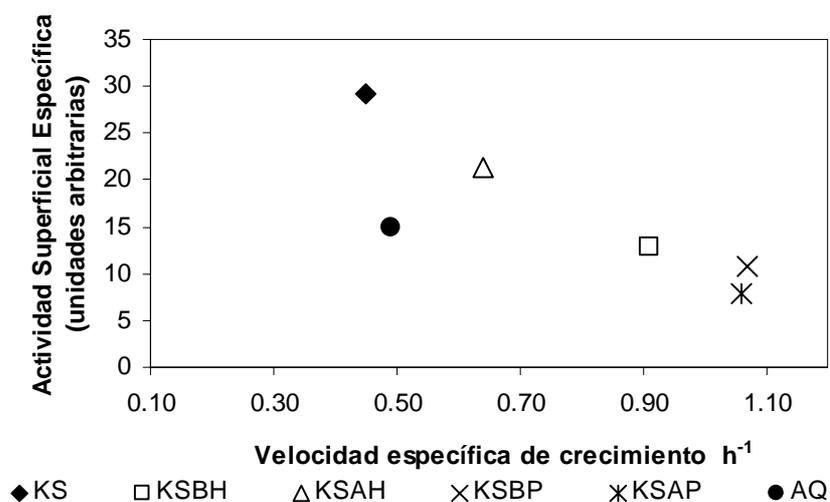


Figura 18. Actividad superficial específica en función de la velocidad específica (μ) a nivel matraz.

Para comparar los resultados obtenidos en este trabajo se realizaron cálculos de la relación de C:N de los medios utilizados para producción de biosurfactantes reportados en la literatura. Reiling et al. (1986) utilizaron un medio con un C:N de 16 y obtuvieron 2.25 g/l de ramnolípidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa*; el medio de Kim et al. (1997) utilizado en este trabajo corresponde a 8 de C:N; el medio AQ de Heins et al. (2000) corresponde a 2.6 de C:N también probado en este trabajo, con producción de 3 g/l de lipopéptidos; Reis et al. (2004) utilizando *Bacillus subtilis* en un medio a base de minerales y sacarosa y una relación de C:N de 12 obtuvieron producción de biosurfactantes durante la fase exponencial tardía, Nitschke et al. (2006) probaron *Bacillus subtilis* con un efluente de producción de harina de yuca, que contenía una C:N de 5.6 obtuvieron 3 g/l de un biosurfactante similar a la surfactina.

Después de la revisión de la literatura no se encontró alguna tendencia definida en cuanto a la relación C:N, para la producción de biosurfactantes.

En este trabajo se observó que a relaciones C:N entre 8 y 11.6, se favorece la producción de biosurfactante, determinado por actividad superficial.

VI. 4. Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica de los biosurfactantes producidos en medios de cultivo a nivel matraz.

Para relacionar la actividad antimicrobiana de los biosurfactantes con la actividad superficial obtenida se probaron sobrenadantes liofilizados y solubilizados de medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH, de 0, 12, 24, 36 y 48 horas de crecimiento, contra *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 19), contra *Fusarium sp.* (Figura 20) y sobre placas de agar sangre para determinar actividad hemolítica (Figura 21).

No se observó inhibición sobre *Pythium sp.*, y no se probaron los sobrenadantes de los medios de cultivo KSAP y KSBP por los bajos resultados en actividad superficial obtenidos previamente.

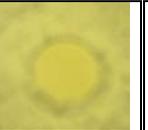
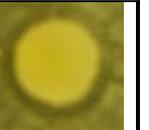
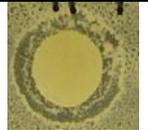
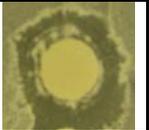
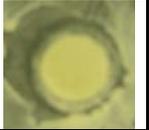
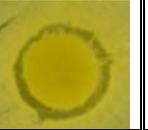
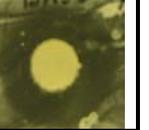
MEDIOS DE CULTIVO	Cultivo de 12 horas	Cultivo de 24 horas	Cultivo de 36 horas	Cultivo de 48 horas
AQ C:N 2.6				
KS C:N 8				
KSAH C:N 11.6				
KSBH C:N 5.7				
Control				

Figura 19. Actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae* con los medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH a nivel matraz.

MEDIOS DE CULTIVO	Cultivo de 12 horas	Cultivo de 24 horas	Cultivo de 36 horas	Cultivo de 48 horas
AQ C:N 2.6				
KS C:N 8				
KSAH C:N 11.6				
KSBH C:N 5.7				
Control				

Figura 20. Actividad sobre *Fusarium sp.* con los medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH a nivel matraz.

MEDIOS DE CULTIVO	Cultivo de 12 horas	Cultivo de 24 horas	Cultivo de 36 horas	Cultivo de 48 horas
AQ C:N 2.6				
KS C:N 8				
KSAH C:N 11.6				
KSBH C:N 5.7				
Control				

Figura 21. Actividad hemolítica con los medios de cultivo AQ, KS, KSAH y KSBH a nivel matraz.

Para analizar los resultados se graficaron los diámetros de inhibición y hemólisis (Figuras 22 a 25).

Con el medio AQ (Figura 22) la actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae* se detecta a las 24 horas permaneciendo prácticamente constante. La actividad hemolítica ya está presente a las 12 horas, hora en que ya empezó a decaer la población y ya se ha alcanzado el máximo valor de actividad superficial (3), a las 36 horas hay un ligero incremento de actividad hemolítica, para decaer a las 48 horas, lo que sugiere una degradación de biosurfactantes responsables de la hemólisis, proteasas podrían ser las responsables de este fenómeno (Grangemard et al. 1999). Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el medio AQ, no fue propicio para producir biosurfactantes con actividad superficial, aunque sí se observó actividad biológica, esto implica la producción de lipopéptidos como la iturina que tienen mayor actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

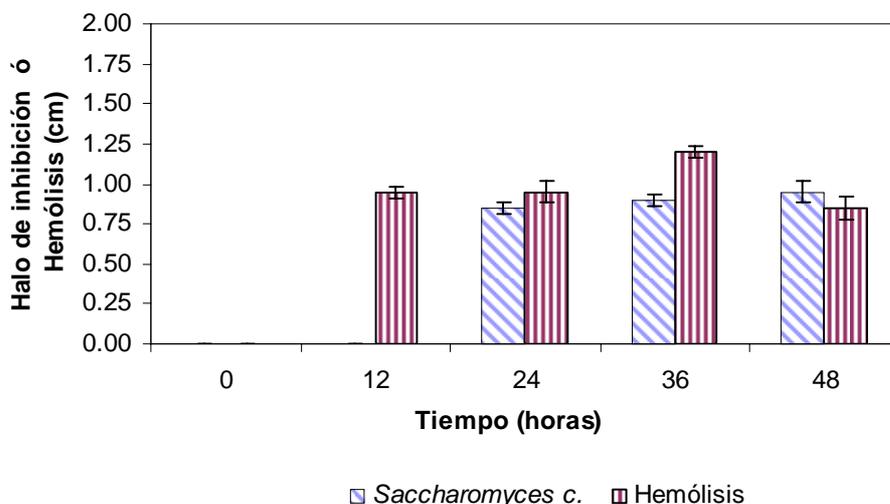


Figura 22. Inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* y actividad hemolítica con el medio AQ (C:N 2.6) a nivel matraz.

En el medio KS (Figura 23) se observa que la máxima inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* se determina a las 24 horas de cultivo, en que se tiene un valor de actividad superficial de 6. La actividad hemolítica se observa desde las 12 horas hasta el final. Los biosurfactantes producidos con este medio de cultivo tuvieron mayor actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae*

en fase estacionaria y mayor actividad hemolítica en el periodo de decaimiento de la población, es probable la presencia de surfactina e iturina y se favorezca a la mayor actividad hemolítica.

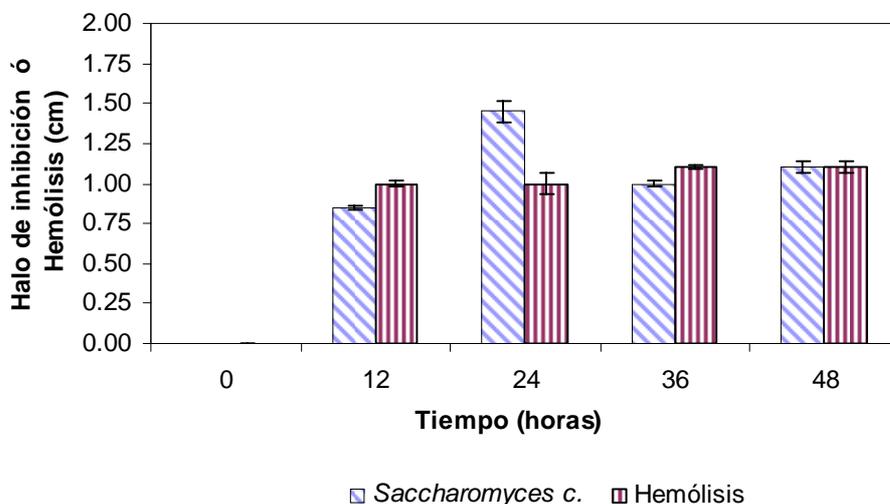


Figura 23. Actividad superficial, inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* y actividad hemolítica con el medio KS (C:N 8) a nivel matraz.

Con el medio KSAH (Figura 24) se observa inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* desde las 12 horas, con la mayor inhibición a las 24 horas, hora en que se tiene un valor de actividad superficial de 5, con una población en fase estacionaria, lo que indica la posibilidad de producción de iturina. La actividad hemolítica, se presenta desde las 24 hasta las 48 horas.

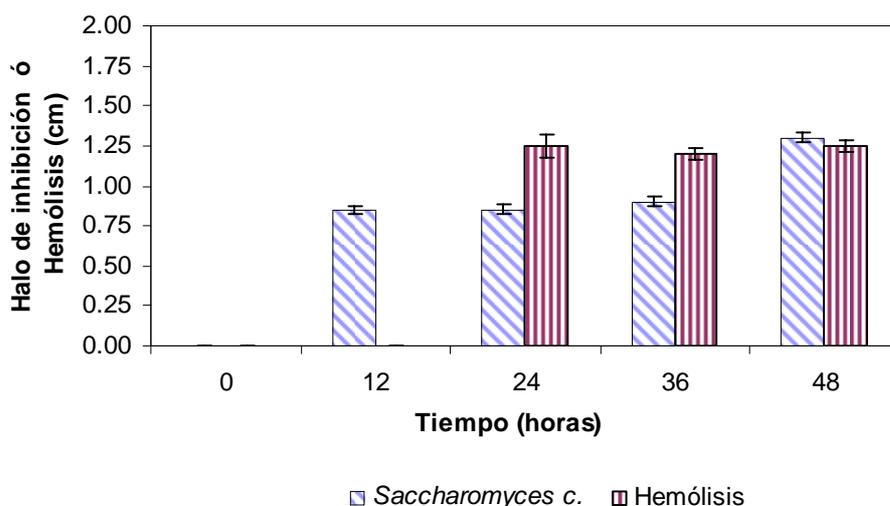


Figura 24. Inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* y actividad hemolítica con el medio KSAH (C:N 11.6) a nivel matraz.

El sobrenadante del medio de cultivo KSBH (Figura 25), presenta una alta actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae* y alta actividad hemolítica a las 48 horas, lo que indica que se favorece la producción de lipopéptidos con actividad biológica a una relación de C:N baja con adición de harina de soya. Los resultados indican que se produjo iturina por su alta actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque este medio presentó alta actividad biológica, no se seleccionó para continuar las pruebas de la siguiente fase de experimentos debido a su baja actividad superficial (el máximo valor fue de 3).

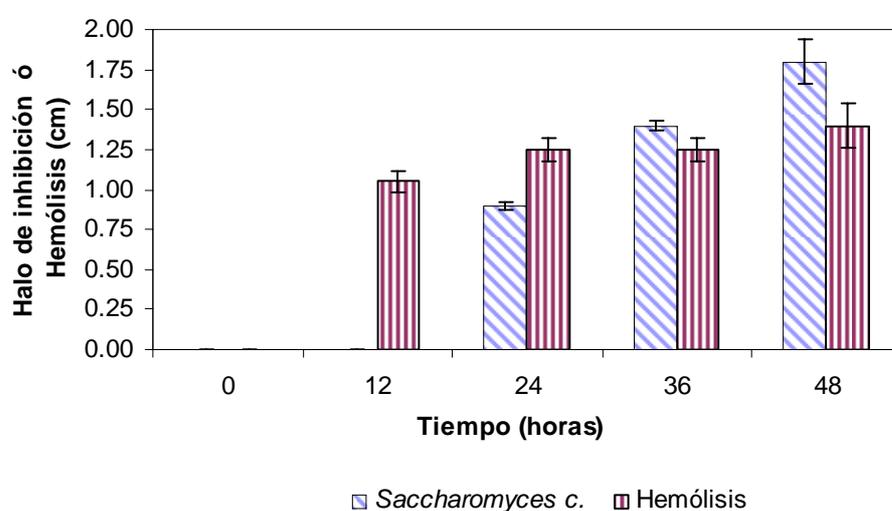


Figura 25. Inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* y actividad hemolítica en el Medio KSBH (C:N 5.7) a nivel matraz.

Las inhibiciones sobre *Fusarium sp.* no se cuantificaron por la irregularidad y mínima inhibición observada en todas las pruebas, parece ser que es necesaria una mayor producción de alguno de los lipopéptidos para que se observe una mayor inhibición. Sobre *Pythium sp.*, la inhibición fue nula.

En esta fase del trabajo se encontró que el medio KS y KSAH son medios propicios para la producción de biosurfactantes tanto con actividad superficial como biológica, por lo que se seleccionaron para continuar con las pruebas en fermentador y evaluar el efecto del oxígeno disuelto sobre la producción de los mismos.

VI. 5 Evaluación del efecto del nivel de OD sobre la producción de biosurfactantes con los medios KS y KSAH, en fermentador.

Los medios seleccionados para probar en fermentador fueron el medio KS (C:N 8) y el medio KSAH (C:N 11.6), ya que fueron los medios en los que se obtuvo mayor actividad superficial, y buena actividad biológica. Para realizar estos experimentos se manejaron dos niveles de oxígeno disuelto (OD), en el nivel bajo se aplicó una agitación de 150 rpm, (KS-1 y KSAH-1) para el nivel alto una agitación de 600 rpm, (KS-2 y KSAH-2), ambas condiciones con una aireación de 1 vvm, temperatura de 30°C y control de pH a 7.5.

VI. 5.1. Evaluación del medio KS en fermentador

Al probar el nivel bajo de OD medio KS-1 (Figura 26), se obtuvo una población máxima de 2.9×10^9 cel/ml (Tabla 5), una eficiencia de esporulación de 67%, μ de 0.57h^{-1} , rendimiento de glucosa de 0.26 g de cel/g de glucosa, una velocidad de consumo de glucosa de 2.22 g/l h y una máxima producción de lipopéptidos totales de 7.86 g/l cuantificados por HPLC, tomando como estándar surfactina de Sigma.

En este experimento se observó la fase estacionaria durante 6 horas, con disminución de la población y apreciación de esporas, la actividad superficial aumentó conforme al crecimiento alcanzando un máximo de (6) durante 4 horas (Figura 26 a). La velocidad de consumo de glucosa se detuvo a las 12 horas de crecimiento (Figura 26b), entre 5 y 7 horas de crecimiento se observó el mayor consumo de oxígeno (de 95 descendió a 37 %).

La producción de lipopéptidos totales se mantuvo baja hasta las 17 horas y se obtuvo un valor de 7.9 g/l a las 25 horas. Ésta concentración coincide con los rendimientos reportados por Kim et al. (1997) de 8 g/l aunque no con el perfil de producción. Se observó la esporulación durante la fase estacionaria, es probable que con la alta concentración celular haya una producción de péptidos-señal extracelulares para que se dé el fenómeno de esporulación (Sonenshein 2000).

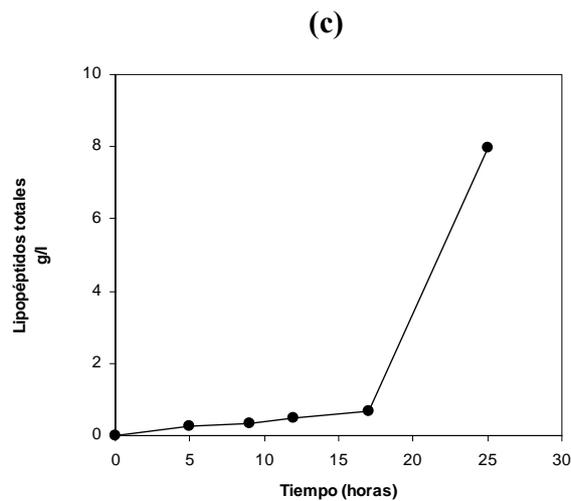
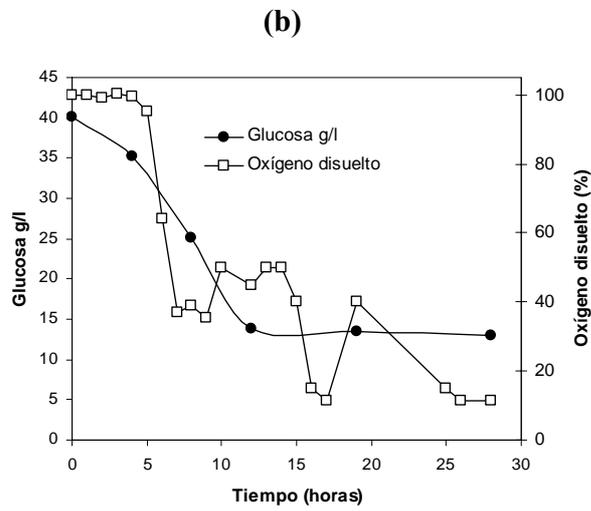
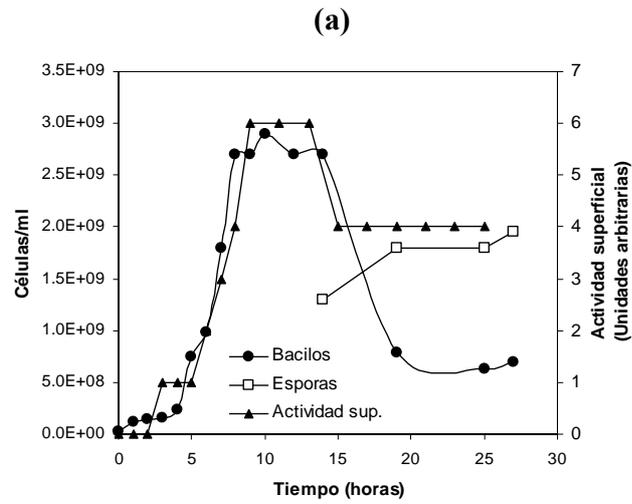


Figura 26. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa y oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KS-1 en fermentador.

Yeh M-S et al. (2006) al realizar un estudio en un biorreactor para producir surfactina, relacionan su producción con el crecimiento de *Bacillus subtilis*.

En este experimento (KS-1) se observó alta producción de lipopéptidos durante el decaimiento de población celular, a pesar de que la actividad superficial fue baja, lo que hace suponer que se están produciendo iturina con baja actividad superficial.

Al probar el medio de cultivo KS-2, en la condición OD nivel alto, se obtuvo una μ de 0.66 h^{-1} , el rendimiento celular fue similar al de la condición KS-1, la eficiencia de esporulación fue de 42%, la velocidad de consumo de glucosa fue menor que con la condición KS-1, se alcanzó la máxima actividad superficial (valor de 7) entre 7 y 14 horas y una máxima producción de lipopéptidos totales de 17.26 g/l a las 26 horas, valor alto con respecto a la condición KS-1.

En la cinética de crecimiento (Figura 27a) se observa, que se alcanza una población máxima de 2.92×10^9 células/ml, similar a la condición KS-1, lo que indica que los nutrientes son los que limitan la cantidad de población, independientemente del nivel de oxígeno disuelto.

La esporulación se detecta desde las 16 horas, cuando termina la fase estacionaria y empieza a descender la población. La máxima actividad superficial (valor de 7) se mantiene por 7 horas (Figura 27a). El consumo de glucosa (Figura 27b) se mantiene constante hasta las 20 horas en que disminuye. El porcentaje de OD disminuye de una manera uniforme, llegando a valores de cero por ciento a las 18 horas, lo que indica que *Bacillus subtilis* está utilizando el oxígeno más rápido que lo que la aireación está suministrando (Voguel 1997).

En la Figura 27c se observa una producción de lipopéptidos totales desde el inicio de la fermentación hasta el final. Se puede sugerir que los biosurfactantes producidos de las 15 horas en adelante son biosurfactantes con menor actividad superficial como la iturina, por lo que esta condición se recomendaría como óptima hasta las 15 horas para producir mayor concentración de lipopéptidos totales con actividad superficial.

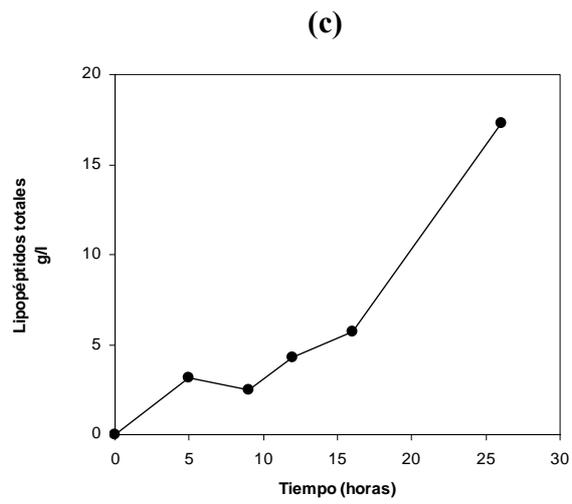
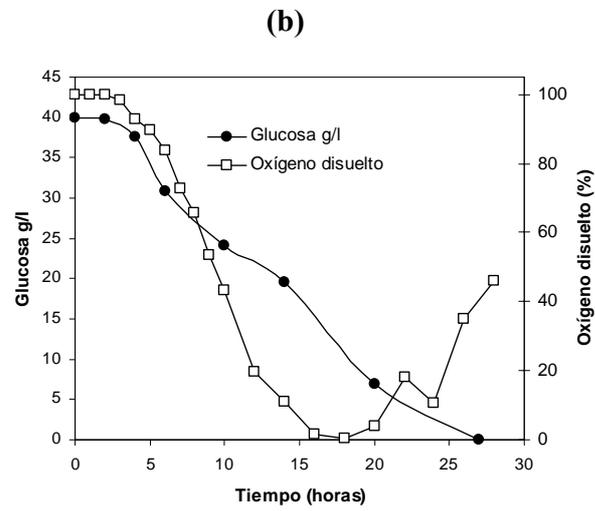
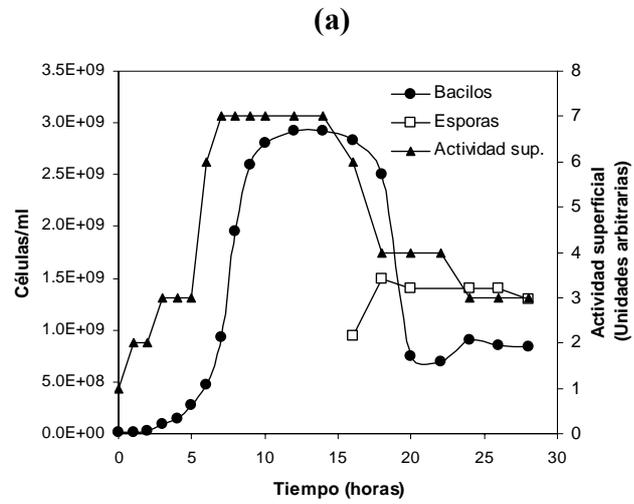


Figura 27. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KS-2 en fermentador.

Al analizar la información de las dos condiciones. Se observa que la población alcanzada es similar, se alcanzó mayor eficiencia de esporulación con la prueba OD nivel bajo.

El consumo de glucosa fue más prolongado, llegando a valores de cero, lo que indica una aceleración del metabolismo (Voguel 1997), la velocidad de consumo de glucosa al principio es alta con la condición KS-1, pero se detiene, en cambio la velocidad de consumo de la condición KS-2 es menor, pero sostenida hasta el final en que se agota, este comportamiento de aprovechamiento de glucosa se ve reflejado en la mayor producción de lipopéptidos totales con mayor nivel de oxígeno disuelto en el medio.

VI. 5.2. Evaluación del medio KSHA en fermentador

Al probar la condición de OD nivel bajo, medio KSHA-1, se observó que el crecimiento alcanzó un máximo de población de 3.68×10^9 células/ml (Figura 28a), asociada la alta población con la alta cantidad de sólidos totales de 78.57 g/l, la μ fue de 0.67 h^{-1} , no se detectó esporulación, el consumo de glucosa fue uniforme hasta las 20 horas (Figura 28b), la máxima actividad superficial alcanzada fue de 6 y la máxima producción de lipopéptidos totales fue de 2.21 g/l (Figura 28c), los porcentajes de OD se mantuvieron bajos (promedio de 6 %), lo que refleja la baja cantidad de oxígeno suministrado al medio, aunque sí se alcanzó un valor alto de actividad superficial (6). La actividad superficial antes de inocular, tuvo un valor de 3, actividad no observada en matraces, por lo que se tomó esta lectura como cero para fines prácticos durante las primeras 4 horas.

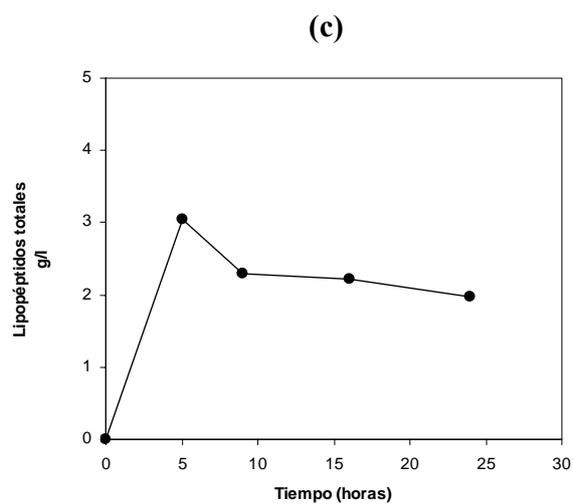
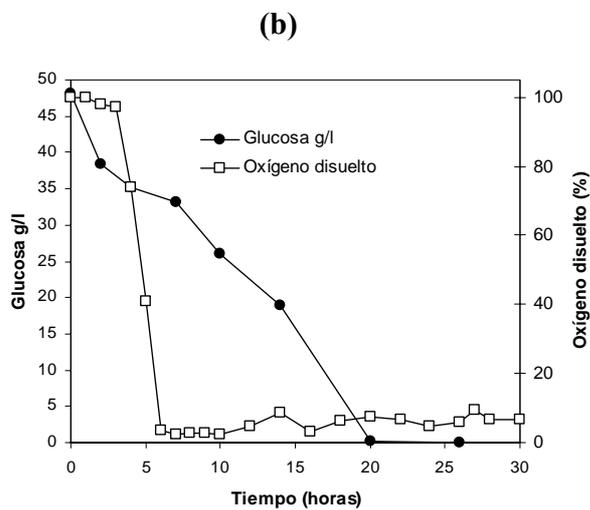
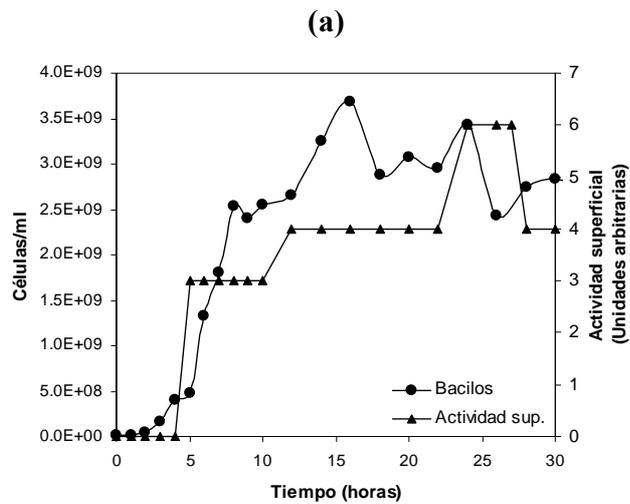


Figura 28. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KSAH-1 en fermentador.

En la evaluación del medio KSAH-2, con OD nivel alto (Figura 29), se obtuvo una población máxima de 3.2×10^9 células/ml, una μ de 0.87h^{-1} , una eficiencia de esporulación del 46.87%, un valor de actividad superficial máximo de 7 y una producción de lipopéptidos totales de 14.79 g/l, valor más bajo que con el medio KS pero 6.6 veces más que con la condición de oxígeno bajo.

El crecimiento celular (Figura 29a), se mantuvo en fase estacionaria durante 4 horas. La presencia de esporas se detectó a las 14 horas, aumentando gradualmente hasta las 32 horas. El disparo del valor de actividad superficial ocurrió entre las 9 y 12 horas tiempo en que se mantuvo en el valor de 7. El consumo de glucosa fue constante durante la fermentación (Figura 29b), se deduce que la alta actividad metabólica del microorganismo se refleja en una mayor producción de lipopéptidos totales (Figura 29c).

En esta prueba la mayor producción de lipopéptidos totales se llevó a cabo en la fase estacionaria, con lo que se deduce que hay una producción de lipopéptidos en fase exponencial y continúan produciéndose otros similares en fase estacionaria.

Es notable que la condición de OD nivel bajo no fue favorable para la producción de lipopéptidos totales, aunque por actividad superficial si se obtuvo un nivel alto (6), el valor máximo de g/l de lipopéptidos totales fue de 3 g/l, debido a que la CMC de estos biosurfactantes es baja.

En la figura 30 se muestra el cromatograma de HPLC de surfactina (Sigma), como referencia para la cuantificación de lipopéptidos, en la Figura 31 se presenta el cromatograma de HPLC para la muestra de medio KS-2 de 12 horas de crecimiento, en que se obtuvo una producción de lipopéptidos totales, de 4.3 g/l de lipopéptidos totales y actividad superficial con un valor de 7, en la Figura 32 se presenta el cromatograma de la muestra de KSH-2 de 12 horas de crecimiento, con 6.0 g/l de lipopéptidos totales.

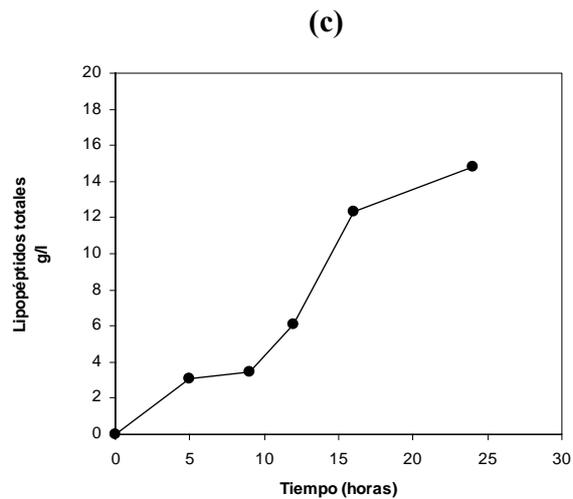
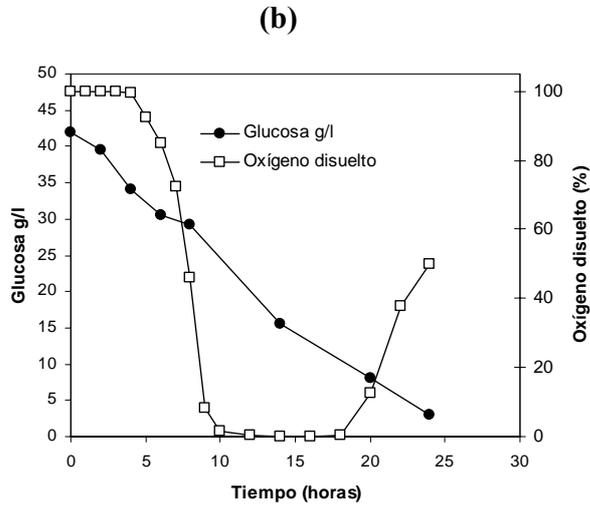
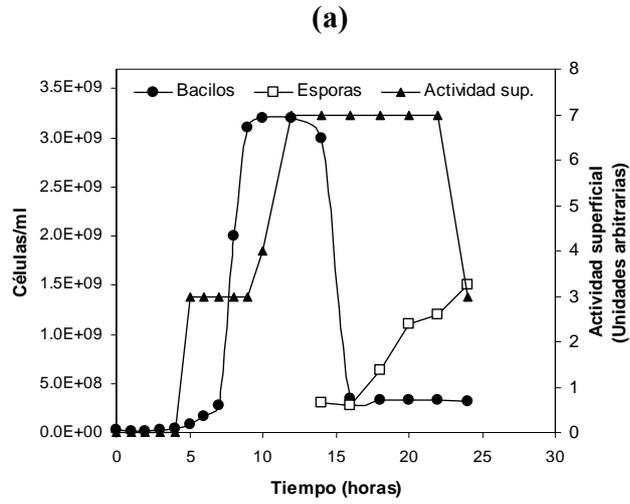


Figura 29. Cinética de crecimiento, actividad superficial (a), consumo de glucosa, oxígeno disuelto (b) y producción de lipopéptidos totales (c), Medio KSAH-2 en fermentador.

El estándar de surfactina (Figura 33) sirvió de referencia para cuantificación de lipopéptidos totales, por composición se observan diferencias entre lipopéptidos cuantificados en el medio KS-2 y el medio KSAH-2. Ya que los lipopéptidos pueden presentar isómeros que difieren en los picos de los cromatogramas, se sumaron las áreas de los picos obtenidos y con la curva de calibración (Figura 33) se calculó la concentración de los lipopéptidos totales (Wei 2002).

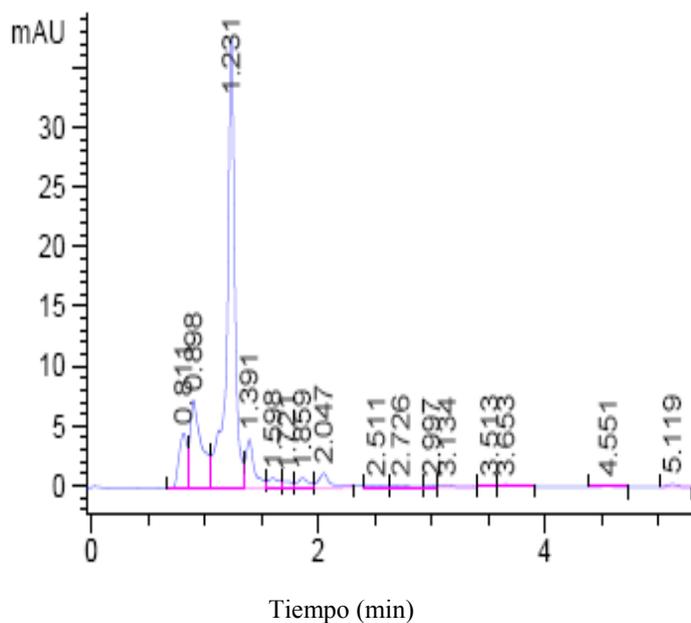


Figura 30 Cromatograma de HPLC estándar de surfactina (Sigma).

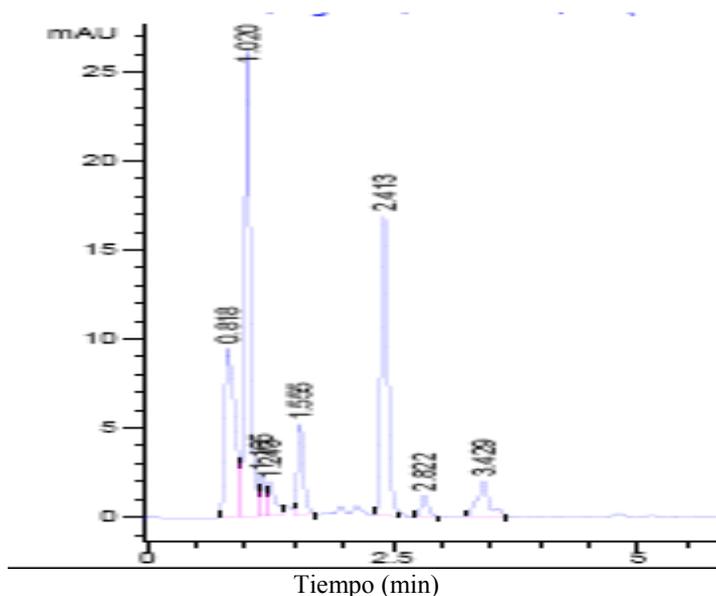


Figura 31 Cromatograma de HPLC de la muestra de KS-2 de 12 horas de crecimiento en fermentador

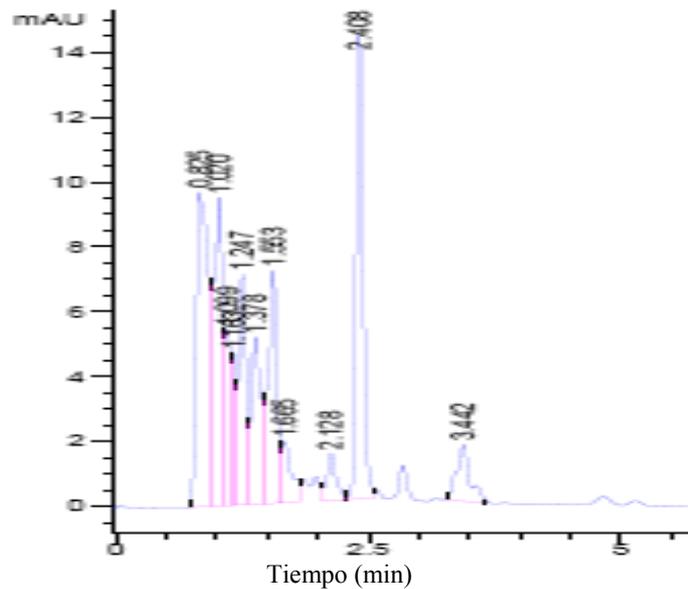


Figura 32 Cromatograma de HPLC de la muestra de KSAH-2 de 12 horas de crecimiento

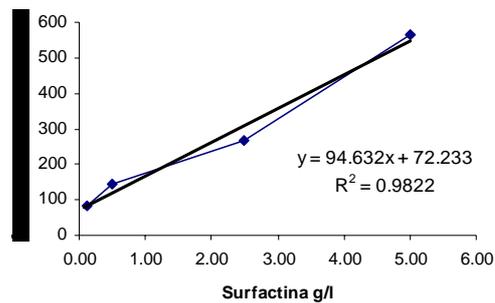


Figura 33 Curva de calibración con el estándar de surfactina (Sigma) por HPLC

De las pruebas llevadas a cabo se observa que con un nivel alto de OD, la producción de lipopéptidos es mayor en cualquiera de los dos medios, resaltando el medio definido KS.

En la Tabla 5 se presenta el resumen de resultados obtenidos en las evaluaciones de los medios KS y KSAH en fermentador.

Tabla 5. Evaluación del efecto de OD sobre la producción de lipopéptidos biosurfactantes en fermentador

MEDIO	μ (h ⁻¹)	Máxima población	Eficiencia de esporulación %	Y x/s (g de cel/ g de glucosa)	Vel. de consumo de glucosa (g/l.h)	Máxima actividad superficial (valor arbitrario)	Máxima producción de lipopéptidos totales (g/l)
KS-1 C:N 8	0.57 (R=0.95)	2.92 X10 ⁹	67.24	0.26	2.22	6	7.96
KS-2 C:N 8	0.66 (R=0.99)	2.92 X10 ⁹	42.12	0.27	1.55	7	17.26
KSAH-1 C:N 11.6	0.67 (R=0.96)	3.68 X 10 ⁹	ND	0.18	2.16	6	2.21
KSAH-2 C:N 11.6	0.87 (R=0.96)	3.20 X 10 ⁹	46.87	0.25	1.73	7	14.79

ND: No detectada

VI. 5.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica de biosurfactantes con sobrenadantes liofilizados a partir de fermentador.

Muestras de sobrenadantes de las pruebas en fermentador de 24 horas se liofilizaron y se verificó la inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae*, actividad hemolítica, inhibición sobre *Fusarium sp.* e inhibición sobre *Pythium sp.* La inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* es considerable en la pruebas alto nivel de OD, con una mayor inhibición con el medio KSAH-2, lo que sugiere mayor producción de lipopéptidos similares a iturina (Figura 34).

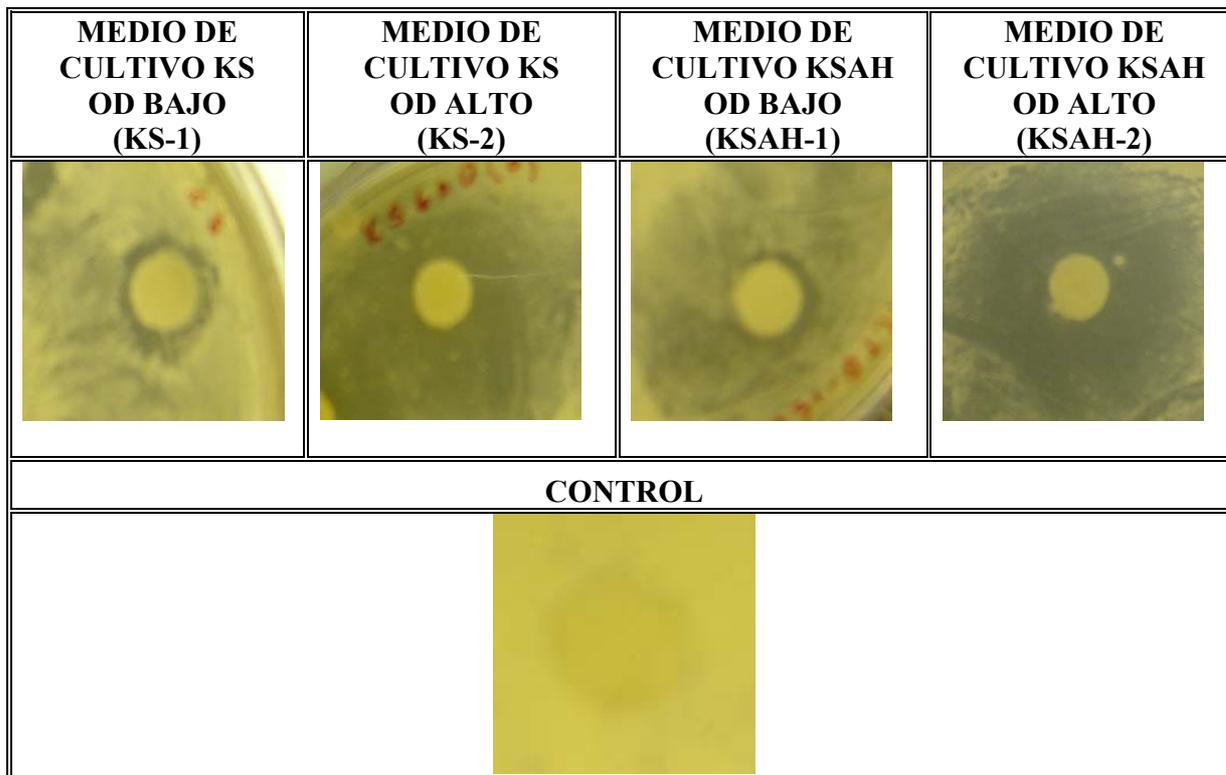


Figura 34 Actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae* de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo sumergido en fermentador.

Así mismo se observó mayor hemólisis en las pruebas con OD alto y la condición KSAH-2 (Figura 35) fue la que tuvo mayor diámetro de hemólisis, que concuerda con la alta actividad superficial observada y alta producción de lipopéptidos totales. (Tabla 5)

En este trabajo es probable que se haya presentado una actividad sinérgica entre lipopéptidos similares a iturina y surfactina, para obtener las altas hemólisis de las muestras sobrenadantes de las pruebas con alto nivel de OD.

La inhibición sobre *Fusarium sp.* fue similar entre las pruebas, la inhibición fue visiblemente mayor que la observada a nivel matraz (Figura 36).

La inhibición sobre *Pythium sp.* solo se pudo apreciar levemente en la prueba KSAH-2 (Figura 37) denotando que este tipo de compuestos podrían ser menos activos contra este organismo.

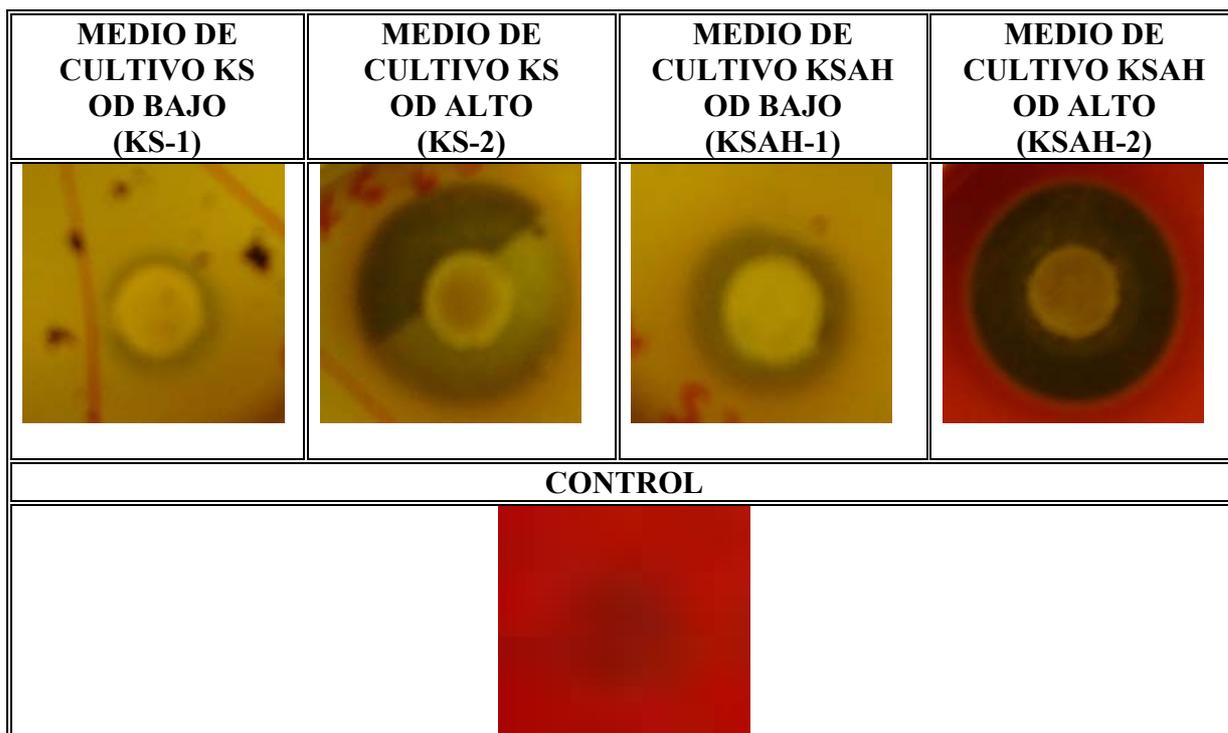


Figura 35 Actividad hemolítica de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador.

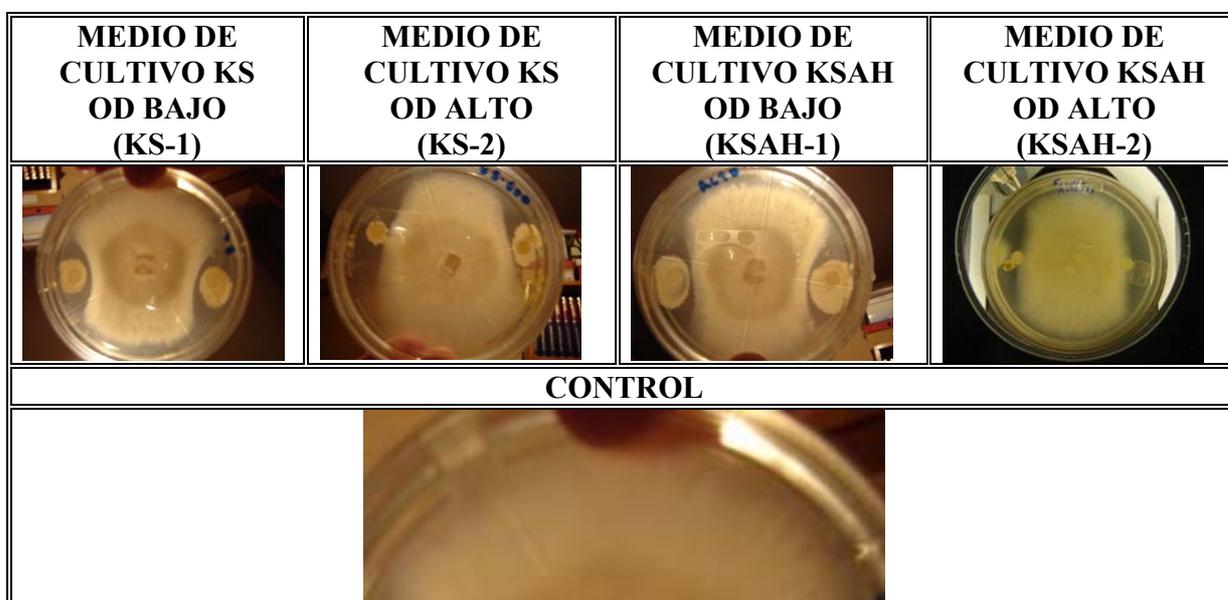


Figura 36 Actividad sobre *Fusarium sp.* de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador.

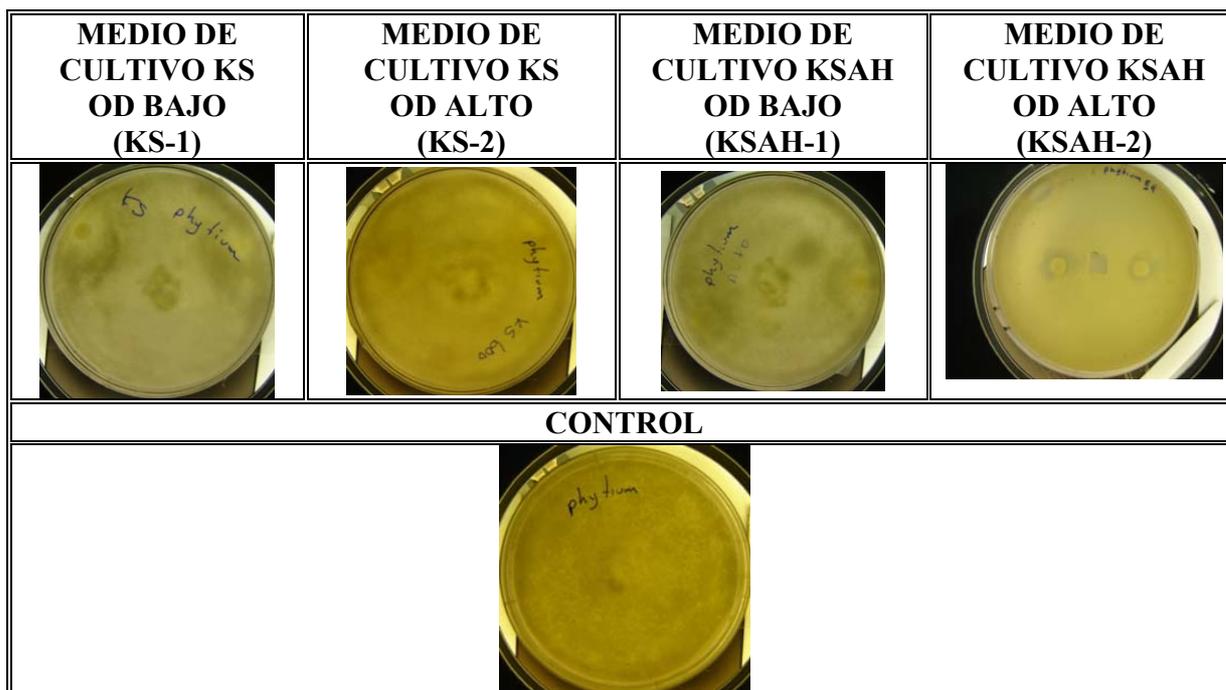


Figura 37 Actividad sobre *Pythium sp.* de sobrenadantes liofilizados de los medios de cultivo KS-1, KS-2, KSAH-1 y KSAH-2 a las 24 horas de crecimiento en cultivo en fermentador

De acuerdo a Grau et al. 2000, la iturina A tiene mayor efecto sobre hongos y levaduras, pero al parecer no fue suficiente para causar una inhibición considerable sobre los hongos probados, aunque si tuvo efecto sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

Para comparar los resultados biológicos se graficaron los diámetros de inhibición y de hemólisis. En la Figura 38 se observa que el medio KSHA-2 tuvo mayor diámetro de inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* y la mayor actividad hemolítica, por diámetro de hemólisis se observó ligeramente mayor con el medio KS-2, lo que sugiere que para actividad biológica, un medio con un nivel alto de OD y un medio con harina de soya favorece la inhibición de *Saccharomyces cerevisiae* y un medio definido favorece la actividad hemolítica.

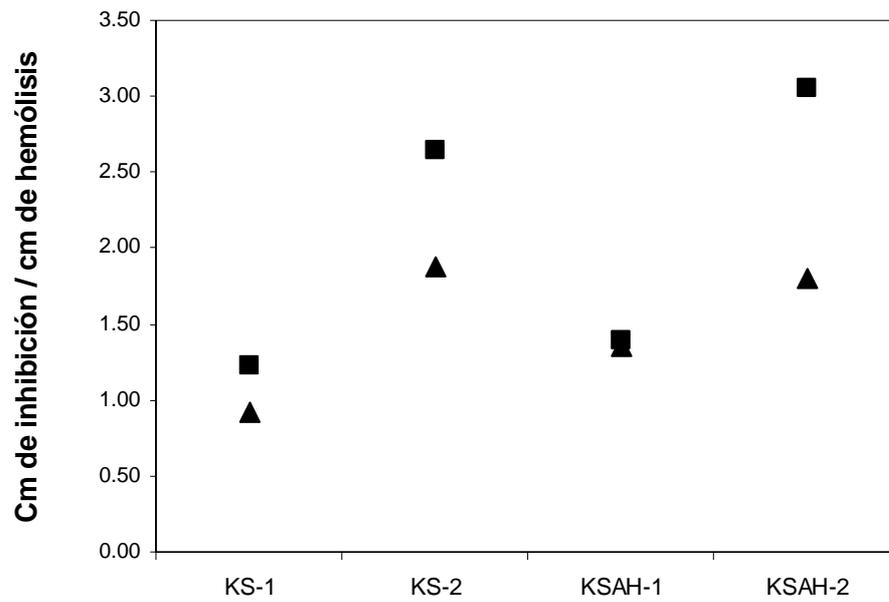


Figura 38. Actividad biológica sobre *Saccharomyces cerevisiae* y actividad hemolítica de sobrenadantes liofilizados de pruebas en fermentador.
■ cm de inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* ▲ cm de hemólisis

VII. CONCLUSIONES.

- A nivel matraz se formularon medios de cultivo variando la relación C:N y se evaluó su efecto sobre la producción de biosurfactantes por determinación de actividad superficial, la mayor producción se estableció a C:N de 8 y 11.6.
- A partir de liofilizados del sobrenadante de matraces se realizaron pruebas biológicas, la mayor inhibición sobre *Saccharomyces cerevisiae* se presentó a una relación C:N de 5.7 y a C:N de 8 y 11.6 fue significativa. La inhibición sobre *Fusarium sp.* fue mínima con todas las formulaciones. La actividad hemolítica fue significativa a una relación de C:N de 8 y 11.6.
- A nivel fermentador se evaluó el efecto del oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a las relaciones C:N de 8 y 11.6. Por actividad superficial la producción de biosurfactantes fue similar al probar bajo nivel de oxígeno disuelto. Por producción de lipopéptidos totales la mayor producción correspondió a la condición de C:N 8 con alto nivel de oxígeno disuelto, con lo que se demuestra que el nivel de oxígeno disuelto influye en la producción de lipopéptidos totales.
- A partir de liofilizados de sobrenadantes de pruebas en fermentador se realizaron pruebas biológicas, el mayor efecto sobre *Saccharomyces cerevisiae* se presentó a C:N de 11.6 y alto nivel de oxígeno disuelto, la mayor actividad hemolítica se determinó a C:N de 8 y nivel alto de oxígeno disuelto. El efecto sobre *Fusarium sp.* fue similar en todas las pruebas de fermentador. El efecto sobre *Pythium sp.* solo se observó ligeramente a una relación de C:N de 11.6 y nivel alto de oxígeno disuelto.
- El fenómeno de esporulación, relacionado con la concentración celular y regulación metabólica se presentó en mayor proporción a nivel fermentador a una C:N de 8 y bajo

nivel de oxígeno disuelto y similar en las dos condiciones de C:N con alto nivel de oxígeno disuelto.

- La condición más favorable para producción de biosurfactantes fue a una C:N de 8 y nivel alto de oxígeno disuelto.

VIII. PERSPECTIVAS.

Identificación específica de los lipopéptidos producidos en cultivo por lote, por medio de HPLC.

Correlacionar la actividad antimicrobiana con los lipopéptidos específicos producidos.

Proponer sistemas de recuperación de biosurfactantes, para utilización a nivel industrial.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aranda F.J., Teruel J.A., and Ortíz A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta* 1713, 51–56.

Banat I.M., Makkar R. S., Cameotra S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495-508

Besson, Françoise, Michel Georges, 1992. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis* evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnology letters*, Volume 14 No.II.

Chang Jo-Shu, Yeh Mao-Sung, Wei Yu-Hong. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 41, 1799-1805

Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 408–412.

Cooper, D. G., and D. A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:173-176.

Cui X. 2004. Regulation of Biosurfactant Production by Quorum Sensing in *Pseudomonas fluorescens* 5064, the Cause of Broccoli Head Rot Disease. PhD Thesis The University of Edinburgh

Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64.

Dunny GM, Leonard BAB. 1997. Cell-cell communication in gram positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 51, 527-564.

Farnet et al US Patent 0198981 A1

Feignier, Christine C. Besson, F. and Michel, G. 1995. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and Characterization of iturin- , surfactin+ mutants. Microbiology Letters 127, 11-15

Gohel V., Singh A., Vimal M., Ashwini P. and H:S: Ch. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology, Vol. 5, No. 2, pp 54-72.

Grau Alicia, Ortíz Antonio, de Godos Ana, and Gómez-Fernández C. 2000 A Biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic Iturin A with aqueous phospholipid bilayers. Archives of Biochemistry and Biophysics Vol 377 No 2 pp 315-323

Heins et al 2000. U.S. Patent 6103228

Hsieh F-Ch, Li M-Ch, Lin T-C and Kao S-Sh. 2004. Rapid Detection and Characterization of Surfactin-producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. Curr. Microb. Vol. 49, pp 186-191

Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H and Trevors J.T.1991 A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. Journal of Microbiological Methods 13, 271-279.

Jenneman, G. E., M. J. McInerney, R. M. Knapp, J. B. Clark, J. M. Feero, D. E. Revus, and D. E. Menzie. 1983. A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. Ind. Microbiol. 24:485-492.

Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y., 1997. Production and properties of a lipopéptido biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioeng. 84, 41-46.

Lang Siegmund. 2002. Biological amphiphiles microbial biosurfactants Technical University of Braunschweig, Current Opinion in Colloid & Interface Science 7,12-20.

Maget-Dana, L Thimon R., Peypoux, F., Ptak, M. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Société française de biochimie et biologie moléculaire*. 74, 1047-1051

Mulligan Catherine N. and Gibbs Bernard F. 1989. Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, p 3016-3019 Vol. 55 No. 11

Mulligan Catherine N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133, 183–198

Nitschke Marcia; Ferraz Cristina ; Pastore Gláucia M. 2004 Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production using Agroindustrial Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 81-85.

Nitschke Marcia, Pastore Maria 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology* 97, 336–341.

Peypoux F., Bonmatin J. M. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553-563.

Razafindralambo H., Popineau Y. Deleu M., Hbid C. Jacques P., and Paquot M. 1998. Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*: Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 911-916

Reiling H. E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos H. Hirt R., Käppeli O., and Fiechter A. 1986. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51 No. 5. 985-989.

Reis, F. A. S. L., Sérvulo, E. F. C. and de Franca F. P. 2004. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 113-116, 899-912.

Ron Eliora Z. and Rosenberg Eugene. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3 (4), 229-236.

Ron, E. Z.; Rosemberg, 2002. E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252.

Salager Jean-Louis. 1992. El mundo de los surfactantes Universidad de Los Andes Facultad de Ingeniería Química. Versión No. 1

Salager Jean-Louis. 1993. Surfactantes en solución acuosa. Universidad de Los Andes Facultad de Ingeniería Química. Versión No. 2

Specialty surfactants. US Industry study with forecast to 2009 & 2014. Study # 2032 February 2006.

Stachelhaus T, Schneider A. and Marahiel M.A. 1996. Engineered Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 52, 177-186.

Steller, S.,D. Vollenbroich, FLeenders, T. Stein, B. Conrad, J. Hofemeister, P. Jackes, P. Thonart, and J. Vater. 1999. Structural and functional organization of the fengycin syntetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* B213 and A 1/3. *Chem. Biol.* 6: 31-41.

Sonenshein AL. 2000. Control sporulation iniciation in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in Microbiology.* 3, 561-566.

Sullivan E. R. 1998, Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology.* 9, 263-269

Vater Joachim, Kablitz Barbel, Wilde Christopher, Franke Peter, Neena Mehta, and Cameotra Swaranjit Singh. 2002. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 12 , 6210–6219.

Voguel Henry C. and Todaro Celeste L. Westwood New Jersey USA 1997. Fermentation and Biochemical engineering handbook. Principles, Process Design, and Equipment. Second Edition . Noyes Publications. pp 227-230.

Wei, Yu-Hong and Chu I-Ming. 2002. Mn^{2+} improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters 24, p 479-482

Wei, Yu-Hong. Wang, Li-Fen. Chang, Jo-Shu And Kung, Shieh-Shiuh. 2003. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. Journal. of Bioscience and Bioengineering. Vol. 96, No. 2, 174-178.

Yakimov, M. M., Timmis K. N., Wray, V. and Fredrickson H.L. 1995. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant produced by Thermotolerant and Halotolerant surface *Bacillus licheniformis* BAS50. Applied and Env. Microbiol. Vol. 61. No. 5, 1706-1713

Yeh Mao-Sung. Wei Yu-Hong. Chang Jo-Shu. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry 41, p. 1799-1805

http://www2.uah.es/bioquimica/q-bp/8_contenidos.pdf

X. ANEXO I. GLOSARIO

Actividad superficial: Fenómeno por el cual una sustancia reduce la tensión superficial al disolverse en agua u otra solución acuosa.

Antimicrobiano: Perjudicial para los microorganismo, ya sea matándolos o inhibiendo su crecimiento.

Crecimiento exponencial: Fase del crecimiento de un microorganismo en la que el número de células se dobla en un período de tiempo fijo

Coenzima: Cofactor orgánico de una enzima unido a la misma por enlaces débiles (suele ser un nucleótido o una vitamina como CoA). Participa en la reacción enzimática como aceptor o donador (disociable) de grupos químicos o electrones.

Concentración micelar crítica: Concentración en que se forman micelas y a partir de la cual se pueden solubilizar más rápidamente los solutos.

Dominio: a). Secuencia continua de aminoácidos de una proteína, que se dobla o pliega varias veces sobre sí misma hasta formar una unidad globular o compacta. Se estima que cada dominio puede funcionar como una unidad o un módulo estable en solución si se llega a escindir la cadena polipeptídica que los separa. Este tipo de dominio se denomina dominio estructural. Las proteínas de tamaño superior a los 20 000 Da constan de dos o más dominios de este tipo. **b).** Fragmento, área o región de ADN de tamaño concreto en el genoma de un organismo.

Enzima: Catalizador biológico. Por lo general se trata de una proteína globular compuesta de una o varias cadenas polipeptídicas que necesita un cofactor para ejercer su función, pero también. Cataliza usualmente sólo un tipo de reacción (presenta especificidad reactiva) y actúa únicamente sobre un número limitado de sustratos (tiene especificidad de sustrato), promoviendo transformaciones siempre en el mismo sitio (presenta especificidad regional); en caso de que el sustrato tenga actividad óptica, reconoce de preferencia solo uno de los enantiómeros de una mezcla de enantiómeros (presenta especificidad enantiomérica).

Fase estacionaria: Período durante el ciclo de crecimiento de una población en el que cesa el crecimiento.

Fase exponencial: Período en el que el crecimiento del número de individuos de una población es exponencial.

Gen de procariotes: La secuencia de ADN o de ARN que codifica uno o varios productos capaces de desempeñar una función específica generalmente fuera de su lugar de síntesis. Estos productos pueden ser polipéptidos (es el caso de la mayoría de los genes) o ARN (ARNt, ARNr). El segmento de ADN o de ARN que codifica un polipéptido contiene asimismo secuencias reguladoras tales como los promotores, silenciadores, o potenciadores; el polipéptido que resulta de la traducción de un ARNm puede a su vez escindirse en varios polipéptidos con funciones distintas; un

ARN transcrito también puede originar varios productos funcionales por el fenómeno de corte y empalme alternativo o mediante un mecanismo de escisión.

Hemo: Prefijo que expresa relación con la sangre. **2** Prefijo que expresa relación con un grupo hemo.

Marco de lectura: En genética es cada una de las posibles maneras de llevar a cabo la lectura de una secuencia nucleotídica como series de tripletes. Debido a que en el código genético se leen tres bases a la vez, si la lectura se efectúa a partir de la segunda o tercera base, resultará un producto defectuoso. lectura abierto. Marco de lectura. Incluye un codón de iniciación de la traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'.

Observación: a diferencia de la inglesa ORF, las siglas españolas correspondientes apenas se utilizan.

Marco de lectura abierto (*open reading frame* [**ORF**]): Segmento de una molécula de DNA que comienza con un codón de iniciación y acaba con un codón de terminación, compuesto únicamente de tripletes no solapados y que codifica un polipéptido.

Medio: En microbiología, solución(es) nutritiva(s) usada(s) para el cultivo de microorganismos.

Medio complejo: Medio de cultivo cuya composición química exacta se desconoce. También llamado medio indefinido.

Medio de cultivo: Solución acuosa de varios nutrientes adecuada para el crecimiento de microorganismos.

Medio definido: Medio de cultivo cuya composición química exacta es conocida.

Metabolito primario: Producto excretado por un microorganismo durante la fase de crecimiento, o exponencial (por ejemplo, ácido láctico en una fermentación láctica).

Metabolito secundario: Producto excretado por un microorganismo al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria (por ejemplo, un antibiótico en un organismo productor).

Nutriente: Sustancia que la célula toma de su ambiente y que utiliza en reacciones catabólicas o anabólicas.

Operón: Unidad génica de los organismos procariontes formada por un conjunto de genes que desempeñan funciones metabólicas relacionadas y que se expresan de forma coordinada y regulada.

Surfactante: Sustancia que reduce la tensión superficial de un líquido, y que sirve como agente humectante o detergente.

Tensión superficial: Fuerza que actúa tangencialmente por unidad de longitud en el borde de una superficie libre, de un líquido en equilibrio y que tiende a contraer dicha superficie. La tensión superficial tiene como principal efecto la tendencia del líquido a disminuir en lo posible su superficie para un volumen dado, de aquí que un líquido en ausencia de gravedad adopte la forma esférica, que es la que tiene menor relación área/volumen. Sus unidades son de $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}=\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$

Velocidad de crecimiento: Velocidad a la que crece un microorganismo, expresada habitualmente como tiempo de generación. (h^{-1}).