

# Valorización de residuos agroindustriales para la obtención de liquenisina por *Bacillus licheniformis* AL 1.1

Jonathan Coronel León



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License](#).



Facultat de Farmàcia

**Valorización de residuos agroindustriales para la  
obtención de liquenisina por *Bacillus  
licheniformis* AL 1.1**

**Jonathan Coronel León  
2015**





Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorado: Biotecnología

**Valorización de residuos agroindustriales para la  
obtención de liquenisina a partir de *Bacillus  
licheniformis* AL 1.1**

Memoria presentada por **Jonathan Coronel León** para optar al título de Doctor  
por la Universidad de Barcelona

Directoras de Tesis:

Dra. Maria Àngels Manresa i Presas

Dra. Ana M. Marqués Villavecchia

Tutora:

Doctorando:

Dra. Maria Àngels Manresa i Presas

Jonathan Coronel León

**Jonathan Coronel León**  
**2015**





**Dra. Maria Àngels Manresa i Presas**, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias y la **Dra. Ana M. Marqués Villavecchia**, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, ambos, de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona,

INFORMAN:

Que la memoria titulada “Valorización de residuos agroindustriales para la obtención de liquenisina por *Bacillus licheniformis* AL1.1”. Presentada por JONATHAN CORONEL LEÓN para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología (Farmacia), y considerándola finalizada, autorizamos su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmamos la presente en Barcelona, el día 19 de junio de 2015

Dra. Maria Àngels Manresa i Presas

Dra. Ana M. Marqués Villavecchia



La presente tesis doctoral ha sido financiada gracias a la beca concedida por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología e Innovación (SENESCYT) y la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) del gobierno de Ecuador. Al Ministerio de Educación y Ciencia de España a través de los proyectos CTQ-2010-21183-C02-01 y CTQ-2014-59632-R. A la Generalitat de Catalunya a través del proyecto 2014-SGR-534 y a la Universidad de Barcelona.





Un día escuche, que dos estrellas nunca podrían brillar juntas y pensé "*Muchas gracias por dejarme brillar*" sin embargo el pasar del tiempo me enseñó que mi brillo no es más que el producto de tu reflejo, gracias por el amor y la paciencia, este gran logro es para ti Linda que me lo has dado todo por nada y para nuestro pequeño Sebastian.

A mis padres, Carlos y Rosa por dejarme volar y enseñarme a cumplir mis metas sin importar lo duro que pueda ser el camino, también a mis hermanos, Israel, Jean Carlos y Ronaldo por siempre estar presentes.



## Agradecimientos

La realización de la presente tesis doctoral, ha sido una experiencia única que me ha permitido crecer tanto a nivel personal como profesional, donde he podido desarrollar aptitudes que no había imaginado nunca. Una de las principales fue entender la importancia del trabajo en equipo, la cooperación es esencial para un campo tan multidisciplinario como es la investigación.

Con el mayor respeto me permito llamar “Mi Equipo” a todos quienes de una u otra manera aportaron con su granito de arena para que este proyecto sea hoy una realidad. Es necesario que mis primeras palabras de agradecimiento sean para Dios, quien ha bendecido mis decisiones y guiado mis pasos, además ha puesto personas maravillosas en mi vida.

La dirección de esta tesis ha estado a cargo de dos grandísimas personas y profesionales que durante estos cuatro años me han guiado y compartido sus conocimientos. Por tal razón, quiero dar las gracias a la Dra. Àngels Manresa, por abrirme las puertas de su laboratorio, por creer en mí sin conocerme, por darme la oportunidad de iniciar y hoy concluir este sueño. También mi agradecimiento para la Dra. Ana M. Marqués que a mi llegada al departamento me ofreció su ayuda y sus consejos. Sin ninguna duda sin su colaboración muy difícilmente hubiera logrado terminar este trabajo. Lo más importante es que tengo la certeza que la vida me ha dado dos grandes amigas.

Quiero hacer extensivos mis agradecimientos, para los profesores: Dra. Maribel Farfán, Dra. Mercedes Berlanga, Dra. Carmen Fusté y Dr. David Miñana del departamento de Microbiología, quienes me han recibido y ayudado cada vez que los necesite. De igual manera al Dr. Gaspar Lorén, por la ayuda en la interpretación matemática de los resultados de adhesión. Al mismo tiempo, a mis compañeros del departamento quienes han perseguido el mismo objetivo, el desarrollo de su tesis, unos ya lo han terminado como es el caso de

Cesar y Nacho quienes me acogieron de la mejor manera a mi llegada al departamento, mi agradecimiento muy especial para Guillermo ya que fue quien me ayudó en la etapa inicial de mi formación. A Mónica, Karla, Ari y Montse porque siempre que necesite su ayuda su respuesta fue positiva. Además agradecer a la Dra. María Jesús Montes, Carmen Guillen y Lucía Muñoz por que su labor y apoyo es esencial para todos quienes laboramos en el departamento.

Como parte del desarrollo de mi trabajo doctoral, tuve la suerte de establecer relaciones con otros grupos de investigación, en este sentido, quiero dar las gracias:

Al Dr. Francesc Rabanal y Dra. Ariadna Grau, porque su ayuda fue determinante para caracterizar el producto con el cual desarrolle mi trabajo doctoral.

A la Dra. María José Espuny y la Dra. Carmen López, ya que me enseñaron a observar y descubrir un campo nuevo como es la microscopía electrónica.

A la Dra. Aurora Pinazo, Dra. Lourdes Pérez y al Dr. Ramón Pons quienes me abrieron las puertas del departamento de tensioactivos del CSIC, y me ayudaron en una parte importante de mi tesis.

A Carolina Storniolo del Departamento de Fisiología de la Facultat de Farmacia de la Universitat de Barcelona, por la ayuda y los conocimientos aportados en el estudio de las propiedades biológicas del producto.

También tuve la oportunidad de realizar una estancia en la Universidad de Murcia, donde trabaje con la ayuda del Dr. Antonio Ortiz, Dr. José Teruel y Dr. Francisco Aranda, quienes siempre estuvieron dispuestos a solventar mis dudas. Además pude trabajar con la Dra. Josefa Bastidas excelentísima profesional y persona, quien siempre tuvo palabras de apoyo y motivación.

No puedo dejar de agradecer a mi familia, que a pesar de la distancia siempre estuvo presente, a mis padres Carlos y Rosa, mis hermanos Israel, Jean Carlos y Ronaldo que siempre me apoyaron. A mi esposa Linda y nuestro hijo Sebastian por la paciencia y las palabras de motivación cuando las cosas no salían bien. También a mi suegra Leonor, porque su apoyo fue necesario para iniciar mis estudios.

A la Dra. Esther Lilia Peralta, quien me ofreció la oportunidad de conocer la investigación y me motivó para que inicie mis estudios doctorales, luego de tanto tiempo el objetivo se está cumpliendo. A mis amigos de Ecuador, que muy a pesar de las diferencias horarias y de la distancia que nos separa, siempre se mantuvieron en contacto, dándome sus ánimos y consejos.

Finalmente, recordarles que quedo eternamente agradecido con cada uno de ustedes, y que si algún día me necesitan, no tengan la menor duda que cuentan conmigo.

**GRACIAS**



# ÍNDICE





<b>ÍNDICE.....</b>	<b>XVII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biotensioactivos (BT) como alternativa a los TS convencionales.....	3
1.2 Clasificación de Biotensioactivos.....	4
1.3 Propiedades fisicoquímicas de los BT.....	10
1.3.1 Reducción de la tensión superficial.....	10
1.3.2 Concentración micelar crítica (cmc).....	11
1.3.3 Formación de cristales líquidos.....	13
1.3.4 Capacidad de formar emulsiones.....	14
1.3.5 Balance hidrófilo-lipófilo (HLB).....	15
1.4 Papel fisiológico de los BT.....	16
1.5 Factores que afectan la producción de BT.....	18
1.6 Valorización de residuos agroindustriales .....	20
1.6.1 Compuestos ricos en lípidos.....	22
1.6.2 Compuestos ricos en carbohidratos.....	23
1.7 Potenciales aplicaciones de los BT.....	26
1.7.1 Agentes de limpieza y manejo ambiental.....	26
1.7.2 Agentes para evitar o eliminar la adhesión microbiana.....	27
1.7.3 Agentes para usos en la industria alimenticia.....	28
1.7.4 Agentes anticancerígenos.....	28
1.7.5 Aplicaciones en nanobiotecnología y para el transporte y liberación de fármacos.....	29
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>III. METODOLOGÍAS.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>37</b>
3.1 Materiales.....	37
3.2 Microorganismos y condiciones de cultivo.....	37
3.2.1 Microorganismos.....	37
3.2.2 Medios de Cultivo.....	38
3.2.3 Preparación de los inóculos.....	40
3.2.3.1 Preparación de inóculos para la producción.....	40
3.2.3.2 Preparación de inóculos para el estudio de la propiedades biológicas.....	40
3.2.4 Condiciones de cultivo de células Caco-2.....	41

3.3 Optimización de la producción.....	42
3.3.1 Efecto de los componentes del medio en la producción de BT.....	42
3.3.2 Optimización de la producción de BT a partir de residuos agroindustriales utilizando la metodología de la superficie de respuesta (MSR).....	43
3.3.2.1 Diseño experimental.....	43
3.4 Métodos analíticos.....	46
3.4.1 Determinación de la concentración de biomasa celular (g/L).....	46
3.4.2 Determinación del producto (BT).....	46
3.4.3 Obtención del extracto orgánico del producto.....	47
3.4.4 Purificación del extracto orgánico (BT).....	47
3.4.5 Consumo de melazas.....	47
3.4.6 Consumo de NaNO <sub>3</sub> .....	48
3.4.7 Determinación de la concentración de fosfolípido.....	48
3.5 Caracterización estructural propiedades físico-químicas y biofísicas del producto.....	48
3.5.1 Caracterización preliminar.....	48
3.5.2 Análisis estructural por Ionización por electrospray (ESI-MS).....	49
3.5.3 Determinación de aminoácidos y secuencia.....	49
3.5.4 Determinación de ácidos grasos.....	50
3.5.5 Propiedades físico-químicas y biofísicas.....	51
3.5.5.1 Determinación de la tensión superficial y concentración micelar crítica (cmc).....	51
3.5.5.2 Efecto de la fuerza iónica, temperatura y pH.....	52
3.5.5.3 Estudio de la Capacidad emulsionante.....	52
3.5.5.4 Formación de Cristales Líquidos.....	53
3.5.5.5 Isotermas de compresión o monocapa de Langmuir.....	53
3.5.5.6 Tamaño de los agregados y potencial zeta del producto y las mezclas de tensioactivos.....	54
3.5.5.7 Efecto del BT en membranas modelos y experimentales.....	55
3.5.5.7.1 Preparación de vesículas unilamelares a partir de los fosfolípidos.....	55
3.5.5.7.2 Efecto del producto sobre las vesículas unilamelares de fosfolípidos (LUV).....	55
3.6 Estudio del efecto del producto en células procariotas.....	56
3.6.1 Propiedades antimicrobianas: determinación de la CMI.....	56
3.6.1.1 Pérdida de iones potasio.....	57
3.6.1.2 Curvas de viabilidad.....	57

3.6.1.3 Citometría de flujo.....	58
3.6.1.4 Microscopia electrónica.....	60
3.6.2 Efecto del producto sobre la adhesión microbiana.....	61
3.7 Estudio del efecto del producto en células eucariotas.....	62
3.7.1 Determinación de la actividad hemolítica del BT.....	62
3.7.1.1 Experimentos de protección osmótica.....	63
3.7.2 Efecto del producto sobre la proliferación celular de las células cancerígenas Caco-2 ATCC (HTB 37).....	64
3.7.3 Estudio de la inducción de apoptosis en las células Caco-2.....	65
3.7.4 Estudio del efecto del producto en el ciclo celular de Caco-2.....	66
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>4. Producción del biotensioactivo (BT) por <i>Bacillus licheniformis</i> AL 1.1.....</b>	<b>71</b>
4.1 Optimización por simple omisión.....	72
4.1.1 Efecto de la temperatura y la agitación en el crecimiento de la cepa AL 1.1 y la producción de BT.....	72
4.1.2 Producción de BT con diferentes fuentes de carbono.....	75
4.1.3 Efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento microbiano y la producción de BT.....	77
4.1.4 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y distintas concentraciones de fosfatos sobre el crecimiento microbiano y producción de BT.....	79
4.1.5 Efecto de la concentración de calcio, hierro, y magnesio sobre la producción de BT y crecimiento de <i>B. licheniformis</i> AL1.1.....	81
4.2 Optimización de la producción de BT a partir de residuos agro-industriales.....	81
4.2.1 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	84
4.2.1.1 Diseño experimental: Diseño Rotacional Central Compuesto (DRCC).....	85
4.2.1.2 Modelo matemático: ajuste de los resultados a un modelo de regresión cuadrático.....	89
4.2.1.3 Ajuste de los datos experimentales a un modelo polinómico completo de segundo orden.....	94
4.2.1.4 Prueba de significación de los modelos de regresión.....	94
4.2.1.5 Aplicación de la técnica “autoajuste” del programa Essential Regression para la obtención del mejor modelo de regresión.....	97
4.2.1.6 Análisis matemático de la superficie de respuesta.....	101
4.2.1.7 Análisis gráfico de las superficies de las respuestas.....	108
4.2.1.8 Obtención de los valores óptimos.....	124
4.2.1.9 Validación experimental de los modelos.....	132

4.2.1.10 Validación de las condiciones óptimas.....	135
4.2.1.11 Curva de crecimiento.....	138
<b>5. Caracterización de la estructura química del BT producido por <i>Bacillus licheniformis</i> AL 1.1.....</b>	<b>143</b>
5.1 Purificación del extracto orgánico obtenido del precipitado del sobrenadante (extracción S-L).....	144
5.1.1 Determinación del peso molecular del extracto orgánico purificado por ionización por electrospray - Espectrometría de masas (ESI-MS).....	146
5.1.2 Composición y estructura de la parte hidrofílica del extracto orgánico purificado.....	149
5.1.3 Composición de la parte hidrofóbica del extracto orgánico purificado analizado por ESI/MS.....	155
5.2 Estudio de las propiedades físico-químicas de la liquenisina (Lch <sub>AL1.1</sub> ).....	159
5.2.1 Determinación de concentración micelar crítica (cmc) de la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	159
5.2.2 Estudio de la estabilidad de la Lch <sub>AL1.1</sub> a la temperatura, pH y fuerza iónica.....	160
5.2.3 Estudio de la capacidad emulsionante de la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	163
5.2.4 Formación de cristales líquidos.....	165
5.2.5 Isotermas de adsorción de la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	166
<b>6. Estudio de las propiedades biológicas de la liquenisina.....</b>	<b>169</b>
6.1 Efecto de la liquenisina (Lch <sub>AL1.1</sub> ) en células procariotas.....	171
6.1.1 Estudio de la actividad antimicrobiana de la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	171
6.1.2 Efecto de la Lch <sub>AL1.1</sub> en la adhesión microbiana.....	172
6.1.2.1 Efecto de la Lch <sub>AL1.1</sub> como pre-tratamiento inhibitor de la formación de biofilm.....	173
6.1.2.2 Efecto de la Lch <sub>AL1.1</sub> como agente antiadherente en el post-tratamiento.....	176
6.2 Efecto de la liquenisina (Lch <sub>AL1.1</sub> ) en células eucariotas.....	180
6.2.1 Permeabilización de membranas biológicas y membranas modelo por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	180
6.2.1.1 Permeabilización de glóbulos rojos inducida por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	181
6.2.1.2 Liberación de K <sup>+</sup> de eritrocitos humanos inducida por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	182
6.2.1.3 Efecto de protectores osmóticos en el proceso de hemólisis inducida por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	184

6.2.1.4 Liberación del contenido de vesículas unilamelares grandes (LUV) de POPC inducida por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	186
6.2.1.5 Efecto de la composición de la membrana lipídica en la permeabilización inducida por la Lch <sub>AL1.1</sub> .....	188
6.2.2 Efecto anti-proliferativo e inducción de apoptosis por la Lch <sub>AL1.1</sub> sobre células no diferenciadas Caco-2 ATCC (HTB 37).....	191
6.2.2.1 Inducción de la apoptosis de la Lch <sub>AL1.1</sub> sobre las células Caco-2 ATCC (HTB 37).....	192
6.2.2.2 Efecto de la Lch <sub>AL1.1</sub> en la regulación del ciclo celular.....	193
6.3 Nuevas aplicaciones: Interacción de la liquenisina con tensioactivos geminales de arginina y lisina.....	197
6.3.1 Isotermas de adsorción de la Lch <sub>AL1.1</sub> -tensioactivos sintéticos.....	197
6.3.2 Tamaño y zeta potencial.....	199
6.3.3 Evaluación propiedades antimicrobianas.....	202
6.3.3.1 Efecto de la mezcla C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub> /Lch <sub>AL1.1</sub> (80:20) sobre la viabilidad de cultivos de <i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267.....	206
6.3.3.2 Análisis por citometría de flujo de la población de <i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267.....	207
6.3.3.3 Detección de la pérdida de potasio.....	212
6.3.3.4 Efecto de la mezcla C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub> /Lch <sub>AL1.1</sub> (80:20) sobre la ultraestructura de <i>E. coli</i> O157:H7.....	213
6.3.3.5 Efecto de la mezcla C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub> /Lch <sub>AL1.1</sub> (80:20) sobre la viabilidad de cultivos de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313.....	215
6.3.3.6 Análisis por citometría de flujo de la población de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313.....	216
6.3.3.7 Detección de la pérdida de potasio.....	221
6.3.3.8 Efecto de la mezcla C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub> /Lch <sub>AL1.1</sub> (80:20) sobre la ultraestructura de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313.....	222
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>229</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>233</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>261</b>



## **ABREVIATURAS**





TS	Tensioactivos
BT	Biotensioactivo
LP	Lipopéptidos
W/O	Emulsión agua/aceite
O/W	Emulsión aceite/agua
cmc	Concentración micelar crítica
PEG	Polietilenglicol
DMSO	Dimetilsulfóxido
LUV	Vesículas unilamelares
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
CF	Carboxifluoresceína
K <sup>+</sup>	Potasio
C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub>	N <sup>α</sup> ,N <sup>ω</sup> -bis(N <sup>α</sup> -lauroil-L-arginina) propanodiamida dihidrocloruro
C <sub>6</sub> (LL) <sub>2</sub>	N <sup>α</sup> ,N <sup>ω</sup> -bis(N <sup>α</sup> -lauroil-lisina)α,ω-hexilendiamida
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina
EO	Extracto orgánico
EOP	Extracto orgánico purificado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CIF	Concentración inhibitoria fraccional
MS/MS	Masas en tándem
ED <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
A	Área
π	Presión superficial
DLS	Dispersión dinámica de luz
IP	Ioduro de propidio
BOX	Bis-oxonol
FS	Dispersión frontal ( <i>Forward scatter</i> )
SS	Dispersión lateral ( <i>Side scatter</i> )



# **I. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. Introducción

Una tendencia de actualidad es el desarrollo de procesos biológicos, tanto así que hoy en día es frecuente encontrar productos que incluyen el término “*bio*”. En este sentido, un campo que ha crecido considerablemente en los últimos años es el desarrollo de biocombustibles como alternativa a los derivados del petróleo. Esta necesidad también se ha extrapolado a otras áreas de importancia como la agricultura, donde el empleo de biofertilizantes promueve la producción agrícola orgánica.

No obstante, a pesar de esta nueva tendencia, se debe ser consciente que existen productos de síntesis química, indispensables para la vida cotidiana y que se han mantenido a lo largo del tiempo. Un ejemplo, son los tensioactivos (TS), estos compuestos se vienen produciendo desde civilizaciones ancestrales como la Babilonia. El pasar de los años ha hecho que actualmente encontremos TS en productos como desinfectantes, detergentes, jabones, etc. (Rebello *et al.*, 2014). Sin embargo, es la versatilidad de este tipo de compuestos, que hace que no simplemente se utilicen como agentes de limpieza, si no también formen parte de aplicaciones industriales como aditivos en pinturas, suavizantes de telas, y algunos incluso tienen propiedades antimicrobianas por lo que se utilizan como biocidas (Ivankovic *et al.*, 2009).

Los tensioactivos (TS) tienen una estructura molecular anfifílica, que consiste de un grupo con una atracción por solventes no polares (grupo hidrófobo), unido a una parte cuya atracción es por solventes polares (grupo hidrófilo). La principal propiedad de los TS es que cuando se encuentran en un sistema a una baja concentración, estas moléculas se absorben en las superficies o interfases y de esta manera modifican la tensión superficial o interfacial (Rosen, 2004). El hecho de que los TS sean ampliamente utilizados tiene como consecuencia que sean unos de los productos con una afectación negativa importante al medio ambiente. De hecho, recientemente, las aportaciones de Rebello *et al.*, (2014), han informado como la producción de TS agrava los problemas relacionados con el calentamiento global, cambio climático, agotamiento de la capa de ozono y las emisiones de gases de efecto

invernadero. Datos adicionales demuestran como el elevado consumo per cápita de detergentes en EEUU (10 kg/año) o en países del continente asiático (3,2 kg/año) ha desencadenado resultados negativos, ya que la eliminación de estos compuestos en ríos ha provocado su alta concentración residual en nuestro cuerpo (González *et al.*, 2012). Además, Marrakchi y Maibach, (2006) informaron que la utilización de TS aniónicos provoca dermatitis en personas con piel sensible. Estas razones han motivado la búsqueda de compuestos con una acción similar, pero considerando que su aplicación produzca consecuencias mínimas para la naturaleza ya que como se ha dicho el uso de los TS es inevitable.

Desde nuestra perspectiva, la biotecnología, puede ser importante para intentar controlar o evitar la contaminación ambiental. Como resultado de su aplicación existe un desarrollo considerable de productos biotecnológicos, compuestos como antibióticos, enzimas, alimentos fermentados, etc. son algunos de los que se comercializan. En el caso particular de los TS, diversos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de alternativas sostenibles, que permitan un conocimiento y aprovechamiento global de los recursos para su producción. Por tanto, como consecuencia de este requerimiento hoy en día se pone mucha atención al desarrollo de moléculas “verdes” o también conocidas como amigables con el medio ambiente. El concepto “verde” consiste en el uso de materiales renovables, para la síntesis de productos biotecnológicos en general. En el caso específico de los TS, da como resultado los llamados TS verdes. Esta nueva clase de productos son biodegradables y biocompatibles e intentan satisfacer la demanda creciente de los consumidores por productos que sean mucho más “verdes, suaves y eficientes” (Benvegnu y Sassi, 2010).

Dentro de esta nueva generación de TS verdes emergen los biotensioactivos (BT), que básicamente tiene la misma estructura que los TS, con la diferencia de que los BT pueden ser obtenidos de microorganismos y/o plantas. Los BT son biodegradables, presentan una baja toxicidad, de igual manera son biocompatibles, características que son importantes ventajas respecto los TS de síntesis química. A pesar de ello, existen ciertas

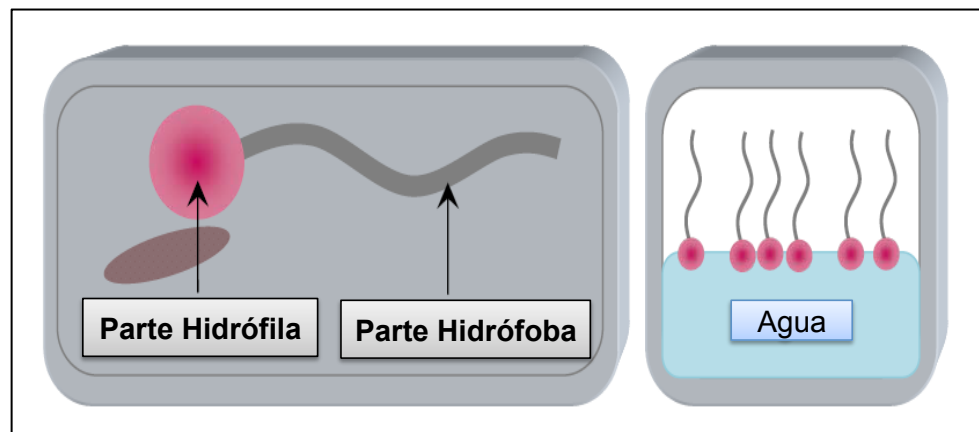
restricciones para su producción, la más importante es que es muy difícil conseguir rendimientos altos a precios asequibles. Este obstáculo hace muy difícil la competencia en términos económicos, sin embargo, se ha conseguido que los esfuerzos investigativos en la última década se direccionen al desarrollo de bioprocesos económicos, intentando sobre todo minimizar los costos de producción, con el fin de facilitar la comercialización de este tipo de compuestos. Distintos grupos de investigación han promovido que una de las estrategias atractivas para la producción de BT sea el uso de sustratos alternativos tales como los residuos agroindustriales. Así que parece que el futuro prometedor de los BT depende específicamente del uso de materias primas que sean abundantes, renovables y de bajo coste, y al mismo tiempo optimizar las condiciones de cultivo, con el fin de lograr altos rendimientos (Kosaric, 1992; Bognolo, 1999; Mukherjee *et al.*, 2006).

### **1.1 Biotensioactivos (BT) como alternativa a los TS convencionales.**

Como se ha mencionado, en los últimos años situaciones como la presión social y una preocupación justificada por mantener el equilibrio en el medio ambiente han impulsado que las investigaciones científicas retomen el desarrollo de los productos biotecnológicos como posibles reemplazos a los productos de síntesis química. Una alternativa factible a los TS de síntesis química, son los TS microbianos o también llamados Biotensioactivos (BT). Para obtener estos compuestos los microorganismos constituyen un pilar fundamental. Una ventaja de los microorganismos es la rapidez con la que se reproducen, además de que pueden obtenerse diversos compuestos de interés en función de las condiciones de cultivo.

Estos BT se pueden producir extracelularmente sobre la superficie del microorganismo, o ser excretados al medio de cultivo. Estos compuestos anfifílicos, al igual que los TS de síntesis química, tienen en su forma estructural una parte hidrófila, que puede ser un ácido, péptido, mono, di o polisacáridos y una cola hidrófoba de ácidos grasos (Figura 1.1) (Banat *et al.*, 2010). La mayoría de los BT son aniónicos o no iónicos, y hasta el momento no se han descrito en la literatura BT de naturaleza catiónica, sin embargo, en





**Figura 1.1** Molécula de tensioactivo y su orientación en agua. Los tensioactivos también se refieren a moléculas anfifílicas porque contienen una “cola” apolar y una “cabeza” con un grupo polar. (Figura adaptada de Sandersen, 2012).

algunos casos, la presencia de grupos que contienen nitrógeno imparten características catiónicas a parte de la molécula (Campos *et al.*, 2013).

## 1.2 Clasificación de Biotensioactivos

A diferencia de los TS de síntesis química que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo polar, los BT se categorizan principalmente por su composición química, peso molecular y su origen microbiano. Con respecto a su origen microbiano es importante enfatizar que son producidos por una variedad de microorganismos (Tabla 1.1) lo que les otorga una gran diversidad de estructuras químicas y propiedades superficiales (Gautam y Tyagi, 2006; Banat *et al.*, 2010). Los BT de acuerdo a su peso molecular se pueden dividir en moléculas de bajo peso molecular, eficientes para disminuir la tensión superficial e interfacial como glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos. Por otro lado están las moléculas de alto peso molecular que se unen fuertemente a las superficies y que pueden presentar características tanto de biotensioactivos y como de bioemulsionantes, siendo generalmente polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos o mezclas complejas de estos biopolímeros. Estos BT de alto peso molecular son importantes para estabilizar emulsiones (Banat *et al.*, 2010). En la Tabla 1.1. se presenta la clasificación de los BT de acuerdo al tipo y el microorganismo que los produce.

**Tabla 1.1** Clasificación de BT en función del microorganismo productor (Desai y Banat, 1997; Karanth et al., 1999; Al-araji et al., 2007).

<b>Glicolípidos</b>	<b>Microorganismos</b>
Trealosalípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i>
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis lipolytica</i> <i>Torulopsis sp.</i>
Celobiosalípidos	<i>Ustilago zeae</i> <i>Ustilago maydis</i> <i>Candida antartica</i>
Mannosileritritol	<i>Ustilago maydis</i>
<b>Lipopéptidos y lipoproteínas</b>	
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Fosfolípidos</b>	
	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Sphingobacterium detergens</i> <i>Thiobacillus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i>
<b>Ácidos grasos/lípidos naturales</b>	
	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Mycococcus sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Penicillum sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i>
<b>Sideróforos</b>	
Flavolípidos	<i>Flavobacterium sp.</i>
<b>Tensioactivos poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanan	<i>Candida tropicalis</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Si bien es cierto que se han reportado una importante variedad de BT, sin embargo, en la actualidad solamente dos grupos de estos compuestos son considerados de relevancia industrial y económica. Estos son glicolípidos y lipopéptidos (Geys *et al.*, 2014). En el presente apartado nos centraremos en describir de una manera general dichos grupos de BT.

### **Glicolípidos**

Estos son los BT mejor conocidos., Su estructura característica está formada por una parte polar que incluye carbohidratos unidos a unos ácidos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxialifáticos. Los BT más representativos de los glicolípidos son: ramnolípidos, soforolípidos, celobiosalípidos y mannosileritritol (MEL).

- **Ramnolípidos.**- se componen de una o dos moléculas de ramnosa y se unen a un máximo de tres moléculas de ácidos grasos hidroxilados, con una longitud de la cadena carbonada que va de 8 hasta 14, de los cuales el ácido *b*-hidroxidecanoico es el predominante (Banat *et al.*, 2000; Gunther IV *et al.*, 2005). Los ramnolípidos producidos a partir de *P. aeruginosa* se producen a escala industrial ya que se ha conseguido un equilibrio entre el costo/beneficio (Lourith y Kanlayavattanakul, 2009). En cuanto a las propiedades superficiales, los ramnolípidos tienden a disminuir la tensión superficial del agua de 72 mN/m hasta 27 mN/m , y presentan valores de cmc entre 110 y 150 mg/L (Abalos *et al.*, 2001). Los ramnolípidos son muy eficaces y además poseen excelentes propiedades antimicrobianas (Benincasa *et al.*, 2004).
- **Soforolípidos.**- están constituidos por una molécula de soforosa unida a un ácido graso hidroxilado. Estos BT, son producidos por cepas de levaduras como *Starmerella bombicola*, *Wickerhamiella domercqiae* y *Candida batistae* (Chen *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2008). Estos compuestos en general no tienen excelentes propiedades superficiales ya que provocan la reducción de la tensión superficial del agua de 72 mN/m hasta 35– 60 mN/m, si embargo los valores de cmc pueden variar de 5 a 80 mg/L, por lo que se pueden considerar como BT eficientes.

- **Celobiosalípidos.-** producidos por cepas fúngicas como *Ustilago maydis* y *Pseudozyma flocculosa*. Su estructura característica es una cabeza polar constituida de celobiosa, que se une a un ácido palmítico hidroxilado. Un ejemplo de este tipo de compuestos, es el Sporodex-L que es comercializado como agente antifúngico (Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2007).
- **Mannosileritritol (MEL).-** son compuestos interesantes, con diversos patrones de acilación y acetilación. Estas estructuras dependen del organismo de producción y de los sustratos utilizados. Los rendimientos de estas moléculas pueden llegar fácilmente a 100 g/L o más (Morita *et al.*, 2008). Los MEL tienen una alta hidrofiliidad y baja concentración de agregación (Imura *et al.*, 2006), lo que los hace adecuados como emulsionantes, dispersantes y detergentes. Estos BT pueden reducir la tensión superficial del agua hasta 33,8 mN/m con una cmc of  $3,6 \times 10^{-4}$  M, además poseen propiedades antimicrobianas (Morita *et al.*, 2007).

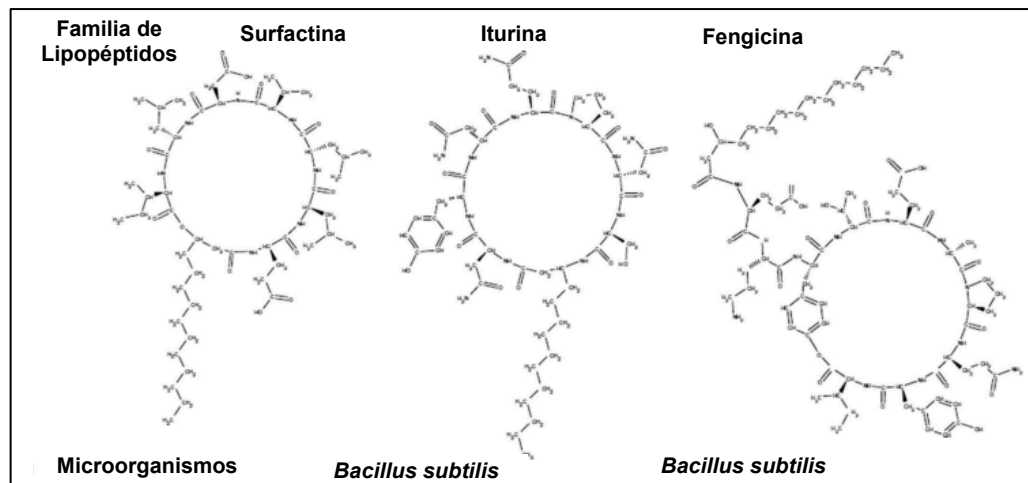
### **Lipopéptidos (LP)**

Son compuestos cuya parte hidrófila es un péptido cíclico o lineal, unido a una cola hidrófoba que generalmente es un ácido graso. Son producidos por una gran variedad de microorganismos por vía no ribosómica. Es importante aclarar que cuando en el trabajo se habla de LP nos referimos aquellos que tienen naturaleza tensioactiva. Es común encontrar información sobre LP que solamente tienen propiedades antimicrobianas; de hecho, Pirri *et al.*, (2009) aportan una revisión sobre los LP antibióticos, donde incluyen compuestos como afomicina, daptomicina, polimixina y sus derivados que se utilizan como importantes agentes terapéuticos.

Los LP tensioactivos son producidos por géneros bacterianos como *Bacillus*. Ya en el año 1968, se aisló por primera vez un lipopéptido cíclico producido por *B. subtilis* el cual se caracterizó como surfactina, demostrándose posteriormente su importante actividad superficial y la capacidad para inhibir la formación de coágulos de fibrina que tiene este compuesto (Arima *et al.*, 1968). Después de este acontecimiento, los siguientes estudios se han centrado en

elucidar la estructura química y profundizar las propiedades biológicas de la surfactina. También, la producción de LP se ha descrito para otros géneros microbianos, como por ejemplo, la producción de pseudofactin por *P. fluorescens* BD5 (Janek *et al.*, 2012).

A continuación se considerarán solamente los LP producidos por el género *Bacillus*. Estos TS se clasifican en tres familias; Surfactina, Iturina y Fengicina (Figura 1.2). En cada familia se presentan variantes de LPs, pero como característica común mantienen la longitud de la parte peptídica con diferentes residuos de aminoácidos ubicados en posiciones específicas. Por lo tanto, cada variante puede tener varios homólogos de diferente longitud de la cadena de ácido graso, lo que se traduce en una heterogeneidad estructural remarcable (Ongena y Jacques, 2008).



**Figura 1.2.** Familia de lipopéptidos producidos por el género *Bacillus*. Figura adaptada de (Rodrigues, 2015).

- **Surfactina.**- Está compuesta por 20 LP diferentes, dentro de los cuales se encuentran variantes de los siguientes productos Esperin, Liquenisina, Pumilacidina y Surfactina. Estos productos han sido aislados de cultivos de *B. subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus* y *B. licheniformis*. La característica principal es que todos sus miembros son heptapéptidos unidos a un ácido graso  $\beta$ -hidroxilado, formando una estructura de anillo de lactona cíclica (Peypoux *et al.*, 1999; Bonmatin *et al.*, 2003). La parte peptídica de esta familia contiene los siguientes aminoácidos: Glu/Gln, Leu/iLe, Val y Asp/Asn, las variantes de LP puede

estar relacionadas con las distintas condiciones de cultivo (Li *et al.*, 2008). Como hemos mencionado, el LP mejor caracterizado es la surfactina producido por cepas de *B. subtilis*. La surfactina es capaz de reducir la tensión superficial del agua de 72 hasta 27 mN/m con una cmc de 25 mg/L, por lo que se considera un BT eficaz y eficiente. Además muestra importantes actividades antimicrobianas, especialmente contra bacterias (Peypoux *et al.*, 1999). Su mecanismo de acción biológica se asocia con la capacidad de formar poros a través de las membranas con la consiguiente pérdida del contenido celular. Adicionalmente se conoce que tienen una alta actividad hemolítica (Carrillo *et al.*, 2003).

- **Iturina.-** se han descrito siete productos: Iturina (A, C), Bacilomicina (D, F, L, LC) y Micosubtilina. Estos LP son heptapéptidos enlazados a una cadena de ácido graso con una longitud de 14 a 17 átomos de carbono. Su producción está restringida a cultivos de *B. subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. En estos compuestos la parte peptídica se forma con: Asp/Asn, Tyr, Pro, Glu/Gln y Ser; presentan una importante actividad hemolítica igual que la surfactina, aunque su actividad biológica es diferente, ya que muestran una fuerte acción antifúngica *in vitro*, contra una variedad de levaduras y hongos, mientras que su acción antibacteriana es limitada (Gun Phae *et al.*, 1990; Moyne *et al.*, 2001). No obstante, el mecanismo de acción antifúngica de las iturinas se debe, con seguridad, a la capacidad de permeabilizar las membranas lipídicas igual que la surfactina. El mecanismo se basa en la perturbación osmótica como consecuencia de la formación de poros y pérdida de la viabilidad celular (Aranda *et al.*, 2005).
- **Fengicina.-** La tercera familia de LP comprende Fengicina A y B, que también se conoce como Plipastatinas. Estas moléculas son lipodecapeptidos con un anillo de lactona interna en la parte peptídica y con una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxilado (C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>) que puede estar saturado o insaturado. La producción de estos productos se ha identificado en cultivos de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. La parte peptídica está formada por:

Glu/Gln, Orn, Tyr, Thr, Ala, Pro e iLe. Estos compuestos son menos hemolíticos que las iturinas y surfactinas pero conservan una fuerte actividad antifúngica, específicamente contra hongos filamentosos (Vanittanakom y Loeffler, 1986; Bonmatin *et al.*, 2003; Hofemeister *et al.*, 2004). La acción de fengicina es menos conocida en comparación con otros LP, sin embargo se tiene conocimiento de que también interactúa fácilmente con la bicapa lipídica alterando la estructura de la membrana celular, provocando permeabilidad en función de la dosis aplicada (Deleu *et al.*, 2005).

### **1.3 Propiedades fisicoquímicas de los BT**

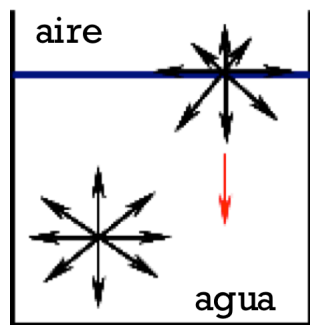
Los BT tienen la capacidad de absorberse en las superficies, lo que les confiere importantes actividades superficiales, que depende de la estructura del BT, la temperatura y naturaleza del solvente. Por lo tanto, para conocer las propiedades de estos compuestos nos podemos ayudar de mediciones termodinámicas que permitirán conocer el valor de tensión superficial, concentración de BT, capacidad de formar agregados, su orientación, la formación de emulsiones, así como conocer el valor del balance hidrófilo-lipófilo (HLB).

#### **1.3.1 Reducción de la tensión superficial**

La característica esencial de los BT en una solución, es que reducen la tensión superficial o interfacial ( $\gamma_{TS}$ ). Esta acción es debido a que las moléculas que se encuentran en la superficie de un líquido tienen una energía potencial mayor que las moléculas similares que se hallan en el interior del líquido (Figura 1.3). Esto se debe a que las fuerzas de atracción entre las moléculas de la superficie y el interior son altas. Por lo tanto, debido a que la energía potencial de las moléculas en la superficie es mayor que en el interior, es necesario realizar una cantidad de trabajo igual a esta diferencia de energía potencial, para llevar una molécula desde el interior a la superficie. Dicho trabajo es proporcional a la tensión superficial ( $\gamma_{TS}$ ), y se expresa como:

$$\gamma_{TS} = \frac{dW_{rev.}}{dA} \quad (Nm^{-1})$$

donde  $dW_{rev}$  significa el trabajo realizado o energía potencial y  $dA$  es el aumento del área superficial. Por otro lado, cuando nos referimos a la tensión interfacial, estamos hablando del trabajo requerido para expandir la interfase entre dos líquidos inmiscibles (Rosen, 2004).



**Figura 1.3.** Representación esquemática de las fuerzas cohesivas que actúan sobre las moléculas de un líquido en el seno y en la superficie. (Figura adaptada de Sánchez Marina, 2010).

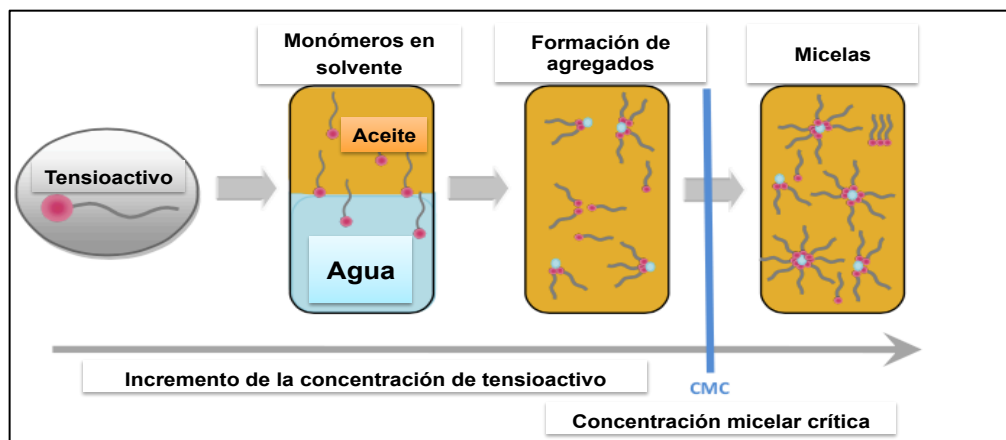
Desde un punto de vista funcional, los dos parámetros que definen a un BT son eficacia y eficiencia. La eficacia se define como el cambio máximo de tensión superficial que se produce por acción del BT sin considerar la concentración. En cambio, la eficiencia está medida por la concentración de BT requerida para producir una reducción máxima en la tensión superficial. Generalmente este valor se conoce como concentración micelar crítica (cmc) (Rosen, 2004; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Concentración micelar crítica (cmc)

Como se ha mencionado, la acción de un BT en solución provoca la disminución de la tensión superficial, pero al incrementar la concentración de BT, se produce una saturación de moléculas de BT en la interfase, por lo que espontáneamente los monómeros de BT que se encuentran en el interior de la solución empezaran a formar agregados. El valor al que ocurre este fenómeno se conoce como concentración micelar crítica (cmc) (Rosen, 2004).

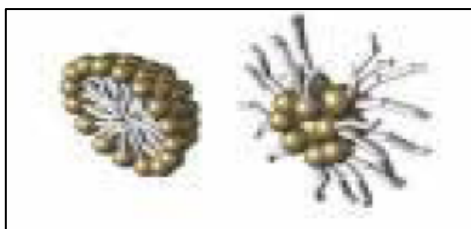


La cmc es una característica que define la actividad superficial de los BT, y es importante mencionar que para cada uno de ellos existe un valor de cmc. Por debajo de este valor las moléculas de BT se encuentran en forma de monómeros que se ubican en la interfase (agua-aire o agua-aceite). A medida que se incrementa la concentración de estos monómeros de BT se forman agregados (Figura 1.4). Una vez que se alcanza el valor de la cmc la tensión superficial también llega a un valor crítico y a partir de este valor la tensión superficial no cambia.



**Figura 1.4.** Formación de micelas (Figura adaptada de Sandersen, 2012).

La agregación es un proceso espontáneo y colaborativo (Figura 1.4). A pesar de que se han descrito distintas formas de adsorción y auto-agregación, el tipo más simple y común de forma de agregado es la micela. El término micela se utilizó por primera vez en la descripción de agregados de jabones y detergentes en soluciones acuosas (McBain, 1913). Las micelas se definen como agregados coloidales termodinámicamente estables de anfífilos solubles que se forman en un proceso espontáneo, cooperativo y reversible, que están en equilibrio con las moléculas libres de la disolución. Las micelas pueden adoptar varias formas y tamaños en función de la concentración y naturaleza del BT; por ejemplo, cuando los BT se asocian en disolventes apolares la orientación de los monómeros es inversa comparada con la adoptada en disoluciones acuosas (Figura 1.5). A partir de la cmc, cualquier cantidad de tensioactivo que se añada a la solución se incorpora en forma de agregado y no de monómero (Chevalier y Zemb, 1999).



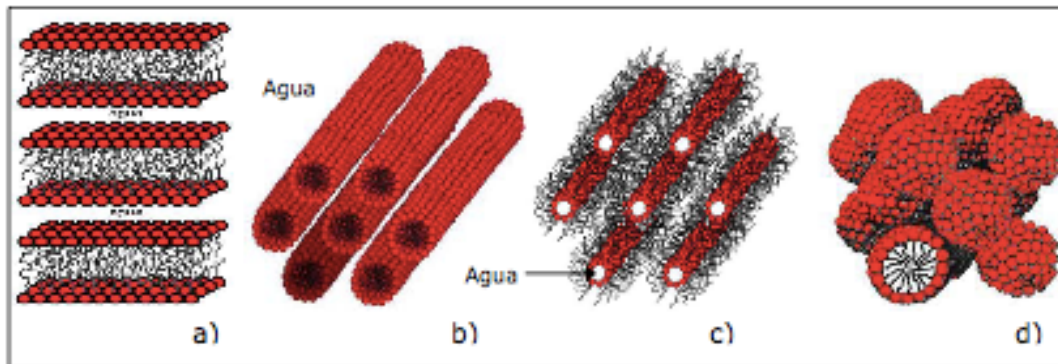
**Figura 1.5.** Representación de una micela (Izquierda) y una micela inversa (Derecha).

### **1.3.3 Formación de cristales líquidos**

Un incremento de la concentración de BT en una solución produce una formación espontánea de micelas, y cuando estas, se encuentran en un número suficiente, se empiezan a empaquetar y adquieren una serie de disposiciones geométricas. Estos empaquetamientos son conocidos como “cristales líquidos”, que presentan una disposición molecular ordenada similar a los cristales sólidos, y además poseen la movilidad de los líquidos. Este arreglo ordenado de las moléculas aumenta la viscosidad de la solución, a veces de forma muy considerable. Dependiendo de la forma de las micelas se formará el tipo de cristal líquido. Es decir, las micelas esféricas se empaquetan formando cristales líquidos cúbicos, las micelas cilíndricas tienden a formar cristales líquidos hexagonales, y por último las micelas laminares forman cristales líquidos lamelares (Rosen, 2004).

Cuando hablamos de fase laminar, quiere decir que las moléculas del BT se agrupan en bicapas que se encuentran separadas por una capa de agua de un espesor igual al de la bicapa (Figura 1.6a). Esta fase laminar también se conoce como líquida cristalina y se caracteriza por una relativa fluidez, a pesar de poseer una elevada proporción de BT. Otra fase que se pueden observar en la formación de cristales líquidos es la hexagonal, de donde se distinguen dos tipos: la hexagonal normal (Figura 1.6b) y la hexagonal inversa (Figura 1.6c). La fase hexagonal normal está constituida por micelas cilíndricas dispuestas en un retículo bidimensional hexagonal donde el agua forma una fase continua que llega a los espacios de los cilindros. Por otro lado, la fase hexagonal inversa es aquella que posee núcleos con los grupos polares de las moléculas y los grupos no polares orientados hacia el solvente no polar. También se

puede distinguir las fases cúbicas (Figura 1.6d) que poseen una viscosidad muy elevada y no presentan birrefringencia. Existen dos familias de fases cúbicas: las fases bicontinuas y las micelares. Ambos tipos de fases cúbicas pueden ser normales o inversas dependiendo de la solución (Pasquali *et al.*, 2006).



**Figura 1.6** a) Estructura de fase laminar; b) fase hexagonal normal; C) fase hexagonal inversa; d) fase cúbica micelar normal. (Figura adaptada de Burgos-Díaz, 2012).

### 1.3.4 Capacidad de formar emulsiones

Los BT debido a su naturaleza anfifílica, tienen la capacidad de formar emulsiones. Una emulsión no es más que una dispersión de un líquido en otro. Las emulsiones se pueden caracterizar de acuerdo al tamaño de las gotas, y la fase donde se produce la emulsión.

En este sentido de acuerdo al tamaño de las gotitas microscópicas que se forman, podemos identificar tres tipos de emulsiones: **Macroemulsiones**, son las más conocidas y se caracterizan por presentar un aspecto opaco, y el tamaño de las partículas presentes es mayor a los 400nm. Debido a su tamaño se pueden visualizar fácilmente utilizando un microscopio. Generalmente son emulsiones poco estables y se utilizan mucho ya que son rentables sobre todo porque se limita la cantidad de tensioactivo requerido (Rosen, 2004). **Nanoemulsiones**, son estables termodinámicamente y la emulsión tiene un aspecto semi-opaco que muchas veces presenta un color blanco-azulado. Los tamaños de partículas están entre 100 y 400 nm. Para su preparación estas emulsiones necesitan un poco más de tiempo y una alta cantidad de BT. Sin embargo, actualmente las microemulsiones han emergido como un sistema

novedoso de administración de fármacos, sea por vía transcutánea, tópica, oral, nasal, ocular, intravenosa y/o parenteral (Rosen, 2004; Fanun, 2012). **Microemulsiones** se forman mezclando las fases de una manera suave y diferente a los otros tipos de emulsiones. Estas emulsiones son generalmente transparentes y cinéticamente estables. El tamaño de partícula es menor de los 100 nm. A diferencia de las nanoemulsiones, se requiere una cantidad menor de BT. Estas microemulsiones se pueden encontrar en varias aplicaciones industriales, incluso se adaptan para la generación de nanomateriales (Rosen, 2004; Debnath *et al.*, 2015).

Las emulsiones también se pueden dividir de acuerdo a la fase dispersa y a la fase continua. Estas emulsiones se definen como emulsiones en dos fases, que se forman mezclando dos líquidos inmiscibles. Los tipos más comunes de emulsiones en dos fases son: i) las de **agua en aceite (W/O)**, donde una pequeña cantidad de agua es dispersada en un gran cantidad de aceite y las de **aceite en agua (O/W)**, donde una cantidad de aceite es dispersada en agua. A nivel de aplicaciones las emulsiones O/W son generalmente utilizadas en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentación (Lin y Chen, 2006).

### **1.3.5 Balance hidrófilo-lipófilo (HLB)**

El HLB indica la contribución relativa del grupo hidrófilo y lipófilo en la molécula del BT e informa de la capacidad de un BT para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua. Como regla general, valores bajos de HLB (3–6) favorece la formación de micro-emulsiones W/O, mientras valores altos de HLB (8–18) favorece las micro-emulsiones O/W. Para los BT con valores altos de HLB (HLBs > 20), a menudo se requiere un co-tensioactivo para reducir su valor efectivo de HLB (Rodrigues, 2015).

#### 1.4 Papel fisiológico de los BT

La diversidad estructural de los BT, hace que sea razonable considerar que los diferentes grupos de BT tienen distintos roles en la naturaleza. Sus propiedades superficiales dependerán de su estructura química, y esto hace que un determinado grupo de BT pueda tener cierta ventaja en una aplicación específica, mientras que otros grupos podrían ser apropiados para una aplicación diferente. Estos compuestos juegan un papel importante en la creación de sistemas biológicos bien organizados y se relacionan estrechamente con el intercambio de energías, sustancias y señales entre diferentes interfases (Ron y Rosenberg, 2001). El conocimiento real sobre las funciones biológicas, es en la actualidad un tema de mucho debate, no obstante se han definido las siguientes hipótesis: algunos de los papeles que se atribuyen a estas sustancias son la movilidad, interacción célula/célula para la formación de biofilms, mantenimiento y maduración, *quorum sensing*, amensalismo y patogenicidad. Cuando los microorganismos patógenos infectan plantas o animales podrían producir biotensioactivos, que actuarían como agentes dispersantes para el microorganismo y como agentes humectantes para la célula hospedadora. También podrían estar implicados en la diferenciación celular, accesibilidad a sustratos y resistencia a compuestos tóxicos.

Otro de los roles que se otorgan a los BT es que son capaces de favorecer el crecimiento de microorganismos en condiciones extremas, es decir cuando los microorganismos están en contacto con sustratos inaccesibles por su baja solubilidad. Es en este sentido que los BT favorecen la disponibilidad de dichos sustratos y permite que puedan ser utilizados como fuente de carbono (Van Hamme *et al.*, 2006).

En lo que se refiere a la adherencia y liberación de células en superficies. Ésta es una de las estrategias más importantes de supervivencia de los microorganismos. Estos BT son responsables de regular las propiedades de la superficie celular, promoviendo la adherencia o liberación de las células

de sitios específicos de acuerdo a sus necesidades nutricionales o para evadir ambientes desfavorables (Rosenberg et al., 1989; Van Hamme et al., 2006).

Y en cuanto a la movilidad bacteriana, algunas bacterias presentan desplazamiento sobre los medios de cultivos sólidos, lo que se pone en evidencia por la presencia de velos de crecimiento en el entorno de las colonias. Uno de los desplazamientos más conocidos es el fenómeno que se denomina “swarming bacteriano”. Muchas bacterias que realizan este tipo de desplazamientos sintetizan y secretan tensioactivos para reducir la tensión interfacial y de esta manera facilitar el movimiento. De esta forma los grupos o poblaciones de microorganismos migran como una unidad (Kearns y Losick, 2003).

Otro importante actividad, es la de ser compuestos con propiedades antimicrobianas. Dicha actividad ha sido demostrada por varios BT, principalmente los lipopéptidos y glicolípidos. Ejemplos de éstos son los ramnolípidos de *P. aeruginosa* y la surfactina de *B. subtilis*, los cuales presentan actividad antimicrobiana, al solubilizar los principales componentes de las membranas celulares microbianas. Los BT brindan una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes a los microorganismos productores (Lin, 1996).

Los BT ofrecen la posibilidad de remplazar a los tensioactivos de síntesis química, principalmente porque son menos perjudiciales para el medio ambiente, no obstante, mantienen una importante robustez para ser aplicados en procesos industriales. Las ventajas de los BT sobre los tensioactivos de síntesis química están ampliamente descritas y estudiadas. De hecho autores como Kosaric, (1992), Banat *et al.*, (2000), Cameotra y Makkar, (2004), Mulligan, (2005) y Marchant y Banat, (2012) coinciden que las principales ventajas que presentan son las que se detallan a continuación:

- **Biodegradabilidad:** Los microorganismos tienen la capacidad de degradar los BT en componentes más básicos, asegurando así la

disminución de problemas de contaminación ambiental.

- **Baja toxicidad:** El principal problema de los tensioactivos químicos es que son tóxicos y limitan su aplicación en diversos campos industriales. En cambio los BT son considerado productos con una baja toxicidad, aunque es importante mencionar que sobre este tema existe muy poca información en la literatura.
- **Biocompatibilidad y digestibilidad:** lo cual los convierte en potenciales productos para ser aplicados en la industria cosmética, farmacéutica y como aditivos funcionales en alimentos.
- **Especificidad:** los BT son moléculas orgánicas complejas, con grupos funcionales específicos lo cual hace que tengan una acción específica. Este característico los convierte en compuestos de especial interés en la desintoxicación de contaminantes específicos, así como en la formación de emulsiones industriales en cosmética, farmacéutica y aplicaciones alimentarias.
- **Disponibilidad de materias primas:** estos compuestos pueden ser producidos por materiales residuales, que están disponibles en grandes cantidades, solucionando el problema de su eliminación. Como fuente de carbono se pueden utilizar hidrocarburos, carbohidratos o lípidos, que se pueden emplear bien sea por separado o en combinación.
- **Producción económica aceptable.-** dependiendo de la aplicación, se pueden producir mediante la utilización de residuos industriales o por subproductos baratos, reduciendo el coste de producción.

### 1.5. Factores que afectan la producción de BT

Los BT son productos de interés, sin embargo, a pesar de exhibir importantes características su explotación comercial no se ha desarrollado, principalmente como consecuencia de los rendimientos bajos en la producción, los elevados costos de las materias primas, y los ineficientes procesos de purificación existentes (Banat *et al.*, 2010). Para intentar superar este desafío, diversos grupos de investigación han identificado tres estrategias claves, con el fin de mejorar la producción de BT, y poder así escalar los procesos a nivel industrial;

1. El uso de sustratos residuales, intentado solucionar dos frentes; el desarrollo de compuestos de alto valor industrial (BT), y al mismo tiempo ofrecer un modelo de gestión para que estos residuos no se conviertan en potenciales contaminantes, permitiendo que se equilibren los costes globales.
2. Desarrollo de procesos eficientes, incluyendo la optimización de las condiciones de cultivo, como la etapa de purificación del producto sobre todo si se considera como campo potencial de aplicación la industria farmacéutica y alimentaria, y
3. El desarrollo de cepas mutantes para mejorar su rendimiento (Mukherjee *et al.*, 2006).

No obstante, antes de enfocar una estrategia en especial de producción, es importante estudiar los requerimientos nutricionales de cada microorganismo productor de BTs.

La producción de BT como muchas otras reacciones biológicas, puede verse afectada por varios factores que podrían incrementar o inhibir su producción. Dentro de los factores que afectan la producción de BT se incluyen; condiciones ambientales, fuentes de carbono y nitrógeno.

- **Factores ambientales.-** En este sentido, factores ambientales como pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura son algunos de los que pueden afectar la producción de BT (Gautam y Tyagi, 2006).
- **Fuente de carbono.-** es muy importante para la producción, de hecho el tipo, cantidad y calidad del BT se afecta por la naturaleza de la fuente de carbono (Rahman y Gakpe, 2008). Las fuente de carbono utilizadas en la producción de BT se pueden dividir en tres categorías; carbohidratos, hidrocarburos y aceites vegetales que pueden ser utilizadas individualmente o combinadas (Gautam y Tyagi, 2006).



- **Fuente de nitrógeno.**- La fuente de nitrógeno es esencial para el crecimiento de microorganismos, utilizándola principalmente para la síntesis de proteínas y enzimas. El tipo de fuente utilizada depende de las preferencias de los microorganismos, por ejemplo para la producción de BT por *Arthrobacter paraffineus* se utiliza urea y sales de amonio, mientras que la máxima producción de BT en *P. aereuginosa* y *Rhodococcus sp.* se consiguieron utilizando nitratos (Duvnjak *et al.*, 1982; Robert *et al.*, 1991).

## **1.6 Valorización de residuos agroindustriales para la producción de BT.**

La utilización de las fuentes convencionales de carbono y nitrógeno, trae consigo un gasto que contribuye considerablemente en los costos de producción de BT. Varias aportaciones bibliográficas especializadas indican que los costos de materias primas representan alrededor del 10 al 30% del costos globales de producción, lo cual es muy común en los procesos biotecnológicos., Sin embargo, como hemos mencionado, una de las ventajas de los BT es que pueden producirse a partir de residuos o sustratos alternativos (Banat *et al.*, 2014). La alternativa del aprovechamiento de residuos nos permite la valorización de estos materiales, y es importante destacar que cuando hablamos de valorización nos referimos a un campo relativamente nuevo que permite la gestión de residuos industriales apegados al principio de desarrollo sostenible, que tiene como objetivo la producción de metabolitos de interés a través de procesos biotecnológicos (Federici *et al.*, 2009).

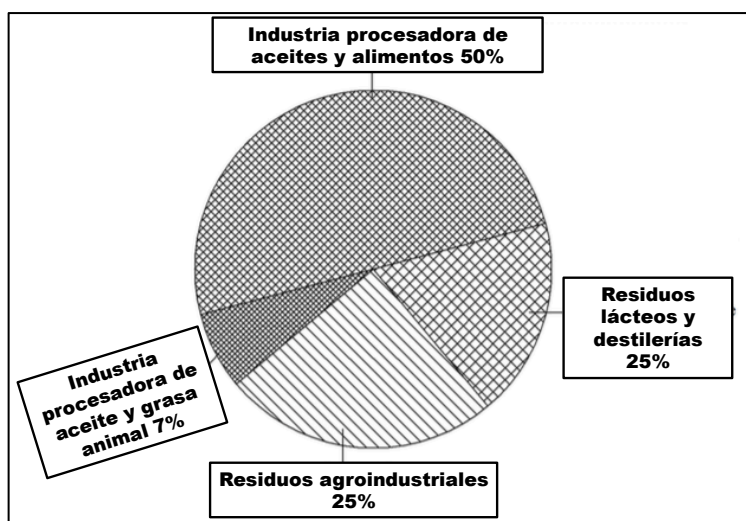
Además se conoce que los residuos industriales y efluentes provenientes de las industrias procesadoras de vegetales y frutas, se componen de grandes cantidades de proteínas, azúcares y lípidos, por lo tanto podrían ser fuentes económicas y abundantes para la producción de compuestos bioactivos. Es más, en los últimos años, en el caso particular de los BT se ha reportado la utilización de distintos sustratos provenientes de distintos campos industriales: agroindustria (azúcar, melazas, aceites de

plantas, sustancias ricas en almidón, suero de leche), destilerías, grasas animales e industrias petroleras (Makkar *et al.*, 2011). Algunos ejemplos de los distintos sustratos alternativos que se han utilizado para la producción de BT se presentan en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Resumen de diversos sustratos renovables utilizadas para la producción de BT.

Organismos	Sustrato Residual	Tipo de Biotensioactivo	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Aceites de frituras	Ramnolípidos	(Haba <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus megaterium</i>	Aceite de cacahuete	Glicolípidos	(Thavasi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus</i> sp.	Melazas	Lipopéptidos	(Saimmai <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus</i> sp.	Suero de leche	Lipopéptidos	(Joshi <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448	Pulpa de soja con bagazo de caña de azúcar	Surfactina	(Slivinski <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173	Paja de arroz	Surfactina	(Zhu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> JK-1	Almidón soluble	Lipopéptidos	(Kim y Kim, 2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	Agua residual de yuca	Lipopéptidos	(Nitschke y Pastore, 2006)

Antes de describir en detalle los diferentes sustratos utilizados como fuentes alternativas para la producción de BT, en la Figura 1.7 se presenta una visión global de las diferentes áreas industriales de donde se obtiene la mayoría de sustratos reportados como potenciales alternativas para el desarrollo de BT. Estos productos pueden ser obtenidos principalmente del procesamiento de aceites vegetales, residuos lácteos y en menor medida de plantas procesadoras de animales.



**Figura 1.7.** Distribución porcentual aproximada de los sustratos alternativos utilizados para la producción de BT. Figura adaptada de Banat *et al.*, (2014)

### 1.6.1 Compuestos ricos en Lípidos

Para la producción de BT los residuos provenientes de la industria procesadora de aceites vegetales, representan una de las alternativas más sustentables y fácilmente disponibles que pueden utilizarse. Estos residuos son compuestos ricos en lípidos que pueden constituir una importante fuente de carbono, además están compuestos de ácidos grasos saturados e insaturados cuya cadena de átomos de carbono tiene una longitud que varía entre 16-18. La utilización de estos sustratos han sido ampliamente investigada, estos sustratos se obtienen de fuentes como canola, maíz, girasol, cártamo, oliva, colza, semillas de uva, de palma, de coco, pescado y aceite de soja (Makkar *et al.*, 2011;Nyayanit, 2014).

En la literatura podemos encontrar suficiente información que confirme la utilización de estos aceites para la producción de BT, principalmente asociada a la producción de glicolípidos. En esta aspecto, Haba *et al.*, (2000) demostraron que *P. aeruginosa* 47T2 produce ramnolípidos utilizando aceites residuales de oliva y girasol, mientras que para otros géneros bacterianos, como es el caso de *Bacillus*, este tipo de sustratos no contribuyen para la producción de BT. En otro trabajo, Abalos *et al.*, (2001) reportan la producción de ramnolípidos por la cepa *P. aeruginosa* AT 10 utilizando residuos provenientes de refinerías de aceite de soja. Adicionalmente, Abouseoud *et al.*, (2007) informan la producción de un glicolípido por *P. fluorescens* migula 1895-DSMZ utilizando aceite de oliva como fuente de carbono suministrado con el nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. Las aportaciones de Saravanan y Vijayakumar,(2014) confirman que la cepa de *P. aeruginosa* PB3A aislada de suelos contaminados por petróleo utiliza sustratos residuales de aceites de maíz con rendimientos altos de producción. Otra alternativa interesante, es la posibilidad de aplicar de forma combinada los aceites residuales con carbohidratos convencionales. En este sentido, Sarubbo *et al.*, (2007) consiguieron altos rendimientos de producción de ramnolipidos por *Candida lipolytica* empleando aceite de canola y glucosa.

Las industrias de procesamiento de carnes y cuero, producen cantidades significativas de grasa animal, sebo y manteca (especialmente del

cerdo). Obviamente, la demanda por las grasas animales es considerablemente menor que los aceites vegetales, por lo que gran parte de ellas se convierten en un problema bien para su utilización, así como para su disposición. Sin embargo, su empleo en la producción de BT es evidente, es más, se tiene conocimiento que la grasa animal actúa como estimulador de la producción de soforolípidos por *Candida bombicola*, pero es necesario suplementar con glucosa (10%) en una proporción 1:1, obteniendo rendimientos de 120 g/L (Deshpande y Daniels, 1995). Una Investigación más reciente de Santos *et al.*, (2013) demuestran que el uso combinado de la grasa animal con licor de maíz fermentado se refleja en una alta producción de glicolípido obtenido por *C. lipolytica* UCP0988, además indican que este BT puede ser aplicado en procesos de biorremediación.

### **1.6.2 Compuestos ricos en Carbohidratos**

Otra posibilidad es el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, que contienen importantes cantidades de carbohidratos y en menor proporción lípidos, por lo que se consideran una potencial fuente de carbono para el desarrollo de procesos biotecnológicos. Como candidatos representativos de estos residuos agroindustriales tenemos: salvado y paja de trigo, paja de arroz, cáscaras de soja, melazas de caña de azúcar o remolacha, bagazo de caña de azúcar, harina de yuca (aguas residuales) (Nitschke *et al.*, 2004; Rashedi *et al.*, 2005; Benincasa, 2007; Thavasi *et al.*, 2014) De todos estos sustratos las melazas han atraído considerablemente la atención de muchos grupos de investigación.

Las melazas son jarabes concentrados, que se obtienen como subproductos del procesamiento de la caña de azúcar o remolacha azucarera, su composición puede variar en dependencia de la fuente de la que se obtienen, pero su composición promedio contiene; materia seca (75%), materia orgánica que no contiene azúcar (9 -12%), proteína (2,5%), potasio (1,5-5%) y componentes minoritarios (<1%) como calcio, magnesio y fósforo. Adicionalmente pueden aportar compuestos como biotina, ácido pantoténico, inositol, y teanina (1-3%) que es la responsable del color marrón oscuro

característico de las melazas. Se considera un sustrato ideal para el crecimiento microbiano y la producción de compuestos bioactivos principalmente por el alto contenido en azúcar que oscila entre 48 y 56% (Makkar *et al.*, 2011). En este aspecto, Makkar y Cameotra, (1997) emplearon un medio mínimo suplementado con melazas para la producción de lipopéptidos a partir de cultivos de *B. subtilis*. La aplicación combinada de sustratos residuales también es una opción válida, tal como lo demuestran Joshi *et al.*, (2008) quienes emplearon melazas con suero de leche, favoreciendo la producción de BTs a partir de varias cepas de *Bacillus sp.*

Las melazas también se han utilizado para la producción de glicolípidos. De hecho, Raza *et al.*, (2007) logran la producción de ramnolípidos con rendimientos de 14,5 g/L cuando utilizan melazas como única fuente de carbono. Otro tipo de melazas que suelen utilizarse son las obtenidas del procesamiento de la remolacha azucarera, tal como lo reportan Onbasli y Aslim, (2009) para la producción de ramnolípidos a partir de diferentes cepas de *Pseudomonas*. Aparte de las fuentes de melazas antes mencionadas (caña de azúcar y remolacha), las melazas obtenidas de soja son comúnmente utilizadas en sectores industriales, principalmente para la producción de soforolípidos (Solaiman *et al.*, 2007). La utilización de residuos agroindustriales, permite que los productos obtenidos puedan ser aplicados en campos donde se requiere una importante cantidad de BT. En este sentido Benincasa *et al.*, (2007) sugiere que los ramnolípidos producidos con el uso de este tipo de residuos pueden tener un importante papel en la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados.

Otro tipo de subproductos de interés son aquellos que presentan importantes niveles de almidón y que son ampliamente empleados como materia prima en procesos de fermentación, como ejemplos tenemos residuos de soja, patata, camote y sorgo dulce, considerados sustratos económicos que proveen una alternativa como fuente de carbono renovable. El producto más representativo son los desechos provenientes de la industria del procesamiento de patatas, donde se producen cantidades significativas de residuos ricos en almidón y que están disponibles para la producción de BT. Estos productos

están compuestos por el 80% de agua, ricos en carbohidratos (17%), proteína (2%), grasa (0,1%), vitaminas, minerales inorgánicos y elementos trazas. Por lo tanto, estos residuos pueden contribuir en el crecimiento microbiano y la producción de diversos productos (Banat *et al.*, 2014). La información existente en la literatura confirma que cuando *B. subtilis* ATCC 21332 es cultivado en un medio mineral suplementado con almidón de patata se obtiene un BT que reduce la tensión superficial de 71,3 hasta 28,3 mN/m con un valor de CMC de 0,10 g/L (Fox y Bala, 2000). En la misma línea de investigación Thompson *et al.*, (2000) proponen la explotación de efluentes de patatas para la producción de surfactina por cepas de *Bacillus*.

Otra industria de interés es la láctea, de donde se obtienen cantidades considerables de subproductos tales como; suero de mantequilla, suero de leche y sus derivados. El suero de leche es un subproducto de la producción del queso, rico en lactosa (75% de materia seca), además contiene otros componentes orgánicos que son solubles en agua (12-14% de proteína) (Maneerat, 2005). El suero es subproducto lácteo obtenido en grandes proporciones y en distintas formas que incluyen; cuajada de suero de leche, residuos de suero de leche, suero de queso, suero de leche láctico, todos están fácilmente disponibles y se pueden emplear para la producción de metabolitos microbianos (Dubey and Juwarkar, 2001, 2004;Makkar and Cameotra, 2002;Dubey *et al.*, 2005;Rodrigues and Teixeira, 2008). En este sentido, Daverey y Pakshirajan, (2010) reportaron el empleo de un medio mixto (suero de leche, glucosa, extracto de levadura y ácido oleico) para la producción de soforolípidos por *C. bombicola*, con rendimientos cercanos a los 34 g/L.

La producción económica de los BT, es un paso crucial, sobre todo porque estos compuestos además de poseer importantes características superficiales, tienen otras propiedades biológicas interesantes, lo que abre la posibilidad de aplicarse en campos de interés como el farmacéutico, alimenticio o en procesos industriales. A continuación describiremos algunas áreas donde se han focalizado las investigaciones relacionadas con estos compuestos.

## 1.7 Potenciales aplicaciones de los BT

Los BT son productos versátiles, que pueden ser aplicados en distintos procesos industriales gracias a su diversidad estructural, además se cree que varias de las propiedades bioactivas se manifiestan debido a que interactúan con macromoléculas de membrana como lipopolisacáridos, fosfatidilserina y otros componentes de membrana (Maget-Dana y Ptak, 1995; Hwang *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2009). Con certeza en los próximos años se descubrirán nuevas áreas de aplicaciones lo que ha llevado a que grupos de investigación especializados los consideren como “materiales multifuncionales” (Banat *et al.*, 2010; Marchant y Banat, 2012). Estos productos pueden ser aplicados como agentes terapéuticos en biomedicina dado que poseen propiedades antivirales, antifúngicas y antibacteriales, además el hecho de tener origen biológico, hace que se consideren más seguros que los productos farmacéuticos sintéticos (Rodrigues *et al.*, 2006). Entre las potenciales aplicaciones se pueden citar:

### 1.7.1 Agentes de limpieza y recuperación ambiental

Dentro de los compuestos que se emplean para la limpieza, los más utilizados son los sulfonatos de alquil benceno (alkylbenzene sulfonates (LAS)). Como potenciales alternativas a estos productos se presentan los glicolípidos (soforolípidos, ramnolípidos y los mannosileritritol (MEL)) que podrían reemplazar parcialmente a los LAS (Marchant y Banat, 2012b). En este campo, existen regulaciones, que limitan la utilización de ramnolípidos ya que el problema significativo de estos BT es que se obtienen de *P. aeruginosa* un patógeno oportunista lo que genera un desincentivo para desarrollar la producción a gran escala. No obstante, de los glicolípidos los que mayores ventajas ofrecen son los MELs, investigados ampliamente (Fukuoka *et al.*, 2007), y con altos rendimientos de producción (100 g/L) (Arutchelvi y Doble, 2011).

En lo que se refiere al manejo ambiental, los BT pueden utilizarse para la recuperación de suelos contaminados por petróleo, biodegradación de contaminantes insolubles en agua y materiales residuales de la industria alimenticia (Monteiro *et al.*, 2010), ya que uno de los roles fisiológicos que se

adscriben a los BT está relacionado con facilitar el metabolismo de sustratos hidrófobos (Perfumo *et al.*, 2010). Adicionalmente, en la industria petrolera, los BT pueden aplicarse en los procesos iniciales de perforación que en algunos casos se realizan en ambientes marinos, donde el uso de BT biodegradables sugiere efectos beneficiosos en dicho medio (Marchant y Banat, 2012).

### **1.7.2 Agentes para evitar o eliminar la adhesión microbiana**

Los microorganismos tienen la capacidad de crecer en superficies, creando unas estructuras complejas que se denominan biofilms, y que se desarrollan como un mecanismo de protección de las células contra factores externos, como puede ser la aplicación de antibióticos (Stoodley *et al.*, 2002). Los biofilms pueden desarrollarse en una variedad de superficies, que incluyen áreas domésticas, superficies industriales y materiales médicos (catéteres y prótesis) (Pamp y Tolker-Nielsen, 2007). El crecimiento microbiano en estos ecosistemas puede representar una importante fuente de contaminación, especialmente en el campo de la alimentación. Por lo tanto, la minimización de la adherencia microbiana a las superficies que están en contacto con alimentos, es un paso esencial para proveer productos de calidad y seguros para los consumidores (Campos *et al.*, 2013). La atención se centra, en la posibilidad de que los BT pueden utilizarse para eliminar los biofilms establecidos y evitar la generación de otros. Diversos autores contribuyen con investigaciones donde demuestran las bondades de los BT para controlar o evitar este problema (Rodrigues *et al.*, 2006; Boles *et al.*, 2005; Dusane *et al.*, 2010). Otros BT como Lunasan obtenido de cultivos de *Candida sphaerica* UCP0995 inhiben completamente la adhesión de cepas de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, y *Candida* sobre placas de cultivo de tejido de plástico (Luna *et al.*, 2011). Por lo tanto, los BT pueden considerarse como compuestos apropiados para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan retrasar o prevenir la colonización microbiana de superficies de plantas industriales utilizadas principalmente para la preparación de productos alimenticios (Nitschke *et al.*, 2009).



### 1.7.3 Agentes para usos en la industria alimenticia

Los BT se pueden usar como aditivos en alimentación, considerando que un aditivo es un ingrediente que no aporta valor nutricional, pero que modifica las características físicas, químicas, biológicas y sensoriales durante la fabricación. Un aditivo debe cumplir con la evaluación toxicológica adecuada teniendo en cuenta los efectos que pueden derivarse de su uso (Campos *et al.*, 2013). Los BT se pueden utilizar para formar emulsiones y como agentes antioxidantes. En este sentido Emine Yalçın y Çavuşoğlu, (2010) reportaron que un BT producido por *B. subtilis* RW-I muestra una capacidad antioxidante para eliminar los radicales libres, sugiriendo que pueden utilizarse como potenciales antioxidantes naturales.

### 1.7.4 Agentes anticancerígenos

El desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticancerígena como alternativa a los agentes quimioterapéuticos convencionales se ha convertido en un reto importante en el campo científico. En este sentido los BT, especialmente lipopéptidos y glicolípidos han emergido como una nueva generación de agentes anticancerígenos gracias a su baja toxicidad, alta eficacia y fácil biodegradabilidad. Se considera que la acción sobre las células cancerígenas empieza cuando las moléculas de BT interaccionan con la membrana suprimiendo las actividades de los receptores superficiales de las células desencadenando la desestabilización de las membranas (Dey *et al.*, 2015). Un estudio reciente demuestra la acción anti-invasiva y anti-metastásica de surfactina sobre células de cáncer de mama MCF-7 (Park *et al.*, 2013). En otro trabajo se reporta que la surfactina bloquea la proliferación de las células de cáncer de colon humano induciendo apoptosis y parada del ciclo celular (Kim *et al.*, 2007). Una investigación de Sivapathasekaran *et al.*, (2010) reporta la actividad citotóxica de fengicina en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y HT-29. Adicionalmente, algunos glicolípidos como mannosileritritol (MEL-A y MEL-B) y trehalosa lípidos (STL-1 y STL-3) inhiben el crecimiento y la diferenciación de las líneas celulares de leucemia K562, HL-60 y en la línea celular de leucocitos basófilos KU812 (Fu *et al.*, 2008).

### 1.7.5 Aplicaciones en nanobiotecnología y para el transporte y liberación de fármacos.

Como hemos mencionado, las propiedades únicas de los BT han atraído considerablemente la atención en el campo de la bionanotecnología ya que se pueden emplear en el diseño de estructuras o sistemas funcionales (Rodrigues, 2015). Las técnicas disponibles para el desarrollo de nanopartículas pueden producir desechos peligrosos, además de producir nanopartículas inestables reduciendo su actividad específica. Por lo tanto, la necesidad de procedimientos de limpieza y síntesis ambientalmente aceptables son cruciales para fomentar la producción a gran escala de las nanopartículas, ya que estas pueden aplicarse en varios campos, siendo el más destacado la administración dirigida de fármacos y biotecnología (Xie *et al.*, 2006;Kiran *et al.*, 2010). Los BT pueden ser utilizados ya que forman fácilmente una gran variedad de cristales líquidos en soluciones acuosas. En este sentido, Reddy *et al.*, (2009) estabilizan la síntesis de nanopartículas de oro y plata con surfactina. En otro trabajo, se utilizaron ramnolípidos obtenidos de *P. aeruginosa* BS-161R para la síntesis de nanopartículas de plata que exhiben una buena actividad antimicrobiana contra patógenos Gram positivos, Gram negativos y frente a *C. albicans* (Kumar *et al.*, 2010).

En lo referente a la capacidad de encapsular compuestos activos, algunos BT pueden formar liposomas que se utilicen como vectores y que podrían aplicarse por ejemplo en la transfección de genes, un campo de importancia para la terapia génica (Ueno *et al.*, 2007b). Uno de los productos con mayor proyección en este campos son los MEL (Kitamoto *et al.*, 2009). En este respecto, Inoh *et al.*, (2001) reportan que MEL-A promueve eficientemente la transfección de ADN mediante liposomas catiónicos. En otro trabajo, Ueno *et al.*, (2007a) encontraron que los liposomas de MEL-A exhibían una alta encapsulación de ADN así como la fusión de las membranas con los liposomas aniónicos. Adicionalmente, Nicoli *et al.*, (2010) estudiaron el potencial de fengicina y surfactina para actuar como potenciadores para la penetración transdérmica y acumulación de Aciclovir en la piel. Por otra parte los BT, pueden ser considerados como componentes interesantes de un

---

emulgel, que es un sistema emergente de administración de fármacos por vía tópica. Un emulgel, son emulsiones de tipo O/W o de W/O que se gelifican mezclándolos con un agente gelificante. La incorporación de un gel a una emulsión aumenta la estabilidad y eficiencia en comparación con otros sistemas de administración de fármacos tópicos (Ajazuddin *et al.*, 2013).

De acuerdo a las propiedades y potenciales aplicaciones de los BT que hemos mencionado, el presente trabajo se enfoca en el estudio de un lipopéptido producido por *B. licheniformis* AL 1.1, cepa aislada del continente Antártico, considerando el aprovechamiento de sustratos residuales para su producción.

## **II. OBJETIVOS**



---

## 2. Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal la Valorización de sustratos agroindustriales para la obtención y posterior estudio del lipopéptido producido por *B. licheniformis* AL 1.1. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño y optimización del medio de cultivo para la producción del lipopéptido a partir de melazas.
2. Caracterización físico-química del lipopéptido producido por AL 1.1.
3. Evaluación de las potenciales aplicaciones del lipopéptido sobre células procariotas y eucariotas.



### **III. METODOLOGÍAS**





### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

Para el estudio de la capacidad emulsionante se utilizaron los siguientes aceites utilizados en la industria cosmética: palmitato de isopropilo (Acidchem International Sdn Bhd), octildodecanol (BASF), cetearilo ethylhexaonate (Industrial Química Lasem), triglicéridos caprílicos (DHW Deutsche Hydrierwerke GmbH Rodleben) y miristato de isopropilo (Sigma-Aldrich) cedidos por laboratorios Magriña.

Para la formación de las membranas modelos se utilizaron los siguientes fosfolípidos: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y colesterol. Todos ellos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Holanda). Además, se empleó carboxifluoresceína (CF) purificada suministrada por Sigma Aldrich (Madrid, España).

Los tensioactivos derivados de arginina  $N^{\alpha},N^{\omega}$ -bis( $N^{\alpha}$ -lauroil-L-arginina) propanodiamida dihidrocloruro ( $C_3(LA)_2$ ) y lisina  $N^{\alpha},N^{\omega}$ -bis( $N^{\alpha}$ -lauroil-lisina) $\alpha,\omega$ -hexilendiamida ( $C_6(LL)_2$ ) fueron cedidos por las Dras. Aurora Pinazo y Lourdes Pérez del laboratorio de Tensioactivos del CSIC-Barcelona. La pureza de los tensioactivos sintéticos estudiados es superior al 96%. El agua utilizada se obtuvo usando un sistema de ultra purificación Synergy Ultrapure (resistividad 18,2 M $\Omega$ ). Los solventes como cloroformo, hexano, etanol, acetato de etilo y éter dietílico son del máximo grado analítico (HPLC) (Merck).

#### 3.2 Microorganismos y condiciones de cultivo

##### 3.2.1 Microorganismos

La cepa AL1.1 utilizada para la producción de biotensioactivos (BT) fue aislada de una muestra de sedimento de una zona geotérmica de la Isla Decepción ubicada al sur del archipiélago Shetland (Continente Antártico). Esta

cepa fue posteriormente identificada como *B. licheniformis* mediante Taxonomía Numérica empleando caracterización fenotípica, análisis quimiotaxonómico (Llarch *et al.*, 1997) y molecular (Coronel-León *et al.*, 2015).

Para el estudio de las propiedades biológicas se utilizaron los siguientes microorganismos;

- *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4267, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33292. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y MRSA ATCC 43300 (*S. aureus* Resistente a la Meticilina) y *Candida albicans* ATCC 10231.

Las cepas se mantuvieron en agar triptona y soja (TSA) y se sembraron cada dos semanas. Para su conservación se utilizó el sistema CRYO-BILLES (AES Lab, Combourg, Francia) para posteriormente ser almacenadas a -80°C.

### 3.2.2 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este estudio se describen a continuación.

- TSA (agar de triptona y soja ) (Pronadisa) con composición (g/L): Peptona de caseína, 15; Peptona de soja, 5; NaCl, 5; Agar, 15.
- SAB (Sabouraud Dextrosa Agar) (Oxoid) con composición (g/L): peptona, 10; dextrosa, 40; Agar, 15,0 (pH 5,6).
- Caldo Luria Bertani (LB) (Oxoid) con composición (g/L): NaCl, 5,0; Extracto de levadura, 5,0; Peptona de caseína, 10,0.

- Caldo Mueller Hinton (MHB, Oxoid, Basingstoke, UK) con composición (g/L): infusión deshidratada de carne de res, 300; hidrolizado de caseína, 17,5; almidón, 1,5 (pH 7,3).
- Medio mineral basal (MM1) con la siguiente composición (g/L): Fuente de carbono, 1%; NaNO<sub>3</sub>, 4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,7; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,14; CaCl<sub>2</sub> 7x10<sup>-6</sup> y 0,05 mL de solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos presentó la siguiente composición (g/100 mL): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,2; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,15; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,015; y ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03.
- MM2 con la siguiente composición (g/L): fuente de carbono, 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,7; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,21; CaCl<sub>2</sub> 7x10<sup>-6</sup>; solución de oligoelementos, 0,05 mL.
- MM3 compuesto por melazas, NaNO<sub>3</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- MCM con la siguiente composición (g/L): melazas, 20; NaNO<sub>3</sub> 4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,7; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,21; CaCl<sub>2</sub> 7x10<sup>-6</sup>; solución de oligoelementos, 0,05 mL.
- MM4 tiene la siguiente composición (g/L): glucosa, 2; ácidos casamino, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,12. *C. jejuni* ATCC 33292 creció en MHB suplementado con suero de albumina (10 %).
- Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) para el cultivo de las células Caco-2 contiene 4,5 g/L de d-glucosa y 2 mM de l-glutamina, suplementado con 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado (FBS, BioWhittaker-Lonza, Switzerland), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

TSA, SAB, LB, MHB, la fuente de carbono y las soluciones de sales minerales (concentradas 100 veces, se esterilizaron por separado para evitar la precipitación de las sales minerales) se esterilizaron en autoclave a 121°C, durante 20 minutos a 1 atm. Los componentes de la solución de oligoelementos de los medios MM1 y MM2 se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración (Espuny *et al.*, 1996). En todos los casos el pH final de los medios se ajustó a pH 7 usando NaOH (0,1 M) o HCl (0,1 N) (Marqués *et al.*, 2009).

### **3.2.3 Preparación de los inóculos**

#### **3.2.3.1 Preparación de inóculos para la producción**

Se utilizó la cepa de AL 1.1 previamente crecida en TSA durante toda la noche a 30°C. AL 1.1 se recogió en 10 mL de Ringer ¼ (Scharlau, Barcelona España), ajustando su turbidez al nº 6 de la escala de McFarland.

Para la producción inicial se utilizaron matraces muescados (1000 mL de capacidad) con 200 mL del medio correspondiente. En cambio para la optimización de la producción a partir de residuos agroindustriales se utilizaron matraces con una capacidad de 500 mL con 50 mL del medio correspondiente. En ambos casos los matraces fueron inoculados con un 2%(v/v) de la suspensión celular y se incubaron de acuerdo a las condiciones operativas que se detallan en cada experimento.

#### **3.2.3.2 Preparación de inóculos para el estudio de la propiedades biológicas**

- Propiedades antimicrobianas: Las cepas de interés fueron previamente crecidas en TSA durante toda la noche a 30°C. Se recogieron en 10 ml de Ringer ¼ (Scharlau, Barcelona España), ajustando posteriormente la turbidez al nº 0,5 de la escala de McFarland.

- Pérdida de Potasio: tanto *E. coli* O157:H7 CECT 4267 como *L. monocytogenes* ATCC 15313 se cultivaron en TSA a 30°C durante toda la noche, recogiendo posteriormente en 10 mL del tampón glicil-glicina (1mM, pH 6,8). Esta suspensión bacteriana fue lavada por tres veces utilizando el mismo tampón. Finalmente se recolectaron por centrifugación (5000 x g durante 20 min) y se resuspendieron en 50 mL de tampón glicil-glicina ajustando la turbidez al nº 1 de la escala de MacFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml).
- Análisis por citometría de flujo y curvas de viabilidad: se parte de un cultivo de *E. coli* O157:H7 CECT 4267 y *L. monocytogenes* ATCC 15313 incubado toda la noche en TSA a 30°C. Cada microorganismo se recolecta en 10 ml de Ringer  $\frac{1}{4}$  (Scharlau, Barcelona España), luego esta suspensión bacteriana se centrifugó (8000 x g por 20 min), se lavó dos veces con una solución de Ringer  $\frac{1}{4}$  estéril, y finalmente se ajustó la turbidez al nº 1 de la escala de McFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml).

### 3.2.4 Condiciones de cultivo de células Caco-2

Las células Caco-2 ATCC (HTB 37) fueron cultivadas siguiendo las indicaciones de Martinez *et al.*, (2006). Las células crecieron en frascos de plástico hasta una densidad de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>, cultivándose en el medio DMEM, luego se incubaron a 37°C en atmósfera modificada que contiene un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Al alcanzar las células cultivadas aproximadamente el 80% de confluencia (después de 7 días en cultivo) fueron separadas por tripsinización (adición de 200 µl de tripsina (170000 U/l) e incubación de 10 minutos en la estufa 37°C) y subcultivadas hasta una densidad de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pocillos.

### 3.3. Optimización de la producción de BT

#### 3.3.1 Efecto de los componentes del medio en la producción de BT

Durante la etapa inicial del estudio se utilizó la técnica de simple omisión para determinar las condiciones óptimas de cultivo de la cepa AL 1.1 para la obtención del producto (BT). Partiendo del medio MM1 se evaluaron el efecto de los siguientes parámetros físicos en el crecimiento y producción de BT:

- Temperatura de crecimiento (30, 37 y 50°C), agitación (0, 50, 100, 120 y 150 rpm) y tiempo de incubación (24, 48 y 72 h).

Adicionalmente se estudió el efecto de varios nutrientes en la producción de BT y en el crecimiento microbiano.

Como fuente de carbono (1%) se ensayaron los siguientes compuestos; hidratos de carbono: fructosa, glucosa, sacarosa, lactosa, glicerol y aceites:

- ✓ C<sub>12</sub> (9,3% C<sub>10</sub>; 32,4% C<sub>11</sub>; 31,3% C<sub>12</sub>; 26,7% C<sub>13</sub>, distribuido por Petrepar®120, Petroquímica Española, Madrid),
- ✓ aceite de oliva (76,1 %, ácido oleico (C18:1); 11,3 %, ácido palmítico (C16:0); 9,2 %, ácido linoleico (C18:2); 1,5 % ácido esteárico (C18:0); 1,3 % ácido linolénico (C18:3), de Borges® aceite de oliva puro, España), y
- ✓ aceite de linaza (6,3 % ácido palmítico (C16:0); 2,5 % ácido esteárico (C18:0); 19 % ácido oleico (C18:1); 24 % ácido linoleico (C18:2); 47,4 % ácido linolénico (C18:3), 3,2 % otros, facilitados por Acofarma, Barcelona).

También se estudiaron diferentes fuentes de nitrógeno manteniendo una concentración equivalente de 50mM: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (4 g/L), NaNO<sub>3</sub> (8,5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,6 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,4 g/L) y urea (3 g/L). También se estudió el efecto de distintas concentraciones de las sales de fosfatos Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: concentraciones 1 (1,4+1 g/L), 2 (2,9+2 g/L), 3 (5,7+4), 4(8,6+6), 5(11,4+8). Así mismo, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de cloruro cálcico

( $7 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-3}$  g/L). Finalmente, se analizó el efecto de la concentración de sulfato de magnesio (0,14-0,28 g/L).

### **Sustratos agroindustriales**

Partiendo del medio MM1 se evaluaron los siguientes sustratos agroindustriales como fuente de carbono alternativas: melazas, agua residuales de yuca, almidón de yuca y suero de leche. Las melazas se obtuvieron en un local comercial de la ciudad de Santa Rosa, en la provincia del Oro, Ecuador. De acuerdo al proveedor la composición es la siguiente; azúcares totales 53,73%, sacarosa 38%, nitrógeno orgánico 1% y micro minerales (mg/100 g melazas): calcio 850, magnesio 700, hierro 8 y sodio 23.

La yuca se adquirió en un mercado local y fue triturada en el laboratorio. Para el estudio de la producción de BT se utilizó el almidón de yuca (residuo sólido) y el agua residual (residuo líquido). El suero de leche fue donado por una industria dedicada a la producción de quesos.

### **3.3.2 Optimización de la producción de BT a partir de residuos agroindustriales utilizando la metodología de la superficie de respuesta (MSR)**

Para los ensayos de optimización se utilizó el medio económico MM3, las composiciones de los distintos evaluados se presentan en el diseño experimental (Tabla 3.1).

#### **3.3.2.1 Diseño experimental**

Se aplicó la metodología de la superficie de respuesta (MSR), para un sistema con dos variables respuesta: **concentración de biomasa celular** (g/L) ( $Y_1$ ) y **concentración de producto o BT** (g/L) ( $Y_2$ ), para lo cual se estudió el efecto de tres variables naturales independientes: concentración de melazas



( $X_1$ ), concentración de nitratos  $\text{NO}_3^-$  ( $X_2$ ) y concentración de sales de fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $X_3$ ).

Como diseño experimental se escogió un Diseño Rotacional Central Compuesto (DRCC). El DRCC se formó mediante un diseño factorial  $2^k$ , siendo  $k=3$  obteniéndose ocho puntos que constituyen el factorial  $2^3$ , realizados al nivel +1 y -1. Del diseño axial  $2k$  ( $2 \cdot 3$ ) da como resultado seis puntos, que se incluyeron para formar un diseño central compuesto con radio desde el origen  $\alpha=2^{k/4}$ , formando la figura en un sistema ortogonal de coordenadas, llamado estrella o axial, que tenían lugar a una distancia  $\alpha=2^{3/4}$  (+1,68). Por lo tanto se realizaron a los niveles +1,68 y -1,68. Finalmente los  $n_c$  puntos centrales se obtuvieron a partir de la expresión  $n_c = 4(2^k)^{1/2} + 4 - 2k$ , logrando nueve puntos en el centro, proporcionando precisión uniforme, finalmente se consideró que para que el diseño fuera ortogonal,  $n_c$  debía cumplir que:  $\alpha=1,68=\{[(2k+2k+n_c)/2(2k)]^{1/2}2(2k/4)\}^{1/4}= 1,68$ . Esto resultó en un DRCC con 23 experimentos (Tabla 3.1), cada uno evaluado a cinco diferentes niveles (-1,68, -1,0, +1, +1,68).

Para cada uno de los 23 experimentos descritos en el diseño experimental (Tabla 3.1), las muestras fueron recolectadas después de 72 horas de cultivo y se analizaron los datos de tensión superficial, crecimiento celular (biomasa), producción de producto, consumo de melazas y  $\text{NaNO}_3$ , además de registrar los valores de pH.

Es importante destacar que en el DRCC las variables están codificadas  $x_i$  (-1,68, -1, 0,+1 y +1,68), por lo tanto se normalizaron las variables naturales, utilizando la siguiente ecuación:

**Ecuación 1:**

$$x_i = \frac{X_i - X_i^*}{\Delta X_i}$$

**Tabla 3.1.** Diseño experimental para la optimización de la producción de BT.

Exp n°	Valores codificados de las variables			Valores naturales de las variables		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$ Melazas (g/L)	$X_2$ $\text{NO}_3^-$ (g/L)	$X_3$ $\text{PO}_4^{3-}$ (g/L)
1	1	1	-1	161,55	9,77	4,63
2	-1	-1	-1	48,45	3,23	4,63
3	0	0	0	105	6,5	8,5
4	0	0	0	105	6,5	8,5
5	0	1,68	0	105	12	8,5
6	-1	1	-1	48,45	9,77	4,63
7	0	0	0	105	6,5	8,5
8	1	1	1	161,55	9,77	12,37
9	-1,68	0	0	10	6,5	8,5
10	0	0	0	105	6,5	8,5
11	-1	-1	1	48,45	3,23	12,37
12	0	-1,68	0	105	1	8,5
13	1,68	0	0	200	6,5	8,5
14	0	0	1,68	105	6,5	15
15	1	-1	-1	161,55	3,23	4,63
16	-1	1	1	48,45	9,77	12,37
17	0	0	-1,68	105	6,5	2
18	1	-1	1	161,55	3,23	12,37
19	0	0	0	105	6,5	8,5
20	0	0	0	105	6,5	8,5
21	0	0	0	105	6,5	8,5
22	0	0	0	105	6,5	8,5
23	0	0	0	105	6,5	8,5

Donde  $x_i$  es valor codificado de la  $i$ -ésima variable,  $X_i$  es el valor real en unidades de concentración de la  $i$ -ésima variable,  $X_i^*$  es el valor actual de la  $i$ -ésima variable en el punto central y  $\Delta X_i$  es la diferencia o incremento que sufre la  $i$ -ésima variable independiente. Finalmente las variables respuestas  $Y_1$  e  $Y_2$  se describieron como funciones de las variables independientes ( $x_1, x_2, x_3$ ). Para el ajuste de los datos experimentales se utilizó un modelo polinomial de segundo orden que se describe a continuación:

**Ecuación 2:**

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$$

Donde  $Y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  el término independiente,  $x_i$  ( $i = 1-3$ ) son las variables independientes codificadas,  $\beta_i$  coeficiente de los efectos lineales,  $\beta_{ii}$  coeficiente de los efectos cuadráticos y  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de los

efectos de interacción ( $i$  y  $j = 1-3$ ). Para la obtención de los modelos de regresión y el análisis de significancia se utilizó el programa estadístico “*Essential Regression*” (ER) (un macro de Microsoft Excel de libre difusión disponible en <http://www.jowerner.homepage.t-online.de/download.htm>). El programa *Essential Regression* (ER) posee una herramienta llamada “*Optimize*”, mediante la cual se determinaron los valores óptimos de concentración de melazas ( $X_1$ ), concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $X_2$ ), y concentración de fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $X_3$ ) que maximizan las funciones respuestas, tanto de  $Y_1$  e  $Y_2$ , dentro de los intervalos estudiados. Finalmente las condiciones óptimas predichas se validaron mediante la comprobación de los modelos obtenidos, para lo cual se ensayaron 10 nuevos experimentos, distribuidos en todo el rango experimental, lo que permitió encontrar valores de respuesta tanto altos como bajos. Cada ensayo experimental se realizó por triplicado, manteniendo las condiciones de trabajo que se realizaron para la matriz.

### **3.4 Métodos analíticos**

#### **3.4.1 Determinación de la concentración de biomasa celular (g/L)**

El crecimiento microbiano se determinó por gravimetría en términos de peso seco (g/L). Para esto una alícuota de 10 mL de un cultivo se centrifugó a 11,000 xg en una centrifuga Beckman Coulter por 20 min (minutos) a 4 °C. El sedimento fue suspendido y lavado con agua destilada por tres veces. Finalmente el sedimento se puso en un vial previamente tarado, se llevó a una estufa a 100 °C y se secó hasta peso constante.

#### **3.4.2 Determinación del producto (BT)**

Para medir la producción de BT se utilizó el sobrenadante libre de células que fue acidificado con HCl hasta pH 2, luego se almacenó por toda la noche a 4°C, posteriormente se recolectó el extracto crudo por centrifugación (11,000 xg, 4 °C por 20 min), y se lavó dos veces con agua destilada ácida (pH

2). El BT se secó en horno a 40°C hasta peso constante, y se cuantificó gravimétricamente (g/L).

### **3.4.3 Obtención del extracto orgánico del producto**

El extracto orgánico (EO) se obtuvo por dos metodologías de extracción orgánica: extracción líquido-líquido a partir del sobrenadante del cultivo (L-L) por triplicado. También por extracción sólido-líquido (S-L), en este caso el extracto orgánico (EO) se recuperó del producto (precipitado) después de tres extracciones con el solvente indicado.

En la recuperación del BT, se probaron los siguientes disolventes orgánicos: cloroformo, acetato de etilo, hexano, éter dietílico, cloroformo-metanol (8:1) y acetato de etilo-metanol (8:1). Para eliminar la humedad se pasó el extracto orgánico por sulfato de sodio anhidro, y se concentró en un evaporador rotatorio al vacío (Büchi, Suiza). El extracto obtenido se llevó a un vial limpio y previamente tarado, para cuantificar la cantidad del EO por gravimetría.

### **3.4.4 Purificación del extracto orgánico (BT)**

Para la purificación del BT se ha utilizado la cromatografía de adsorción en columna, con fase estacionaria de sílica gel que se empaqueta en una columna de vidrio. El EO (200 mg) se disolvió previamente en cloroformo (500 µL) y al mismo tiempo la columna se preparó con una pasta de sílica gel en cloroformo (0,7g/L). Se utilizó como fase móvil cloroformo/metanol/hidróxido de amonio 5M (65:30:5 v/v/v). Finalmente, se recolectaron fracciones de 1 ml. La fracción purificada se define como extracto orgánico purificado (EOP).

### **3.4.5 Consumo de melazas**

Este valor se determinó en términos de carbohidratos totales, para lo cual se estudió la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo

mediante el método del fenol-sulfúrico utilizando glucosa como estándar (DuBois *et al.*, 1956).

#### **3.4.6 Consumo de $\text{NaNO}_3$**

Se determinó la concentración en el medio a diferentes tiempos usando tiras reactivas de nitratos Quantofix (Mackerel-Nagel, Düren, Germany).

#### **3.4.7 Determinación de la concentración de fosfolípido**

La concentración de los diferentes fosfolípidos utilizados en los estudios de permeabilización de membranas se determinó mediante el método de Böttcher (Böttcher *et al.*, 1961) en el que la concentración de fosfolípidos o de sus derivados hidrolíticos se pueden cuantificar mediante la detección de fósforo inorgánico (Pi). En primer lugar se llevó a cabo una digestión química en medio ácido (ácido perclórico 70%) a 190°C durante 30 min para liberar el grupo fosfato de la estructura del fosfolípido. Tras la adición de un 22% p/v de una disolución de reactivo molibdato (heptamolibdato amónico/ácido sulfúrico 1:6.5 p/v) los oxoaniones metálicos de molibdato amónico en este medio fuertemente ácido encierran a los aniones fosfato en estructuras llamadas polianiones. La reacción colorimétrica se desarrolló incorporando ácido ascórbico al 10% p/v e incubando las muestras a 100°C en un baño durante 15 min. La medida de la densidad óptica se realizó en un colorímetro a una longitud de onda de 812 nm. Se realizó una curva patrón utilizando un estándar de Pi que se preparó pesando 1,4325 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada. Luego se hace una dilución 1:100 para alcanzar la concentración de 0,4 nmol de Pi. La curva de calibración se construye con las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 nmol de Pi.

### **3.5 Caracterización estructural propiedades físico-químicas y biofísicas del producto**

#### **3.5.1 Caracterización preliminar**

Para realizar la cromatografía en capa fina TLC, el EO (100 mg) se disolvió en metanol (500 µL) y se depositó en las placas de gel de sílice (ALUGRAM® SIL G/UV254, Macherey-Nagel) las cuales previamente se habían activado en una estufa a 100°C. La fase móvil empleada se compone de cloroformo/metanol/hidróxido de amonio 5M (65:30:5 v/v/v). Además del EO, se añadió el extracto orgánico obtenido del medio de cultivo no inoculado como control. Para revelar los componentes presentes en el EO se emplearon:

- **Reactivo de Molish:** Se preparó diluyendo 1,6 g de α-naftol en 10,5 mL de etanol. Posteriormente se mezcló esta solución con 6,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40,5 mL de etanol absoluto y 4mL de agua. Una vez nebulizada la placa, esta se calienta en una estufa a 100° C durante 5 minutos (Christie, 2003).
- **Reactivo de Ninhidrina:** Se nebulizó la placa con una solución Ninhidrina (0,2%) en butanol saturado en agua. La placa se calentó a 100° C en atmósfera húmeda. Los grupos aminos aparecen de color rojo violeta (Burgos-Díaz *et al.*, 2011).

### 3.5.2 Análisis estructural por Ionización por electrospray (ESI-MS)

5 mg del EOP se disolvieron en 500 µl de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1). Posteriormente, 20 µl de esta muestra se analizaron en un espectrómetro de masas (MS) con ionización por electrospray (ESI) (LC/MSD-TOF, Agilent Technologies, California, USA). Se obtuvieron espectros tanto en modo positivo y negativo de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Los voltajes de los capilares usados fueron de 4 KV y 3,5 KV para el modo positivo y negativo respectivamente. El nitrógeno se empleó para la nebulización y secado.

### 3.5.3 Determinación de aminoácidos y secuencia

3 mg de EOP se hidrolizaron con 1 mL de HCl 6M a 110°C durante una noche en un tubo de vidrio sellado. A este hidrolizado (1 mL) se realizó un extracción con éter dietílico (1 mL) por triplicado. Por una parte el residuo

acuoso se solubilizó en metanol, se evaporó en un rotavapor (Büchi, Suiza) y finalmente se redisolvió en 20 mM de HCl para alcanzar una concentración final de 0,1 mM. Los aminoácidos fueron posteriormente analizados por HPLC, usando una pre-columna de derivatización (AccQTag) de acuerdo al método de Waters (Cohen y Michaud, 1993). Los rendimientos derivados de la reacción de los aminoácidos con el 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidilo carbamato fueron detectados a 254 nm. El análisis fue llevado a cabo en una columna C18 Nova-Pak (3,9 x 150 mm) a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 37°C, conectada a un sistema cromatográfico Delta 600 con un detector de absorbancia dual 2478 y un inyector automático 717 plus (Waters Corporation, Massachusetts, USA). Posteriormente se determinó la secuencia de aminoácidos. Para este fin se utilizó el sistema MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight) y se aplicó la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (4800 Plus MALDI TOF/TOF, ABSciex, California, USA). Para lo cual se obtuvo el espectro de masas total del EOP que se adquirió en modo positivo, para ello 5 mg del EOP se disolvieron en 500 µl de metanol, posteriormente 10 µl se colocaron en una matriz de ácido dihidroxibenzoico (DHB). A partir del espectro obtenido se seleccionaron los iones mayoritarios que luego fueron fragmentados mediante una cámara de colisión acoplada al espectrofotómetro de masas. Posteriormente las fragmentaciones obtenidas se analizaron en función de la masa de los residuos de aminoácidos presentes en el EOP.

#### **3.5.4 Determinación de ácidos grasos**

Los ácidos grasos fueron analizados de la fase orgánica obtenida de la extracción del hidrolizado. Esta fracción se lavó por dos ocasiones con agua destilada y el análisis de ácidos grasos se realizó por ionización por electro spray (ESI-MS). El nitrógeno se empleó para la nebulización y secado para lo cual, la fracción orgánica se disolvió en metanol y se mezcló con 0,1% de ácido fórmico, inyectándose 20 µl en el sistema LC/MSD-TOF. Se obtuvo el espectro en modo negativo de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). El voltaje del capilar fue de 3,5 KV.

### 3.5.5 Propiedades físico-químicas y biofísicas

Para el estudio de las propiedades del BT producido por AL 1.1, se ha utilizado el extracto orgánico no purificado (producto o BT), que se obtuvo por precipitación ácida, después de realizar la extracción orgánica (S-L).

#### 3.5.5.1 Determinación de la tensión superficial y concentración micelar crítica (cmc)

Para determinar la tensión superficial se depositaron 5 ml de la muestra problema (sobrenadante del medio de cultivo, o solución de EO) en un cristalizador. La tensión superficial en equilibrio ( $\gamma_{TS}$ ) se midió a 25°C con un tensiómetro digital Krüss K9 (Krüss, Hamburgo, Alemania) mediante el método del anillo. El instrumento se calibró con agua ultrapura (72 mN/m) y etanol puro (22,7 mN/m) para garantizar la precisión en el rango completo de tensión superficial. Antes de cada medida se lavaron secuencialmente el anillo de platino y todo el material de vidrio, con ácido crómico, agua destilada, acetona y finalmente, en el caso del anillo, se flameó con un mechero Bunsen.

La cmc se determinó midiendo la tensión superficial por dos métodos diferentes:

- **Método del anillo:** se midió la tensión superficial de distintas concentraciones de producto en agua destilada a una concentración entre 3 y 0,0006 g/L, con un volumen final de 5 mL. Finalmente se representan los datos en una gráfica concentración de producto vs tensión superficial y se determinó la cmc o concentración de tensioactivo a partir de la que se forman micelas, hecho que se manifiesta por una no modificación de la tensión superficial al incrementar la concentración de tensioactivo.
- **Método gota colgante:** se calculó la cmc utilizando un tensiómetro de gota colgante. Para este fin, a partir del producto se prepararon 8 soluciones a concentraciones entre 0,5 g/L y



0,003 g/L. Con cada concentración se creó una gota al final de un tubo recto de teflón, se grabó su imagen con una cámara web (640 x 480 pixel), se corrigió la aberración esférica y se extrajo el perfil de la gota. El contorno de la gota se ajustó a la ecuación de Laplace-Young usando un algoritmo de búsqueda, elaborado por el grupo de Tensioactivos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Barcelona). En este algoritmo se introdujeron los parámetros de corrección angular, radio de la gota y tensión interfacial. Para evitar la evaporación la temperatura se mantuvo a 25°C +/- 0,1°C y el proceso se realizó en una cámara aislada. Las medidas de tensión superficial del agua pura fueron encontradas en un rango de 70 +/- 2 mN/m. El valor de cmc se obtuvo al representar gráficamente los valores de tensión superficial vs concentración de BT (Pinazo *et al.*, 2009).

#### **3.5.5.2 Efecto de la fuerza iónica, temperatura y pH**

Se evaluaron los efectos de distintos parámetros sobre el descenso de la tensión superficial ejercido por el producto. Para esto se realizaron estudios de estabilidad, partiendo de una solución de 15 mg/L en tampón fosfato (150 mM NaCl pH 7,4). De esta solución se tomaron 10 mL y se expusieron a diferentes temperaturas (25, 50, 75, 100 y 120°C) por 1 h y se midieron las tensiones superficiales. También se evaluó el efecto del pH (2-11). Para esto, la solución de producto se ajustó con HCl o NaOH de acuerdo al valor de pH requerido y se midió la tensión superficial. Por último a la solución de producto se le añadieron diferentes concentraciones de NaCl (5-20%) y se determinó el efecto sobre la tensión superficial.

#### **3.5.5.3 Estudio de la Capacidad emulsionante**

Se estudió la capacidad emulsionante del producto con aceites utilizados en la industria cosmética (Apartado 3.1). Para esto se tomaron 3 ml de una solución acuosa del producto (0,1 mg/mL) y se añadió 1,5 mL de cada aceite

en diferentes tubos de vidrio con rosca, estas soluciones fueron mezcladas en vórtex por dos minutos. Para cada emulsión se calculó el índice de emulsión que se obtuvo dividiendo la altura de la emulsión para la altura total de ambos líquidos en el tubo, y este valor fue multiplicado por 100 (Nitschke y Pastore, 2006). El índice de emulsión se consideró tras 24 h de reposo ( $E_{24}$ ).

#### **3.5.5.4 Formación de Cristales líquidos**

Se evaluó el comportamiento del sistema binario producto/agua mediante microscopía óptica. Las observaciones se realizaron de acuerdo al método de Lawrence (1958), que también se conoce como el método de penetración. Se utilizó un microscopio óptico con luz polarizada (Reichert Polivar<sup>®</sup> 2 Leica) equipado con una plataforma de calentamiento. Para la captura de las imágenes se empleó una video cámara que se controlaba con el software Leica IM 500. Los experimentos de penetración consistieron en colocar sobre un porta objeto una cantidad de producto (5 mg) que fue cubierta con un cubre objeto, poniéndose posteriormente unas gotas de agua, que se dejaron difundir a través de la muestra sólida creándose así un gradiente de concentración a lo largo de la misma. Después de un corto tiempo de equilibrio se observó la muestra con luz polarizada estudiando la formación de cristales líquidos.

#### **3.5.5.5 Isotermas de compresión o monocapa de Langmuir**

Las monocapas de Langmuir permiten la caracterización fisicoquímica de los componentes anfífilicos depositados en la interfase aire/agua. También pueden ser utilizadas para mejorar la comprensión de las interacciones moleculares entre dos componentes, que se obtienen por co-difusión de los compuestos previamente preparados en apropiados disolventes orgánicos (*Stefaniu et al.*, 2014). Las isotermas de presión superficial vs el área por molécula ( $\pi$ -A) se obtuvieron a temperatura ambiente. Para esto se utilizó una balanza de Langmuir (KSV Instruments Ltd. Helsinki) controlada por ordenador de dimensiones: 364 mm de longitud y 75 mm de ancho. La cubeta de la balanza es de teflón con dos barreras móviles ubicadas simétricamente, y su

superficie puede variar de 22,0 a 245,25 mm<sup>2</sup>. La presión superficial ( $\pi$ ) se midió con una placa de Wilhelmy. La incertidumbre de la balanza de Langmuir es de +/- 0,1 mN/m. Previo a la deposición de la muestra, la superficie de la interfase se limpió con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío. Luego se verificó que la superficie estuviese totalmente limpia, para lo cual el valor de la presión superficial debe ser menor a 0,1 mN/m. Para el análisis se preparó el producto a una concentración de 1,2 mg/mL en cloroformo. Se depositaron 20  $\mu$ L de la solución de producto con una micro-jeringa (Hamilton, 50  $\mu$ L), en las siguientes subfases con distintos valores de pH: pH 2 (HCl), pH libre (6,8), pH 7,4 (TRIS) y pH 12 (NaOH). Adicionalmente se estudió el comportamiento de las isotermas de los productos puros de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub> así como las mezclas de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-BT y C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>- BT. Para esta última parte se utilizó TRIS (pH 7,4) como subfase. Las muestras de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-BT se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en cloroformo. Los productos de C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>-BT fueron disueltos en hexano/metanol (9:1) a una concentración similar (1 mg/mL). Antes de la compresión de las isotermas se dejó evaporar el solvente por 20 min y se empezó con la compresión simétrica a una velocidad de 20 mm/min. Para asegurar la reproducibilidad cada isoterma se midió al menos tres veces (Colomer *et al.*, 2013).

### **3.5.5.6 Tamaño de los agregados y potencial zeta del producto y las mezclas de tensioactivos**

Las soluciones de BT y C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> se prepararon a una concentración de 2 mM en agua destilada. Posteriormente, 2 ml de estas soluciones fueron depositados en una celda ZeNO112. El tamaño de los agregados y el potencial zeta de las soluciones de BT y C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y sus respectivas formulaciones (80:20, 50:50) fueron analizadas en un Zetasizer Malvern Nano-ZS. Los valores fueron tomados como el promedio de tres medidas independientes. Cada medida es a su vez el promedio de 10 sub-mediciones cada 20 s (Haba *et al.*, 2014).

### **3.5.5.7 Efecto del BT en membranas modelos y experimentales**

Se preparó una solución madre del BT (13 mM) en 5 mL de cloroformo/metanol (3:1). Las soluciones de los distintos fosfolípidos (20 mM) se prepararon en cloroformo y se almacenaron a - 80°C. Para los experimentos de protección osmótica se utilizaron sacarosa y diferentes polietilenglicoles (PEGs) que se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

#### **3.5.5.7.1 Preparación de vesículas unilamelares a partir de los fosfolípidos**

Se prepararon las siguientes mezclas de fosfolípidos; POPC, POPC:POPE 1:1, POPC:COLES 2:1, POPC:COLES 1:1, POPC:DPPC 3:1, en cloroformo a una concentración de 5 mM y se colocaron en tubos de vidrio. Para la obtención de la capa fina (film) de fosfolípido, el solvente se evaporó con la adición de N<sub>2</sub>, posteriormente los restos de cloroformo se eliminaron al vacío por 3 horas. Finalmente las muestras se sellaron y se almacenaron a -20°C. A los films de fosfolípidos se añadió 500 µl del tampón carboxifluoresceína (CF) (50 mM CF, 5 mM HEPES, pH 7,4) y se mezclaron con agitador, formándose vesículas multilamelares (MLV). Seguidamente estas MLV se convirtieron en vesículas unilamelares (LUV) por el método de extrusión, para lo cual se utilizaron filtros de policarbonato de 0,1 µm. La CF no encapsulada en los LUV se separó utilizando una columna que contenía SHEPADEX G-75. Para la recuperación de los LUVs de fosfolípidos, se utilizó un tampón de elución (TE) con la siguiente composición: 100 mM ClNa, 0,1 mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7,4 (Zaragoza *et al.*, 2010).

#### **3.5.5.7.2 Efecto del producto sobre las vesículas unilamelares de fosfolípidos (LUV)**

La pérdida del contenido de los LUVs de fosfolípido, se evaluó en función de la salida de CF medida por fluorescencia en un espectrofluorímetro PTI Quantamaster (Photon Technology, New Jersey, USA). Se usaron cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. La preparación de las soluciones de

LUV se realizó en el tampón TE. Para medir la fluorescencia se utilizaron dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión, 430 y 520 nm respectivamente. Para calibrar la escala de fluorescencia, la liberación máxima de CF a partir de los LUVs se indujo por rotura de las vesículas con 1% (v/v) de Tritón X-100 y este valor se tomó como el 100% de liberación. El estudio del efecto del BT se llevó a cabo utilizando distintas concentraciones (2- 25 µg/mL). Estas se añadieron desde una solución madre de 2 mM preparada en dimetilsulfóxido (DMSO) (Carrillo *et al.*, 2003).

### **3.6 Estudio del efecto del producto en células procariotas**

#### **3.6.1 Propiedades antimicrobianas: determinación de la CMI**

La actividad antimicrobiana se midió determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el desarrollo visible de crecimiento microbiano, después de 24 h de incubación a 37°C. Una solución madre de BT fue preparada en DMSO (4000 µg/ml) se diluyó en medio MHB, para alcanzar rangos de concentración entre 1024 – 2 µg/ml. Una cantidad de 200 µL de las distintas concentraciones se dispensaron en los correspondientes pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Costar; Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

Los pocillos con MHB y BT se inocularon con 10 µL de las diferentes suspensiones microbianas para alcanzar una concentración final de 10<sup>4</sup> UFC/ml. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C (Rodríguez *et al.*, 2004).

Adicionalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de los siguientes compuestos: C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>. Los tensioactivos geminales se prepararon a una concentración de 2 mM en agua destilada. También se estudió la actividad antimicrobiana de los siguientes sistemas binarios: C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> /BT (80:20); C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/BT (50/50); C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>/BT (80:20); C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>/BT (50:50). Los rangos de concentración evaluados para estos compuestos y mezclas fueron desde 250 hasta 0,1 µM. El estudio de la CMI, preparación del inóculo y lectura se realizó en placa de microtitulación tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.

### 3.6.1.1 Pérdida de iones potasio

La salida de iones potasio de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, y *L. monocytogenes* ATCC 15313 se determinó después del tratamiento de las suspensiones bacterianas con la mezcla de tensioactivos.

- **Contacto con la mezcla de tensioactivos.** A los 50 mL de las suspensiones bacterianas ( $3 \times 10^8$  UFC/ml) preparadas como se describe en el apartado 3.2.3.2, se añadió un volumen necesario de la mezcla de tensioactivos (2 mM en agua destilada), para alcanzar la concentración de la CMI (6,25  $\mu$ M).
- **Ensayo:** Las suspensiones bacterianas ( $3 \times 10^8$  ufc/mL) tratadas con la mezcla de tensioactivos (6,25  $\mu$ M), se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se tomaron muestras (5 ml) a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min. Las muestras se centrifugaron (5000 x g durante 20 min) y los sobrenadantes se acidificaron con una solución de HNO<sub>3</sub> (1%). La concentración de potasio en el sobrenadante se midió por Espectrometría de Plasma (ICP\_OES Perkin Elmer, modelo 3200RI). Se preparó una recta patrón con diferentes concentraciones de potasio (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 y 1 ppm). El valor máximo (100%) de pérdida de potasio se obtuvo al tratar las suspensiones celulares con calor (70°C) (Rodríguez *et al.*, 2004).

### 3.6.1.2 Curvas de viabilidad

Se estudió la viabilidad de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, y *L. monocytogenes* ATCC 15313 por recuento en placa.

- Las suspensiones bacterianas y el tratamiento de los microorganismos con las mezclas de tensioactivos se realizaron tal como se describe en el análisis por citometría de flujo (3.6.1.3). Los matraces con las suspensiones tratadas se incubaron a

temperatura ambiente por 2 h, a diferentes tiempos de contacto (0, 30, 60, 90 y 120 min) se tomaron muestras (5ml). Para bloquear la acción de la mezcla de tensioactivo, las muestras tomadas se diluyeron 1/10 con Ringer ¼ estéril. De cada muestra se realizó un banco de diluciones adecuado ( $10^6$ - $10^7$ ), sembrándose 0,1 mL en TSA y posteriormente se incubaron por 24 h a 30°C. Las células viables se calcularon a partir del número de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) obtenidas en TSA. Los recuentos fueron realizados por triplicado.

### 3.6.1.3 Citometría de flujo

Se estudió el efecto de la mezcla de tensioactivos sobre *E. coli* O157:H7 CECT 4267 y *L. monocytogenes* ATCC 15313.

- **Contacto con la mezcla de tensioactivos:** se tomaron 5 mL de las suspensiones bacterianas ( $3 \times 10^8$  UFC/ml), previamente preparadas (3.2.3.2) y se inocularon en matraces que contenían 45 ml de agua de peptona tamponada (ADSA) para obtener una densidad celular de  $10^7$  UFC/ml. De la mezcla de tensioactivos (2 mM en agua destilada) se adicionó un volumen necesario para alcanzar la concentración de la CMI (6,25  $\mu$ M) en los 50 mL de la suspensión bacteriana.
- **Ensayo:** Los 50 ml de los cultivos bacterianos previamente tratados con la mezcla de TS, fueron incubados a temperatura ambiente por 2 h, sin agitación. Cada 30 minutos se tomaron muestras de 10 mL de la solución tratada y se centrifugaron (8000 x g por 20 min). El sedimento fue resuspendido en 2 ml de agua de peptona. Posteriormente, a partir de estos 2 ml, se realizó una dilución 1:100 en solución salina de fosfato (PBS) con un volumen final de 500  $\mu$ l. Adicionalmente se realizaron controles (sin mezcla de TS) en las mismas condiciones.

- **Fluorocromos utilizados:** Para estudiar el efecto de la mezcla  $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$  en las células de *E. coli* y *L. monocytogenes*, se realizó una tinción con dos tipos de fluorocromos. El estudio de la permeabilización de membranas se realizó con la tinción de yoduro de propidio (IP), el cual se preparó en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml. Por otra parte, para evaluar el potencial de membrana se empleó bis-oxonol (BOX), que se preparó a una concentración de 250  $\mu$ mol.

Las muestras, diluciones de las células bacteriana (500  $\mu$ l) recogidas a diferentes tiempos, fueron teñidas con 1  $\mu$ l de la solución de BOX y 5  $\mu$ l de IP, incubándose por 5 min a temperatura ambiente. Como control, se utilizaron 500  $\mu$ l de la suspensión bacteriana sin la adición de la mezcla de tensioactivos. Además como control de la permeabilización de membranas, las células se calentaron a 70°C durante 2 h lo que provocó su muerte. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los análisis de las suspensiones bacterianas se realizaron en un citómetro de flujo Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Las muestras fueron excitadas a 488-nm utilizando un láser de iones de argón enfriado por aire a 15 mW de potencia. El instrumento se preparó con una configuración estándar: dispersión frontal (FS), dispersión lateral (SS), fluorescencia verde de BOX (525 nm) y rojo (675 nm) para el IP. Los resultados fueron expresados en escala logarítmica. La alineación óptica se comprueba mediante perlas fluorescentes de 10 nm (Flow-Check fluorospheres, Beckman Coulter). La población celular fue seleccionada de acuerdo a determinadas características (gating) en un gráfico de puntos FS vs SS con exclusión de los agregados y los restos celulares. Los histogramas de fluorescencia se representan en los histogramas de un solo parámetro (1.024 canales). Las ventanas que se utilizaron para calcular el porcentaje que se establecieron con las poblaciones de células vivas y células muertas para cada cepa. Los datos fueron analizados con el software Summit versión 3.1 (Cytomation, Fort Collins, CO, USA).



### 3.6.1.4 Microscopía electrónica

#### **Criofijación por alta presión-Criosustitución-Inclusión (High Pressure Freezing and Freeze- Substitution, HPF-FS)**

Se utilizó microscopía electrónica para observar los daños estructurales en las envueltas de *E. coli* O157:H7 CECT 4267 y *L. monocytogenes* ATCC 15313 provocados por la mezcla C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-BT (CMI). La metodología empleada se adaptó a la descrita por Frias *et al.*, (2010) con algunas modificaciones.

La preparación de las suspensiones celulares se realizó tal como se describió para el análisis por citometría de flujo (3.2.3.2). A partir de los 50 ml de las suspensiones tratadas, se recolectó el sedimento y fue lavado por tres veces con agua de peptona. Posteriormente estos sedimentos se transfirieron a *planchettes* de diámetro 1,5 mm y profundidad 200 µm e inmediatamente se procedió a la criofijación por alta presión utilizando el equipo Leica EM Pact (Leica, Viena, Austria) a una presión de 2100 bar y con una velocidad de disminución de temperatura de 8000°C/s. Las *planchettes* fueron entonces mantenidas en nitrógeno líquido hasta su uso. Las muestras crioinmovilizadas se criosustituyeron en acetona pura conteniendo tetróxido de osmio al 2% (m/v) y acetato de uranilo 0,1% (m/v), durante 72 h a -90°C en un equipo Leica AFS (Automatic Freeze Substitution). La temperatura se incrementó de forma gradual a 5 °C/h, hasta llegar a los 4°C. Las muestras se mantuvieron 2 h a 4 °C y luego la temperatura se elevó hasta 25 °C donde se mantuvo durante 2 h. Se realizaron tres lavados sucesivos con acetona durante 15 min a temperatura ambiente y las muestras se incluyeron en resina Epon-acetona: 1:3 durante 2 h; 2:2 durante 2 h, 3:1 durante 16 h y finalmente en Epon pura durante 30 h. Finalmente se procedió a la polimerización de la resina durante 48 h a 60 °C. Los cortes semifinos de 1 µm fueron realizados para poder localizar la zona deseada en un microscopio óptico. Posteriormente mediante ultramicrotomo (Leica, UCT), se realizaron cortes ultrafinos, de 50-60 nm, que se recogieron en rejillas de microscopía electrónica de cobre 200 MESH recubiertas con Formvar y carbono. Las secciones obtenidas se contrastaron

con acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se procedió a lavar la muestra con abundante agua y se contrastó con citrato de plomo aproximadamente durante 5-6 min en presencia de lentejas de NaOH y en una atmósfera cerrada en ausencia de CO<sub>2</sub>. Una vez preparadas las rejillas con las muestras, se colocaron en un desecador hasta su observación final en microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company, Holanda) a 120 kv. Las imágenes fueron captadas con la cámara CCD (FEI, Eindhoven, Holanda) y procesadas a través del programa AnalySIS (Soft Imagine Systema, Suiza).

### 3.6.2 Efecto del producto sobre la adhesión microbiana

El efecto del producto sobre la adhesión microbiana se estudió mediante tratamientos pre-adhesión y post-adhesión de BT llevados a cabo de acuerdo con modificaciones sobre el método descrito por Janek *et al.*, (2012). Para ambos tratamientos se ensayaron concentraciones de producto entre 4000 - 0 µg/ml, en tampón fosfato (PBS, 7,2).

Para realizar los estudios de pre-adhesión de BT, las placas de microtitulación de polipropileno se llenaron con 200 µl de cada una de las concentraciones de BT y se incubaron durante 6 h a temperatura ambiente (25°C). Una vez transcurrido el tiempo las placas se lavaron dos veces con tampón fosfato (PBS). Los pocillos control solo contenían PBS.

La formación de biofilm se realizó, tal como lo describe O'Toole (2011). A partir de cultivos microbianos crecidos durante la noche en caldo LB, se realizó una dilución 1:100 del crecimiento en el medio MM4. Luego se tomaron 200 µl y se depositaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos donde previamente se había adherido el BT y se incubó durante 20 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las placas se lavaron tres veces con PBS para eliminar los microorganismos no adheridos. El biofilm se fijó durante 15 min con metanol, tiñéndose posteriormente con 1% (w/v) de cristal violeta, por 20 min. Finalmente se cuantificó el biofilm formado. Para esto se eliminó el exceso de cristal violeta lavando con agua de grifo, los pocillos teñidos se diluyeron con

200 µl de ácido acético glacial (33%), y se determinó la absorbancia de dichos pocillos a 595 nm. Los porcentajes de inhibición de adhesión microbiana se calcularon de acuerdo con Janek *et al.* (2012) de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición de adhesión microbiana} = [1 - (A_c/A_o)] \times 100]$$

Donde  $A_c$  representa la absorbancia del pocillo con la concentración  $c$  de producto y  $A_o$  la absorbancia del pocillo control.

Para los tratamientos de post-adhesión de BT, primero se inoculó cada microorganismo tal como se ha descrito en el párrafo anterior, incubándose durante 20 h, a temperatura ambiente (25°C). Las células no adheridas se eliminaron por lavado con PBS por tres veces. Una alícuota de 200 µl de distintas concentraciones de Lch<sub>AL1.1</sub> (4000- 0 µg/ml) se añadió en cada pocillo. Las placas se incubaron por 6h a 25°C. La cuantificación del porcentaje de inhibición se calculó tal como se detalló anteriormente.

Finalmente, para el análisis de los resultados, se realizaron unas curvas dosis-respuesta, y los datos experimentales fueron ajustados a un modelo logístico:

$$y = d / 1 + e^{(b \log(x) - \log(e))}$$

Con tres parámetros, donde  $d$  es la asíntota superior (máxima inhibición de adhesión);  $b$  es la pendiente en el punto de inflexión de la curva y  $e$  es la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>).

### **3.7 Estudio del efecto del producto en células eucariotas**

#### **3.7.1 Determinación de la actividad hemolítica del BT**

La actividad hemolítica del BT se realizó utilizando eritrocitos humanos. Estos se prepararon justo antes de cada experimento, a partir de concentrados de glóbulos rojos (CGR) que fueron obtenidos de un banco de sangre local (Murcia-España). Las células se lavaron dos veces con el tampón 150 mM

NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,4, y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón antes de su uso. Todas estas operaciones se realizaron a 4°C.

Para las medidas de liberación de K<sup>+</sup> y de hemoglobina, el concentrado de eritrocitos anterior se diluyó con el mismo tampón hasta obtener una suspensión con una A<sub>540</sub> = 1. La liberación de hemoglobina se determinó después de la incubación de los eritrocitos con diferentes concentraciones de BT (2- 15 µg/ML) durante 1 h. Cada 4 minutos se tomaron alícuotas de 1ml de la solución tratada de eritrocitos y se midió la absorbancia a 540 nm después de sedimentar las membranas por centrifugación durante 2 min en una centrífuga de mesa (10000 rpm). La temperatura se mantuvo a 37°C y la cantidad total de hemoglobina se estableció lisando los eritrocitos con Triton X-100 tomando este valor como el 100% de liberación de hemoglobina (Zaragoza *et al.*, 2010).

La liberación de K<sup>+</sup> desde el interior de los eritrocitos se midió por espectroscopia de absorción atómica. Las medidas se realizaron bajo agitación magnética continua en una cubeta provista con una camisa de termostatación que permitía mantener la temperatura constante a 37°C mediante un baño de agua circulante, la concentración de BT utilizada fue de 6 µM durante 1 hora, las muestras fueron tomadas tal como se describió para la medida de la hemoglobina.

### 3.7.1.1 Experimentos de protección osmótica

Los eritrocitos se prepararon como se ha descrito en el apartado anterior (suspensión en tampón con 135 mM NaCl, 5 mM Hepes a pH 7,4), con la modificación que al tampón empleado se le añadió 30 mM de cada una de las siguientes sustancias por separado: sacarosa, polietilenglicoles (PEGs) (400, 600, 1000, 3350, 6000 y 10000) que se usaron como protectores osmóticos. El BT se añadió desde una disolución de 2 mM preparada en DMSO a diferentes concentraciones (3-12 µg). La hemólisis se determinó de igual manera como se ha explicado en el apartado 3.7.1. Para los cálculos se utilizaron los siguientes diámetros moleculares: sacarosa, 9,8 Å; PEG 400, 11,2 Å; PEG 600, 13,8 Å; PEG 1000, 17,8 Å; PEG 4000, 32 Å; PEG 6000, 54 Å; PEG 10000, 72 Å.

### 3.7.2 Efecto del producto sobre la proliferación celular de las células cancerígenas Caco-2 ATCC HTB 37

Los experimentos se realizaron en cultivos no diferenciados (etapa pre-confluentes) tal como se describe en el apartado 3.2.4. Después de 4 días de la siembra (estado de preconfluencia) el cultivo fue incubado con diferentes concentraciones de BT (1-150 µg/mL) en presencia de FBS durante 48 horas. Adicionalmente las células Caco-2 se incubaron en presencia de FBS, para determinar la proliferación máxima (Control +), y en ausencia de FBS (Control -), para determinar la proliferación mínima del cultivo en ausencia de factores de crecimiento.

Para determinar el número de células viables, primero se eliminó el sobrenadante de cada uno de los cultivos descritos antes (apartado 3.2.4) luego fueron lavados por dos veces con 1 ml de un tampón de fosfato estéril, D-PBS (Dubelcco's phosphate buffer saline; Sigma). Luego se adicionaron 200 µl de tripsina (170000 U/l) y se incubó 10 minutos en la estufa a 37°C. Después de la incubación, se comprobó visualmente que la células se hubieran desprendido de la superficie de crecimiento y, a continuación se inactivó la tripsina por la adición de 600 µl de DMEM + FBS. Posteriormente se realizó un recuento para determinar el número de células viables de la suspensión de células obtenidas.

- **Recuento de células viables:** El recuento de células viables se realizó por observación al microscopio de fluorescencia tras la tinción del cultivo con naranja de acridina y bromuro de etidio. El fluorocromo naranja de acridina entra en las células vivas y tiñe de color verde el DNA bicatenario y de color naranja claro el DNA monocatenario y el RNA. En cambio, el bromuro de etidio únicamente puede atravesar la membrana plasmática de las células muertas y tiñe de color naranja rojizo su material genético (Parks *et al.*, 1979).
- **Preparación del colorante:** Se preparó una solución de naranja

de acridina de 10 µl/ml y una solución de bromuro de etidio de 200 µl/ml disueltos en PBS. A continuación, se mezclaron los dos colorantes a volúmenes iguales (1:1) y la solución resultante se diluyó 10 veces (solución de trabajo) y se guardó en un recipiente de vidrio tapado a 4°C.

De la suspensión celular obtenida se tomaron 50 µl, que se mezclaron con 50 µl de la solución de trabajo de colorante y se rellenaron las celdas necesarias de una cámara Fast-Read<sup>©</sup> para realizar el recuento de células viables por microscopía de fluorescencia. Finalmente se calculó el número de células viables por µl de la suspensión celular inicial considerando que el volumen interior de cada celda era 1µl. Las células que presentaron fluorescencia al microscopio se determinaron como células viables

### **3.7.3 Estudio de la inducción de apoptosis en las células Caco-2**

La inducción de apoptosis por el BT se evaluó mediante el marcaje *in situ* del ADN fragmentado o ensayo del TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling*) en células Caco-2, previamente incubadas 48h con 100 µg/mL de BT. En estos experimentos, los cultivos también se incubaron en ausencia del producto (control negativo) y con estaurosporina (1 µM) (control positivo) (Falcieri *et al.*, 1993). Después del período de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS (2% de albúmina de suero bovino) y se tripsinizaron (adición de 200 µl de tripsina (170000 U/l) e incubación 10 minutos en la estufa 37°C. El sedimento celular se fijó en paraformaldehído al 4% en PBS (0,1 M, pH 7,4) a 4°C durante 30 min, después se permeabilizó incubando con etanol al 70% a -20°C durante 30 min. Esta técnica se basa en marcar y detectar el extremo 3'OH expuesto de forma característica al fragmentarse el DNA en el proceso apoptótico. La unión de dichos fragmentos de DNA a desoxiuridinotri-fosfato (dUTP) marcado con fluoresceína, se realizó en una reacción mediada por desoxinucleotidil-transferasa (TdT), siguiendo el protocolo del kit proporcionado por la casa comercial MEBSTAIN<sup>®</sup> Apoptosis Kit Direct, y finalmente estos fragmentos fueron analizados utilizando un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporati

on, Hialeah, FL, EE.UU.) perteneciente a los servicios científicos técnicos de la Universidad de Barcelona (Burgos-Díaz *et al.*, 2013).

#### **3.7.4 Estudio del efecto del producto en el ciclo celular de Caco-2**

Las células Caco-2 fueron cultivadas como se describió anteriormente (Apartado 3.2.4). Posteriormente se incubaron por 48 h en un medio que contiene DMEM (10 % FBS) con el tratamiento correspondiente (100 µg/mL de BT). De la misma manera se prepararon las suspensiones de células en presencia (Control +) y ausencia (Control -) de FBS. Luego de las 48 h las células se tripsinizaron, se fijaron con etanol (70%), y se mantuvieron a 4°C por al menos 2 h. Luego las moléculas de ADN de bajo peso molecular fueron extraídas de las células que se tiñeron por 1 h con una solución de IP (20 mg/mL) en PBS que contiene 0,1% de Triton X-100 y 0,2 mg/mL de DNase-free RNase A. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation). El ADN fue analizado utilizando un histograma de fluorescencia (análisis de la ploidía: La ploidía indica la cantidad de cromosomas que tiene una célula) detectados por un software Multiciclo (Phoenix Flow Systems).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





#### **4. Producción del biotensioactivo (BT) por**

***Bacillus licheniformis* AL 1.1**



#### 4. Producción del biotensioactivo (BT) por *B. licheniformis* AL 1.1

En la última década se han descrito un número elevado de tensioactivos bacterianos o biotensioactivos (BT). Generalmente las investigaciones que se realizan sobre este tipo de moléculas, se centran en el análisis de las condiciones de producción, la caracterización química y la determinación de las actividades biológicas. Sin embargo, a pesar de este esfuerzo la necesidad por la búsqueda de nuevos BT con importantes propiedades biológicas sigue latente. Un camino para la obtención de nuevos BT es la búsqueda de nuevos microorganismos a partir de muestras recogidas en ambientes únicos. En este contexto el continente Antártico es un paraíso aún por explorar. Las condiciones extremas de este continente podrían favorecer la presencia de microorganismos capaces de producir nuevos tensioactivos con propiedades interesantes para ser aplicados en la industria o en aplicaciones médicas.

Inicialmente, se estudió la capacidad de seis cepas de *Bacillus sp.* de producir BT. Estas cepas fueron aisladas de sedimentos recolectados de las islas Shetland del Sur, archipiélago del océano Glacial Antártico situado a unos 120 km de distancia de las costas de la península Antártica (Llarch *et al.*, 1997). Estas seis cepas fueron crecidas en el medio mineral MM1 durante 48h, a 50°C, y 120 rpm. Entre los aislados estudiados, solamente la cepa AL 1.1 redujo la tensión superficial de forma significativa, ya que después de crecer en el medio MM1 redujo la tensión superficial del sobrenadante del cultivo de 55,2 hasta 35,2 mN/m. Para la identificación de AL 1.1 Llarch *et al.*, (1997) realizaron un estudio de taxonomía numérica utilizando datos morfológicos y bioquímicos. Como resultado lograron identificar esta cepa como *B. licheniformis*. En un trabajo más reciente realizado en nuestro laboratorio, mediante la secuenciación del gen del 16S rDNA, se confirmó la identificación fenotípica inicial (Coronel-León *et al.*, 2015).

*B. licheniformis* AL 1.1 fue seleccionada para realizar la presente tesis doctoral como consecuencia de la marcada capacidad de reducir la tensión superficial que posee. En la primera parte se llevó a cabo el estudio preliminar de la producción del BT. Para ello fue necesario un estudio para conocer los

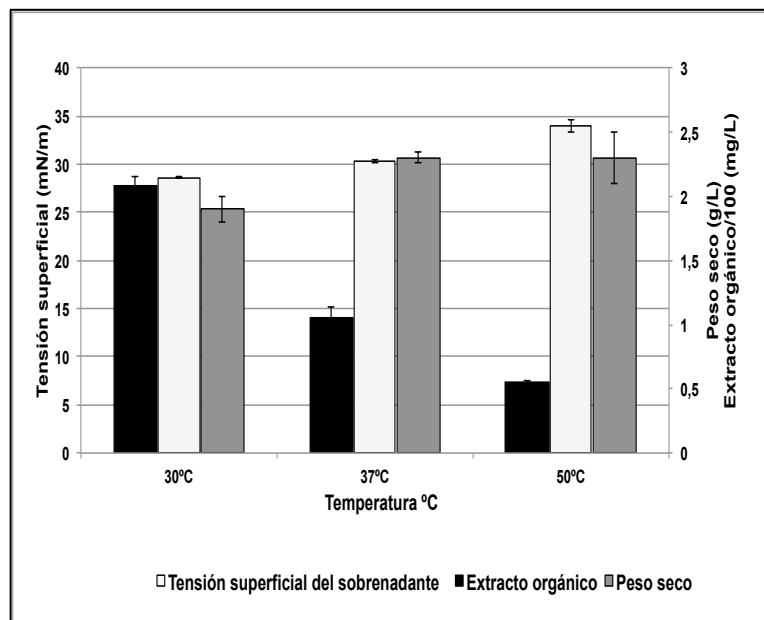
factores que afectan al crecimiento y al metabolismo bacteriano. El conocimiento de los requerimientos nutricionales así como el de los componentes adecuados del medio de cultivo, puede contribuir considerablemente al desarrollo de bioprocesos económicos. Por lo tanto, a continuación se describe el efecto de las condiciones físicas de cultivo como la temperatura y agitación, en la producción de BT. Adicionalmente, se estudió el efecto de la concentración de los componentes del medio MM1, medio de partida escogido para el estudio por su composición simple y definida. En este contexto se estudió la naturaleza de la fuente de carbono y nitrógeno, así como la modificación de la concentración de las sales de fosfato, calcio, magnesio y hierro.

Para seleccionar las condiciones iniciales de producción del BT, se han considerado los siguientes parámetros: i) Tensión superficial, ii) Extracto orgánico por extracción del sobrenadante del cultivo (EO o BT) y iii) Crecimiento microbiano en términos de peso seco.

#### **4.1 Optimización por simple omisión**

##### **4.1.1 Efecto de la temperatura y la agitación en el crecimiento de la cepa AL 1.1 y la producción de BT**

Se ha estudiado el efecto de la temperatura y la agitación en el crecimiento bacteriano y en la producción del BT producido por la cepa AL1.1. Se tiene conocimiento que *B. licheniformis* AL 1.1 es una bacteria termófila, con una temperatura óptima de crecimiento de 65°C y con la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (17-68°C) (Llarch *et al.*, 1997). Por esta razón, en primer lugar se estudió el crecimiento microbiano y la producción de BT a diferentes temperaturas (30, 37 y 50°C). En la Figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos.



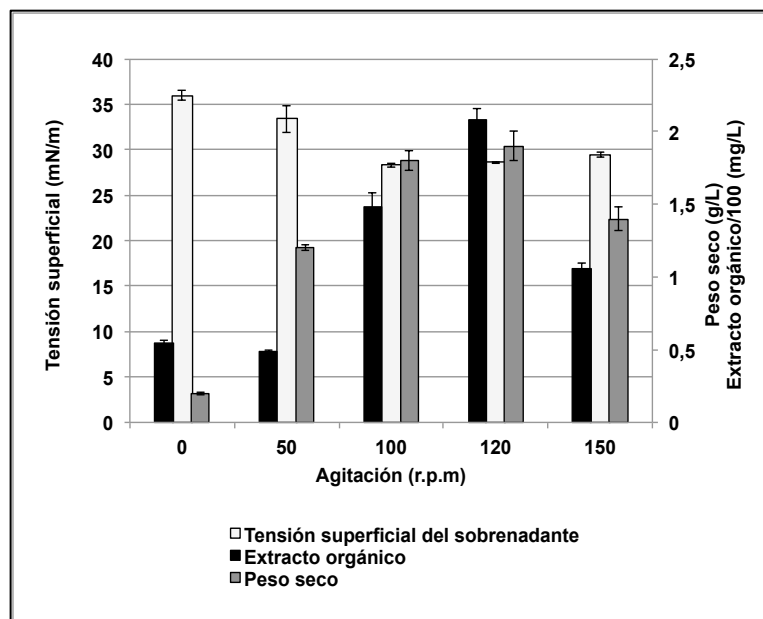
**Figura 4.1.** Influencia de la temperatura en el crecimiento y producción de BT por *B. licheniformis* AL 1.1. Evaluación de la tensión superficial, peso seco y extracto orgánico crudo, después de 24 h de cultivo.

AL 1.1 es una bacteria termófila que cuando se cultiva a 50°C en placas de TSA crece de forma muy rápida ya que se evidencia la presencia de colonias a las 3-4 h de incubación. Con respecto al crecimiento microbiano en MM1 podemos observar que después de 24 h de incubación se incrementa al aumentar la temperatura, encontrando que tanto a 37 y a 50°C se alcanzan los valores más altos de crecimiento microbiano (2,15 g/L).

En lo que concierne a la producción de BT, se valoró en términos de tensión superficial y extracto orgánico (EO). Podemos destacar que el aumento de temperatura provoca que la tensión superficial aumente de 28 mN/m (30°C) hasta 34 mN/m (50°C). De forma paralela, la cantidad de EO obtenida disminuía a medida que la temperatura aumentaba. De hecho, la mayor producción de EO se obtuvo a 30° (0,21 g/L), mientras que a 37°C y 50° se obtuvieron 0,11 g/L y 0,055 g/L respectivamente. Esto indica que a la temperatura de 50°C la producción de BT se inhibió mientras que probablemente la energía metabólica se utilizó para un rápido crecimiento celular. Esto da como resultado que la temperatura de 30 °C fue la más adecuada para la producción de BT, representando adicionalmente una estrategia más económica. Autores como Gogotov y Miroshnikov, (2009)

seleccionaron la misma temperatura (30°C) para la producción de BT por *B. licheniformis* VKM B-511, mientras que Joshi *et al.*, (2007) obtuvieron una máxima producción de BT producido por *B. licheniformis* cuando se cultivó a 45°C.

La disponibilidad de oxígeno puede afectar tanto al crecimiento como a la producción de metabolitos. A continuación se analizó la producción de BT variando la agitación del medio (0, 50, 100, 120 y 150 rpm). En la Figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos. Se observa claramente que el incremento en la agitación favorece el crecimiento microbiano. A 120 rpm se obtiene el crecimiento bacteriano más alto (1,8 g peso seco/L). En cuanto al EO el mejor rendimiento también se alcanzó a 120 rpm (0,208 g/L de EO). En lo que respecta a la tensión superficial, en todas las condiciones ensayadas se evidenció un descenso de la tensión superficial, a pesar de la baja cantidad de EO obtenido a rpm bajas o sin agitación. Este dato sugiere una elevada actividad superficial del EO.



**Figura 4.2.** Influencia de la agitación en el crecimiento de *B. licheniformis* AL 1.1. y en la producción de BT. Evaluación de la tensión superficial, peso seco y extracto orgánico crudo, después de 24 h de cultivo.

Con estos resultados se demuestra que la aireación es otro factor importante que se debe considerar para la producción de BT. En este aspecto, Ghribi y Ellouze-Chaabouni (2011) demostraron que la aireación del medio

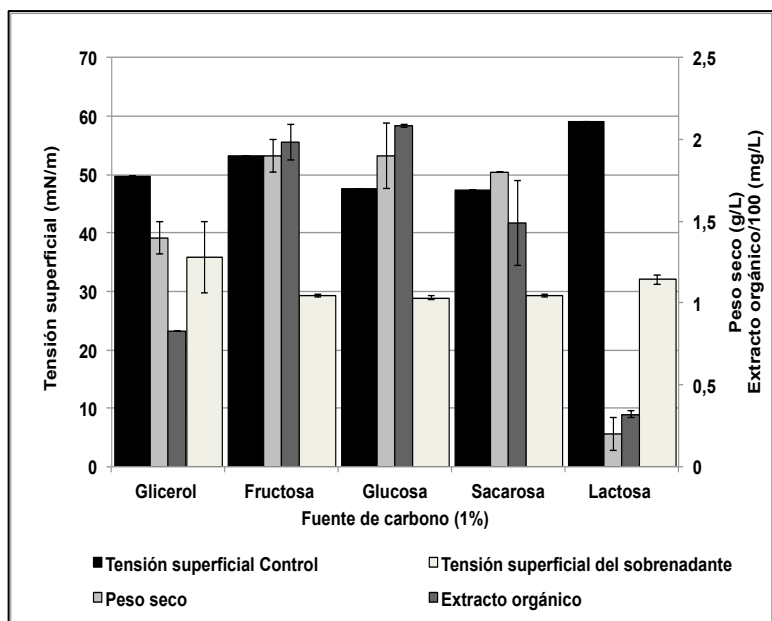
afecta los rendimientos de producción del BT producido por *B. subtilis* SPB1 y que la transferencia de oxígeno es uno de los parámetros claves para los procesos de optimización. En la producción de BT por AL1.1 la disponibilidad de oxígeno también es un factor importante, ya que una adecuada aireación favorece una mayor producción de BT.

Otra característica importante de AL 1.1 es que la producción de BT se realiza de forma muy rápida pues se determinó que a las 24 h (se estudió a 48 y 72 h) se producía la mayor cantidad de EO. Esto es un factor positivo en la rentabilidad de la producción, especialmente si lo comparamos con otros procesos que requieren varios días. La utilización de tiempos más largos de producción esta asociada con la naturaleza de las fuente de carbono, en este aspecto Joshi *et al.*, (2008a) demostraron que la producción de BT utilizando melazas y suero de leche se produjo a las 72 h de proceso. En resumen al momento, las mejores condiciones operativas para la producción del BT por AL 1.1 fueron 30°C, 120 rpm y 24 h de incubación.

#### **4.1.2 Producción de BT con diferentes fuentes de carbono**

Para seleccionar la fuente de carbono adecuada para la producción de BT se analizaron varios carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa), aceites (C<sub>11-13</sub>, aceite de oliva, aceite de linaza) y un alcohol (glicerol). Con los aceites estudiados no se evidenció crecimiento, a pesar de la emulsión que se observó en el medio de cultivo, produciéndose ésta, por tanto, como consecuencia de la agitación del cultivo. Los resultados obtenidos para las otras fuentes de carbono utilizadas se presentan en la Figura 4.3.





**Figura 4.3.** Influencia de la fuente de carbono (1%) en el medio de cultivo sobre la tensión superficial. Evaluación de la tensión superficial del medio, tensión superficial del sobrenadante, peso seco y extracto orgánico crudo, después de 24 h de cultivo.

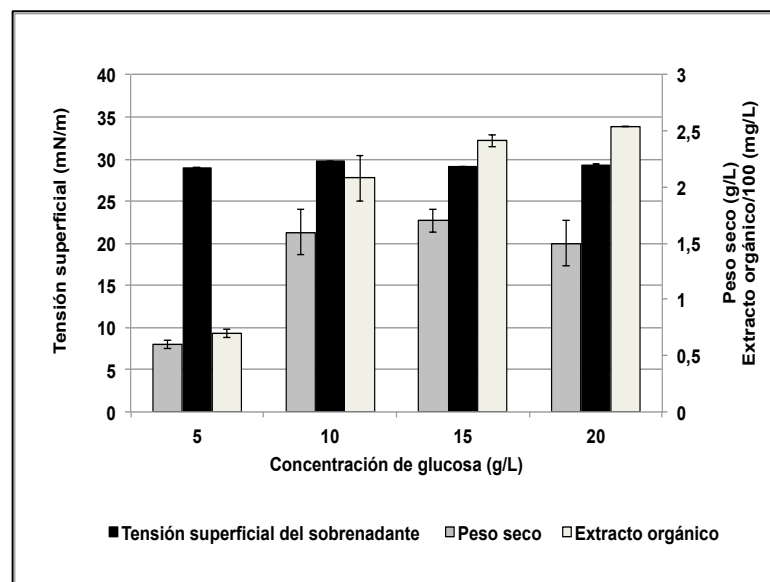
Como se puede observar, la cepa AL 1.1 creció muy bien con glicerol (1,4 g/L), además provocó un descenso en la tensión superficial del medio de cultivo control de 50 a 35,8 mN/m, sin embargo, los valores de EO (0,83 g/L) fueron bajos en comparación con las otras fuentes de carbono (a excepción de la lactosa). Los mejores resultados se obtuvieron con todos los carbohidratos ensayados, a excepción de la lactosa. Con los carbohidratos, en general, los valores de crecimiento microbiano fueron altos (1,8-2,0 g/L), así como los rendimientos de EO (0,15-0,21 g/L). En cuanto a los valores de tensión superficial se encontró que dicho parámetro se redujo hasta 29,1 mN/m. De todos los carbohidratos ensayados, fue con glucosa con la que se obtuvieron mejores resultados, por lo que se seleccionó como fuente idónea para la producción de BT por AL1.1.

En la producción de BT, entre los principales factores a estudiar están las fuentes de carbono y nitrógeno. Muchos microorganismos requieren sustratos hidrofóbicos (hidrocarburo o aceites) como fuente de carbono para la producción de BT. Como ejemplos podemos citar a *Rhodococcus erythropolis* y otras bacterias filogenéticamente relacionadas (Marqués *et al.*, 2009), cepas de *P. aeruginosa*, otras *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes calcoaceticus* y

*Brevibacterium luteolum* (Vilela *et al.*, 2014). El uso de *n*-alcanos como fuente de carbono para la producción de BT por *Bacillus* sp. está probablemente relacionado con las características del hábitat de aislamiento, ya que puede que estén contaminados por este tipo de compuestos. De hecho, algunas cepas de *B. licheniformis* productoras de BT se han aislado de suelos contaminados por petróleo (Yakimov *et al.*, 1995; Biria *et al.*, 2009). Una de las propiedades de los BT es que incrementan la disponibilidad de compuestos hidrófobos, lo que hace posible la supervivencia bacteriana en estas condiciones adversas. En nuestro trabajo se ha comprobado que la cepa *B. licheniformis* AL 1.1 no crece en presencia de *n*-alcanos o aceites. Este hecho puede estar relacionado con el aislamiento de AL 1.1 que se realizó en un suelo no contaminado y por lo tanto hay una falta de adaptación a estas fuentes de carbono. A pesar de que otras cepas de *Bacillus* sp. pueden crecer y producir BT utilizando sustratos aceitosos, normalmente los mejores resultados de producción se obtienen en medios con hidratos de carbono. Gogotov y Miroshnikov (2009) demostraron que *B. licheniformis* VKM B-511 produce BT a partir de sacarosa (0,750 g/l), glucosa (0,730 g/L) y fructosa (0,680 g/L). El hecho de que AL 1.1 produzca BT a partir de todos los carbohidratos ensayados es una información importante ya que se puede encontrar un residuo agroindustrial que permita reemplazar estas fuentes convencionales en busca de desarrollar un proceso más económico.

#### **4.1.3 Efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento microbiano y la producción de BT**

Una vez seleccionada la glucosa, el siguiente punto fue establecer la concentración ideal para la producción de BT. La glucosa se añadió en concentraciones crecientes de 0,5 hasta 2% (p/v). Los resultados se detallan en la Figura 4.4.



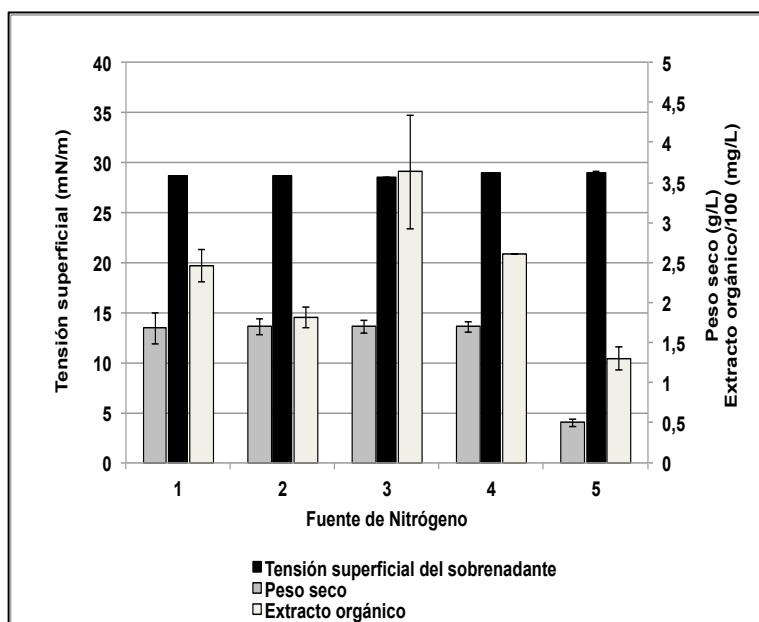
**Figura 4.4.** Influencia de la concentración de glucosa sobre producción de BT. Tensión superficial, peso seco y extracto orgánico.

Al incrementar la concentración de glucosa el crecimiento bacteriano incrementó, encontrándose un máximo a 15 g/L de glucosa, llegando a valores de crecimiento de 1,75 g/L de peso seco. Concentraciones superiores (2%) provocaron una ligera disminución en el crecimiento (1,5 g/L). Sin embargo, la producción de EO (0,25 g/L) aumentó conforme aumentó la concentración de glucosa, con máximo a una concentración de un 2%. En cuanto a la tensión superficial, esta no cambia en función del incremento de la concentración de glucosa, lo que pone de manifiesto la alta actividad superficial del EO de AL 1.1. En base a estos resultados la concentración de glucosa que se seleccionó fue del 2%. Adicionalmente, se analizó la glucosa residual en el medio de cultivo, encontrándose que a partir de las concentraciones iniciales de 15 y 20 g/L, después del proceso de producción existe un valor considerable de glucosa que no ha sido consumida. Esto hace necesario estudiar los componentes restantes del medio con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para un consumo total de glucosa y en consecuencia mejorar la producción de BT. En la literatura se ha descrito la utilización de concentraciones superiores de glucosa (4%) para la producción de un BT por *B. subtilis* (Ghribi y Ellouze-Chaabouni, 2011). Concentraciones similares han sido descritas por Saimmai *et al.*, (2011) para la producción de BTs producidos

por varias cepas de *Bacillus sp.* pero utilizando un sustrato complejo como las melazas.

#### 4.1.4 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y distintas concentraciones de fosfatos sobre el crecimiento microbiano y producción de BT.

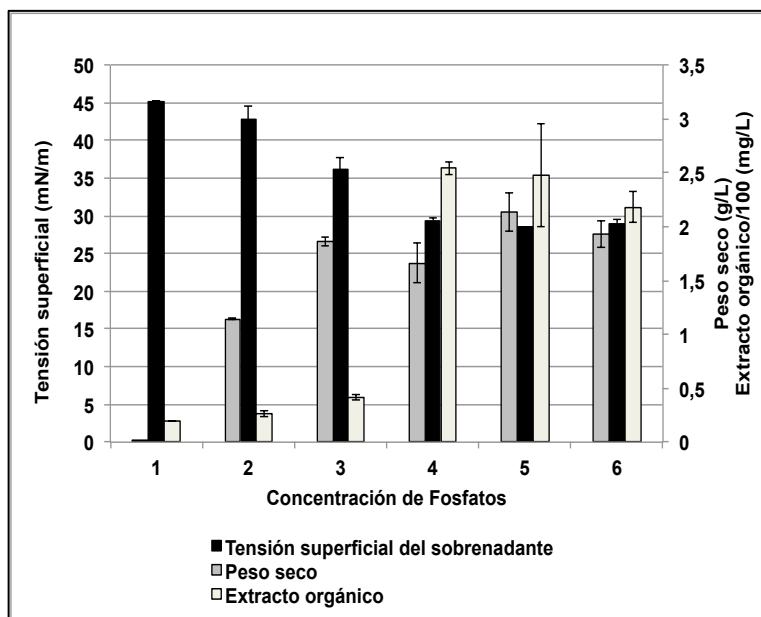
A continuación se estudió la fuente de nitrógeno y su efecto en la producción de BT por AL 1.1. Para esto diferentes fuentes orgánicas o inorgánicas (equimolares en nitrógeno: 50 mM) se añadieron al medio MM1. En la Figura 4.5 se muestra claramente que *B. licheniformis* AL1.1 creció muy bien con todas las fuentes de nitrógeno estudiadas, con excepción de la urea donde el crecimiento fue menor.



**Figura 4.5.** Efecto de la fuente de nitrógeno [ $\text{NH}_4\text{NO}_3$  : 1;  $\text{NaNO}_3$ : 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ : 3;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4; Urea: 5] sobre el crecimiento de la cepa AL 1.1 y la producción de BT a 30°C y 120 rpm.

El hecho de que *B. licheniformis* AL 1.1 pueda crecer con todas las fuentes nitrogenadas se puede explicar debido a la actividad nitrato reductasa que posee esta bacteria. Los mejores resultados en términos de EO fueron: 0,36 g/L con  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  y 0,26 g/L con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Estos resultados están en concordancia con los reportados por Thaniyavarn *et al.*, (2003) quienes describieron una mejora en la producción de BT por *B. licheniformis* F2.2 con sales de nitrato de amonio.

Los fosfatos son componentes importantes del medio de cultivo ya que aportan fósforo para el crecimiento y además actúan como agente tamponante. En este contexto, se estudiaron diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,4-11,4 g/L) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1-8 g/L). En la Figura 4.6 se presentan los resultados, quedando claro que para las concentraciones de fosfatos de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5,7g/L) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4 g/L) se obtuvieron los mejores resultados tanto de crecimiento (1,7 g/L) y producción de EO (0,25 g/L). En estas concentraciones, el pH final del medio se mantuvo entre 6,5-7. En cambio a bajas concentraciones de fosfatos, el pH final del medio se redujo a 6-5, y esto produce que la tensión superficial disminuya considerablemente. A pesar de que en estas condiciones se evidencia la presencia de EO. El bajo valor de tensión superficial puede estar asociado a la precipitación del BT. De acuerdo con estos resultados, una alta concentración de fosfatos favorece el crecimiento bacteriano y la producción de BT. Concentraciones similares de fosfatos han sido utilizadas para el cultivo de *B. licheniformis* por otros autores (Yakimov *et al.* 1995; Gogotov y Miroshnikov 2009). Para la producción de BT a nivel industrial es preferible un medio sintético económico, por lo tanto, se prefieren bajas concentraciones de fosfatos (Thaniyavarn *et al.*, 2003).



**Figura 4.6.** Efecto de la concentración de fosfatos [Medium control: 1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,4+1 g/L): 2; (2,9+ 2 g/L): 3; (5,7+4 g/L): 4; (8,6+6 g/L): 5; (11,4+8 g/L): 6] sobre el crecimiento de la cepa AL 1.1 y la producción de BT a 30°C y 120 rpm.

#### **4.1.5 Efecto de la concentración de calcio, hierro, y magnesio sobre la producción de BT y crecimiento de *B. licheniformis* AL1.1**

Por último, se estudió el efecto de las sales de calcio, hierro y magnesio sobre el crecimiento y producción de BT. Las concentraciones iniciales utilizadas en el medio MM1 fueron las óptimas, pero un incremento en la concentración de magnesio (0,21 g/L) logró un aumento en la producción del EO de 0,55 g/L después de 24 h de cultivo. Los iones metálicos como el magnesio y hierro mostraron tener un impacto importante para mejorar la producción de surfactina para una cepa de *B. subtilis* (Li *et al.*, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos por el método de simple de omisión, se diseñó un medio básico (MM2) para *B. licheniformis* AL1.1 con la siguiente composición (g/L): glucosa, 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,7; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,21; CaCl<sub>2</sub> 7x10<sup>-6</sup>; solución de elementos traza, 0,05 mL; pH final 7, 24 h de cultivo a 30°C y 120 rpm. Estos cambios han permitido incrementar la producción de BT de 0,21 a 0,55 g/L (2,6 veces) y mejorar la actividad superficial, medida en el sobrenadante del cultivo, de 37,7 hasta 29,7 mN/m. Esta disminución en la tensión superficial puede ser debida a una mayor producción de BT, y a una mejora en el control del pH del medio produciendo una alta solubilidad del BT y mayor descenso de la tensión superficial.

#### **4.2 Optimización de la producción de BT a partir de residuos agroindustriales**

Los resultados preliminares indican que *B. licheniformis* AL 1.1 tiene la capacidad de producir BT solamente a partir de hidratos de carbono (glucosa, sacarosa, fructosa) (Coronel-León *et al.*, 2015). Aunque los BT son muy activos y estables, una de las mayores limitaciones para su comercialización es su alto coste de producción. Por lo tanto, para obtener estos poderosos BTs y maximizar su aplicación, se necesitan métodos apropiados para su cultivo. Por esto motivo una de las siguientes áreas de análisis en la presente tesis doctoral fue el estudio de sustratos residuales de bajo coste. Estos residuos agroindustriales pueden actuar como alternativas baratas a las fuentes

convencionales de hidratos de carbono que fueron utilizadas anteriormente para la producción de BT (Simple omisión).

Se tiene conocimiento que con el objetivo de aumentar la vida útil de las materias primas y reducir los costos de producción de BT, otros autores han utilizado diferentes sustratos agroindustriales como por ejemplo cáscara de patatas para producir lipopéptidos por *B. subtilis* (Das y Mukherjee, 2007). En otras situaciones se ha utilizado paja de arroz para la producción de surfactina por *B. amyloliquefaciens* XZ-173 (Zhu *et al.*, 2013). Nitschke y Pastore, (2006) también demostraron la aplicación de aguas residuales de yuca para la producción de surfactina por *B. subtilis*. La utilización de residuos agroindustriales representa un doble beneficio, por una parte la posibilidad de desarrollar procesos biotecnológicos económicos y la otra es ofrecer un modelo de gestión de estos residuos, ya que si no se tratan adecuadamente se pueden convertir en importantes problemas de contaminación.

En primer lugar se analizaron los siguientes sustratos agroindustriales (20 g/L) como componente del medio MM1: suero de leche, almidón de yuca, aguas residuales de yuca y melazas. De estos sustratos residuales, con el que se obtuvo mejor resultados fue con melazas. Adicionalmente el almidón de yuca podría ser una alternativa interesante en estudios futuros. Con respecto al suero de leche y el agua residual de yuca se puede asegurar que no fueron adecuados para la producción de BT. Por lo que en base con estos resultados, se seleccionaron las melazas. Este residuo agroindustrial de la producción de azúcar se destina principalmente a la alimentación animal, pero su bajo precio y la aportación adicional de compuestos nutricionales (nitrógeno, vitaminas) lo convierten en un producto potencial de interés industrial (Sarka *et al.*, 2012).

**Tabla 4.1.** Composición de melazas

<b>Composición</b>	
Azúcares totales	53,73%
Sacarosa	38%
Nitrógeno orgánico	1%
<b>Microminerales (mg/100 g melazas)</b>	
Calcio	850
Magnesio	700
Hierro	8
Sodio	23

El simple hecho de utilizar melazas ya comporta un beneficio importante, ya que al analizar los ocho componentes del medio MM1 se observó que con las melazas solo era necesario añadir el  $\text{NaNO}_3$  y las sales de fosfatos. Este resultado puede ser consecuencia de la compleja composición de las melazas. En el sentido, que las melazas además de aportar considerables cantidades de hidratos de carbono, también aportan otros compuestos (Tabla 4.1). En pocas palabras el nuevo medio basal y económico (MM3) para la producción de BT estaba compuesto por (g/L): melazas, 20;  $\text{NaNO}_3$  4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5,7.

En el estudio preliminar hemos utilizado un método de optimización empírico, como la técnica de simple omisión, debido a su facilidad y conveniencia. Este primer estudio permite conocer el efecto independiente de los componentes de un medio de cultivo sobre la producción de BT. Sin embargo, para sistemas químicos o biológicos que poseen más de una variable independiente o factores (los sistemas multi-factor o multi-variables) este método lleva a un conocimiento incompleto del comportamiento del sistema, resultando en una posible confusión y lagunas de habilidad predictiva. Gran parte de esta confusión puede evitarse con la aplicación de experimentos de optimización estadísticos correctamente diseñados y modelos multi-factor adecuados (Deepak *et al.*, 2008). Así que para incrementar la producción de BT ( $\text{Lch}_{\text{AL1.1}}$ ) de una manera económica, se ha realizado una optimización del medio MM3, para lo cual se estudiaron los efectos de estos tres componentes sobre el crecimiento microbiano y producción de  $\text{Lch}_{\text{AL1.1}}$ , mediante la aplicación de la metodología de la superficie de respuesta (MSR).



#### 4.2.1 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La optimización de medios de cultivo (Roseiro *et al.*, 1992; de O. Souza *et al.*, 1999) así como de las condiciones de hidrólisis enzimática (Fang *et al.*, 2010) y de sistemas de producción (Ozaki y Shiio, 1975) ha sido utilizada para mejorar substancialmente el rendimiento y la productividad de muchos bioprocesos (Chisti y Moo Young, 1996). Por otro lado, el comportamiento observado de sistemas de producción resulta de influencias interactivas entre varias variables y normalmente las complejidades e incertidumbres asociadas a las producciones deriva de la falta de conocimiento de las sofisticadas interacciones entre varios factores (Chang *et al.*, 2002). Los métodos de optimización estadísticos, al contrario que los empíricos, pueden tener en cuenta las interacciones de las variables al generar la respuesta del proceso (Khurana *et al.*, 2007). Por lo tanto los tres componentes del medio de cultivo identificados como los factores con más impacto en las respuestas a estudiar (producción de biomasa y producción de BT) fueron escogidos para la optimización. La MSR es una técnica estadística útil para la investigación de procesos complejos particularmente en el campo de procesos químicos y de ingeniería de la investigación industrial, biológica o de agricultura con especial énfasis en la optimización de procesos o sistemas siendo su mayor ventaja el reducido número de experimentos necesarios que proporcionan información suficiente para obtener resultados estadísticamente aceptables (Kathiresan *et al.*, 2007).

La MSR es un conjunto de técnicas que permiten la identificación de la región del óptimo y que implica:

- a. El diseño de una serie de experimentos que proporcionen medidas adecuadas y de relevancia en las respuestas de interés.
- b. La determinación de un modelo matemático que ajuste lo mejor posible los datos recogidos del diseño mediante inferencia estadística, es decir, la realización de valoraciones de hipótesis apropiadas concernientes a los parámetros del modelo, como la estimación de los coeficientes del

- modelo matemático para comprobar la adecuación del modelo matemático que permita describir la superficie de respuesta, y
- c. La determinación de las condiciones óptimas de los factores experimentales que producen un valor máximo (o mínimo) en la respuesta.

De esta manera, a continuación se desarrollarán los puntos siguientes

1. Aplicación de un diseño de experimentos (DRCC) y
2. La aplicación de dos técnicas diferentes en el estudio de la Metodología de Superficie de Respuesta
  - a. El análisis matemático de las superficies de respuesta ajustadas para la producción de biomasa y producción de  $Lch_{AL1.1}$  y el consiguiente análisis gráfico de estas superficies de respuesta
  - b. La obtención de los valores óptimos para la maximización de la producción biomasa y de la producción de  $Lch_{AL1.1}$ .

Estas dos técnicas diferentes utilizadas en el estudio de las MSR proporcionan resultados tanto análogos como complementarios confirmándose así conclusiones equivalentes.

#### **4.2.1.1 Diseño experimental: Diseño Rotacional Central Compuesto (DRCC)**

De acuerdo a la estrategia recomendada por Davies, (1993) en el diseño de mejora de un medio de cultivo, una vez realizado el experimento de selección o búsqueda para determinar qué factores son los más importantes y el rango más apropiado de estos factores, se debe escoger un diseño experimental que proporcione datos suficientes para poder estimar la superficie de respuesta. De todas maneras, antes de empezar un diseño de experimentos debe tenerse en cuenta que:

- a. Cuando se escoge un diseño determinado se está escogiendo también un modelo de respuesta de regresión.

- b. Para factores cuantitativos, la regresión múltiple será una de las herramientas apropiadas para analizar el diseño
- c. Diseños pequeños y secuenciales consistentes en la selección del diseño seguida de un diseño de metodología de respuesta son preferibles a realizar mega-diseños.

En base a ello y, siguiendo la estrategia propuesta por Davies, (1993) una vez definida las respuestas a considerar ( $Y_1$ =concentración de biomasa celular y  $Y_2$ = concentración de BT ( $Lch_{AL1.1}$ ), enumerados los factores o variables independientes, identificados y seleccionados los tres componentes nutricionales más importantes (melazas ( $X_1$ ), concentración de nitrato ( $X_2$ ) y concentración de fosfatos ( $X_3$ ) y una vez determinados, de forma aproximada, los rangos de estudio de cada factor, se llevó a cabo el estudio de configuración y optimización de los componentes críticos del medio de cultivo (concentración de melazas, concentración de nitratos, y concentración de fosfatos) para mejorar la producción de biomasa y  $Lch_{AL1.1}$ , mediante la aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). De esta manera, para examinar los efectos combinados y localizar las concentraciones óptimas de la fuente de carbono (melazas), nitratos y fosfatos así como explorar completamente la región de la superficie de respuesta en las cercanías del óptimo para las dos respuestas objeto de estudio, producción de biomasa y  $Lch_{AL1.1}$ , se escogió un Diseño Rotacional Central Compuesto (DRCC) para el análisis de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).

Éste es uno de los diseños que mejor funciona cuando el interés se centra en la obtención de un óptimo y debe centrarse alrededor de la zona de interés. Los experimentos del DRCC son especialmente apropiados para tener en cuenta las interacciones ya que para ello se requiere un diseño experimental con más de dos niveles para cada factor, de forma que una aproximación de segundo orden de la superficie de respuesta pueda desarrollarse. Así la combinación de factores generadores de una respuesta óptima puede ser identificada mediante el DRCC. En este sistema se estudiaron pues, dos respuestas (variables dependientes,  $Y_1$  e  $Y_2$ ) que dependían de tres variables independientes o factores ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ), cuyos

valores pueden ser controlados por el experimentador. La respuesta es la cantidad medida cuyo valor se supone que está afectado por el cambio de niveles de los factores. Los factores o variables independientes así como la decisión para los niveles de estas variables independientes se basaron en los datos experimentales obtenidos mediante la técnica de simple omisión. De esta manera se llevó a cabo un DRCC.

Las variables  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  son las llamadas normalmente variables independientes naturales, porque están expresadas en las unidades naturales de medida, como g/L de concentración. En la práctica, los niveles de las variables independientes cambian de una aplicación a otra, es por ello, que en muchos estudios de MSR es conveniente y habitual normalizar las variables independientes naturales  $X_i$  en variables codificadas  $x_i$  ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ), tal como se describió en el apartado 3.3.2.1. De esta manera, en el DRCC las variables codificadas  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  representarán las variables naturales concentración de melazas ( $x_1$ ), concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_2$ ), y concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $x_3$ ). La configuración de la matriz experimental se llevó a cabo tal como se describió para la elaboración del DRCC.

En el DRCC, las variables están codificadas  $x_i$  (-1,68,-1, 0, +1 y +1,68) resultando necesario identificar estas variables codificadas con las variables naturales, expresadas en unidades de concentración. Los niveles más altos y más bajos de las variables para los experimentos del DRCC fueron seleccionados de acuerdo a los datos obtenidos en el estudio preliminar realizado mediante la técnica de simple omisión, siendo estos los siguientes:

$X_1$ : 10-200 g/L de melazas

$X_2$ : 1-12 g/L de  $\text{NO}_3^-$

$X_3$ : 2-15 g/L de  $\text{PO}_4^{3-}$

Por lo tanto, aplicando la ecuación 1 (apartado 3.3.2.1), el rango y los niveles de las variables independientes, tanto en valores codificados como en

valores naturales, investigados en este estudio fueron los descritos en la Tabla 4.2:

**Tabla 4.2.** Rangos y niveles de las variables independientes en los experimentos del DRCC con tres factores a cinco niveles cada uno de ellos.

Variable independiente	Unidades	Símbolos		Nivel codificado de las variables				
		No codificado	Codificado	-1,68	-1	0	1	1,68
[Melazas]	g/L	$X_1$	$x_1$	10	48,45	105	161,55	200
[NO <sup>3-</sup> ]	g/L	$X_2$	$x_2$	1	3,23	6,5	9,77	12
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	g/L	$X_3$	$x_3$	2	4,63	8,5	12,37	15

El DRCC aplicado en este estudio, para un sistema con tres factores (k=3) cada uno de ellos evaluado a cinco niveles diferentes (-1,68, -1, 0, 1, 1,68), el número total de experimentos requeridos (N) fue de  $N = 2^k + 2k + n_c = 2^3 + 2(3) + 9 = 23$  (14 combinaciones con 9 réplicas del punto central). La matriz experimental de este DRCC y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3. Los 23 experimentos realizados, de acuerdo al diseño experimental, fueron llevados a cabo por triplicado y los resultados obtenidos son el promedio de las tres determinaciones, realizadas a partir de disoluciones de sales diferentes y utilizando diferentes inóculos. De la misma manera, los experimentos fueron realizados de forma aleatoria con el fin de maximizar los efectos de variabilidad inexplicable en las respuestas observadas debido a factores externos.

**Tabla 4.3.** Matriz experimental correspondiente a un DRCC para tres factores y datos experimentales observados de las respuestas.

Exp nº	Valores codificados de las variables			Valores naturales de las variables			Valores experimentales de las respuestas	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$ Melazas (g/L)	$X_2$ NO3- (g/L)	$X_3$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (g/L)	$Y_1$ Biomasa (g/L)	$Y_2$ Lch <sub>AL1.1</sub> (g/L)
1	1	1	-1	161,55	9,77	4,63	11,3	1,17
2	-1	-1	-1	48,45	3,23	4,63	4,3	0,73
3	0	0	0	105	6,5	8,5	8,215	2,69
4	0	0	0	105	6,5	8,5	8,55	3,33
5	0	1,68	0	105	12	8,5	10,49	1,63
6	-1	1	-1	48,45	9,77	4,63	4,22	0,75
7	0	0	0	105	6,5	8,5	8,28	3,16
8	1	1	1	161,55	9,77	12,37	11	1,61
9	-1,68	0	0	10	6,5	8,5	0	0,62
10	0	0	0	105	6,5	8,5	8,385	3,15
11	-1	-1	1	48,45	3,23	12,37	4,2	1,55
12	0	-1,68	0	105	1	8,5	3,7	1,98
13	1,68	0	0	200	6,5	8,5	4,68	1,12
14	0	0	1,68	105	6,5	15	6,6	2,08
15	1	-1	-1	161,55	3,23	4,63	1,105	1,52
16	-1	1	1	48,45	9,77	12,37	1,9	2,19
17	0	0	-1,68	105	6,5	2	6,85	1,24
18	1	-1	1	161,55	3,23	12,37	2,43	1,93
19	0	0	0	105	6,5	8,5	8,385	3,23
20	0	0	0	105	6,5	8,5	8,5	3,28
21	0	0	0	105	6,5	8,5	8,1	3,14
22	0	0	0	105	6,5	8,5	8,2	3,16
23	0	0	0	105	6,5	8,5	8,305	3,16

#### 4.2.1.2 Modelo matemático: ajuste de los resultados a un modelo de regresión cuadrático

Basándonos en la teoría de la Superficie de Respuesta (SR), las variables respuestas, producción de biomasa ( $Y_1$ ) y la producción de Lch<sub>AL1.1</sub> ( $Y_2$ ), pueden ser descritas como una función de las variables independientes o factores seleccionados, es decir, como una función de la concentración de la fuente de carbono ( $X_1$ ), de la concentración de nitratos ( $X_2$ ) y de la concentración de fosfatos ( $X_3$ ), es así que,

$$Y_K = f_k(X_1, X_2, X_3)$$

En términos de las variables codificadas, la función respuesta real se escribe como

$$Y_k = f_k(x_1, x_2, x_3)$$

Donde la forma de la función  $f$  exacta de la respuesta es desconocida e incluso puede llegar a ser muy complicada, por tal motivo esta debe ser aproximada. En condiciones normales es apropiado un polinomio de orden bajo, en una región relativamente pequeña del espacio de las variables independientes. Para describir datos experimentales en los que la curvatura del sistema es realmente importante, el modelo polinomial de segundo orden que se presenta a continuación, es un modelo interesante y ampliamente utilizado:

### Ecuación 2

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

donde  $Y$  = variable dependiente o respuesta,  $\beta_0$  = constante o término independiente,  $x_i$  son los niveles codificados de las variables independientes o factores  $x_i$  ( $i=1-3$ ),  $\beta_i$  = coeficiente de los efectos lineales,  $\beta_{ii}$  = coeficiente de los efectos cuadráticos,  $\beta_{ij}$  = coeficiente para los efectos de interacción ( $i$  y  $j = 1-3$ ).

El modelo de segundo orden es utilizado ampliamente en la MSR por varias razones. Entre ellas se encuentran las siguientes:

- a. Es muy flexible. Puede usarse en una amplia variedad de formas funcionales, de esta manera a menudo funciona bien como una aproximación de la superficie de respuesta real.
- b. Es fácil estimar los parámetros (los  $\beta$ 's). Se puede usar el método de los mínimos cuadrados para este propósito.
- c. Existe una experiencia práctica considerable que indica que el modelo de segundo orden funciona bien en la resolución de problemas de superficies de respuestas reales.

De esta manera, el modelo de regresión polinómico completo de segundo orden, al que se han de ajustar los resultados obtenidos para describir las superficies de respuestas de las dos respuestas estimadas, con tres factores o variables independientes tiene la forma siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

donde;

- $Y$  es la respuesta predicha,  $Y_1$  es la respuesta predicha de biomasa en g/L e  $Y_2$  es la respuesta predicha de  $Lch_{AL1.1}$  en g/L;
- $x_1, x_2, x_3$  son los niveles codificados de la concentración de fuente de carbono ( $X_1$ ), de la concentración de nitratos ( $X_2$ ) y la concentración de fosfatos ( $X_3$ ).
- $\beta_0$  es el término independiente o constante que determina la intersección de la línea de regresión con el eje de ordenadas. Es el valor de la respuesta cuando el valor de las variables es igual a cero;
- $\beta_1, \beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes de los efectos lineales y son pendientes con respecto a cada uno de los tres factores. Representan el cambio estimado en la producción de biomasa o la producción de  $Lch_{AL1.1}$  para cada cambio de unidad en el valor de cada variable, en otras palabras es el cambio que ocurre en la producción de biomasa o en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  cuando la concentración de melazas, la concentración de nitratos y la concentración de fosfatos aumenta o disminuye en una unidad.
- $\beta_{11}, \beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  son los coeficientes de los efectos cuadráticos, son términos de curvatura y se usan para evaluar si existe o no curvatura en la superficie de respuesta, es decir, nos indica si la relación entre: la concentración de melazas y la producción de biomasa o la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , la concentración de nitratos y la producción de biomasa o la producción de  $Lch_{AL1.1}$  y la concentración de fosfatos y la producción de



biomasa o la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , respectivamente se ajusta más a una línea curva que no a una línea recta.

- $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ , y  $\beta_{23}$  son los coeficientes de los términos de interacción, son una medida de cuánto cambia la pendiente, con respecto a un factor, cuando el otro factor aumenta o disminuye, es decir;  $\beta_{12}$  indica que el efecto de la concentración de melazas en la producción de biomasa o en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  depende de la concentración de nitratos,  $\beta_{13}$  indica que el efecto de la concentración de melazas en la producción de biomasa o en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  depende de la concentración de fosfatos y por último  $\beta_{23}$  indica que el efecto de la concentración de nitrato en la producción de biomasa o en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  depende de la concentración de fosfato.

Además existe una estrecha conexión en la MSR y el análisis de regresión lineal. Por ejemplo, si se considera el modelo

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon$$

Los  $\beta$ s son un conjunto de parámetros desconocidos. Para estimar los valores de estos parámetros, se deben recopilar datos del sistema que se está estudiando. El análisis de regresión es una rama de la construcción de modelos estadísticos que usa estos datos para determinar los  $\beta$ s. Debido a que en general, los modelos polinómicos son funciones lineales de los desconocidos  $\beta$ s, se suele referir esta técnica como análisis de regresión múltiple.

La Regresión Lineal Múltiple, permite pues, estimar las respuestas dependiendo de los valores o configuración de las variables, calculando estimaciones de los coeficientes de regresión, es decir, los coeficientes de las variables independientes del modelo incluyendo el término independiente o constante. De todos modos, esto no indica si los coeficientes calculados o la ecuación del modelo tienen realmente una significación estadística. En otras palabras, esto no indica si la relación lineal que se define cuando se configura

la ecuación del modelo tiene algún significado cuando se compara con el error de los datos, o bien, si un coeficiente de regresión individual para una variable determinada posee alguna significación o se puede quitar del modelo sin sacrificar la calidad del resultado. Estas cuestiones pueden resolverse mediante la aplicación de análisis de significación del modelo de regresión y de los coeficientes de regresión individuales.

A menudo no se conoce realmente cuántos de los potenciales factores introducidos en el modelo contribuyen realmente en las respuestas. Además puede existir datos inconsistentes que den lugar a inespecificidades o modelos de regresión no reales. Por ello, normalmente, se empieza incluyendo todos los potenciales candidatos en el modelo de ecuación y posteriormente, tras aplicar un análisis de significación que indicará, de forma más o menos instantánea, si existe algo que no funciona adecuadamente, se intenta encontrar el mejor modelo de optimización. Para llegar al mejor modelo de optimización se utilizan técnicas que seleccionen un razonable conjunto de variables y/o sus interacciones para llegar a conseguir un modelo “satisfactorio”, es decir, un modelo que proporcione precisión en la reproducción de los datos experimentales y una adecuada predicción al aplicar el modelo a nuevos datos. En base a ello, en este estudio, para llegar a ajustar los datos experimentales del DRCC al mejor modelo de regresión, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- a. Ajuste de los datos experimentales a un modelo polinómico completo de segundo orden.
- b. Análisis de significación del modelo de regresión completo y de los coeficientes de regresión individuales para rechazar o eliminar todos los términos que fueron estadísticamente no significativos.
- c. Aplicación de la técnica “autoajuste” del programa Essential Regression (ER) para la obtención del mejor modelo de regresión.
- d. Diagnóstico del modelo de regresión y análisis de adecuación del modelo.

### 4.2.1.3 Ajuste de los datos experimentales a un modelo polinómico completo de segundo orden

Los resultados experimentales obtenidos del DRCC, presentados anteriormente (Tabla 4.3) fueron ajustados mediante el programa Essential Regression (ER) (un macro de Microsoft Excel de difusión gratuita en internet en <http://www.jowerner.homepage.t-online.de/download.htm>) a una ecuación polinomial de segundo orden con tres variables independientes ( $x_{i-j}$ = variables  $x_1$ - $x_3$ ) mediante la aplicación de análisis de la técnica de regresión múltiple sobre los datos experimentales, obteniéndose los modelos de regresión polinómicos de segundo orden completos para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) y de producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) siguientes:

#### Ecuación 3

$$Y_1 = 8,32 + 1,39x_1 + 2,03x_2 - 0,13x_3 - 2,15x_1^2 + 2,64x_1x_2 + 0,43x_1x_3 - 0,46x_2^2 - 0,48x_2x_3 - 0,59x_3^2$$

#### Ecuación 4

$$Y_2 = 3,14 + 0,13x_1 - 0,04x_2 + 0,33x_3 - 0,78x_1^2 - 0,16x_1x_2 - 0,17x_1x_3 - 0,45x_2^2 + 0,08x_2x_3 - 0,50x_3^2$$

Una vez obtenidos los modelos polinómicos completos de segundo orden, éstos fueron sometidos a un análisis de significación de los modelos de regresión y de los coeficientes de regresión individuales (Anexo A.1 y A1.1).

### 4.2.1.4 Prueba de significación de los modelos de regresión.

El análisis de significación del modelo de regresión determina si existe una relación lineal entre la variable respuesta  $Y$  y un conjunto de variables de regresión  $x_1, x_2, \dots, x_k$ . Para ello, los estadísticos tienden a definir la “hipótesis nula”. Se asume el peor de los escenarios diciendo: “La hipótesis nula ( $H_0$ ) es verdadera si no hay relación entre alguna de las variables independientes”.

Si la hipótesis nula ( $H_0$ ) es rechazada, entonces al menos una de las variables de regresión contribuye significativamente en el modelo lineal y se puede concluir que existe una relación funcional entre la respuesta y al menos una de las variables.

A continuación se presenta el análisis de varianza o ANOVA que fue utilizado para resumir las pruebas de significación de los modelos polinómicos completos de segundo orden obtenidos. El análisis de las Tablas de varianza muestra la cantidad de variación en la respuesta debida a las variables (regresión) así como la cantidad de variación que es inexplicable (residual o error). La existencia en la matriz experimental de puntos repetidos, la variación inexplicable se presenta dividida en la variación del error puro y la variación debida a la inadecuación del modelo o falta de ajuste.

**Tabla 4.4.** Análisis de Varianza para la significación del modelo de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) por *B. licheniformis* AI 1.1, con 9 términos y 23 experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de Cuadrados	$F_0$	Probabilidad P = $P:(H_0:F_0 \leq F_{crit})$
Modelo de Regresión	224,57	9	24,95	1025,8	4,81E-17
Residual o error	0,316	13	0,02433		
Error LOF	0,147	5	0,0294	1,39	0,323
Error Puro	0,169	8	0,02115		
Total	224,89	22			

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 4.4 podemos determinar si la relación entre la respuesta biomasa ( $Y_1$ ) y las variables según el modelo de regresión obtenido, era estadísticamente significativa o no, para lo cual se analizó los valores de probabilidad  $P$ :

- a. En la Tabla 4.3, se observa que el primer valor de  $P$  corresponde al modelo de regresión, este se usó para determinar si los términos en el modelo de regresión tenían algún efecto sobre la respuesta. Basándonos en la premisa de que si el valor  $P$  es menor que el valor elegido de  $\alpha$ , se puede rechazar la hipótesis nula, es decir existe al menos un término de la ecuación de regresión provoca un impacto

significativo en la respuesta. El valor de  $\alpha = 0,05$  (valor habitual que se selecciona), para la respuesta de biomasa ( $Y_1$ ) el valor  $P$  de regresión fue  $= 4,81 \times 10^{-17}$ , es decir menor que el valor de  $\alpha$ , lo que indica que el modelo de regresión es significativo.

- b. Además en la Tabla se presenta un segundo valor de  $P$  que corresponde a la falta de ajuste, este determina si la variación en la respuesta era debida a la inadecuación del modelo. En este caso el valor de  $P$  para la falta de ajuste es de  $P = 0,32$ , este valor es mayor que el  $\alpha$  seleccionado, esto nos indica que debemos aceptar la hipótesis nula para la falta de ajuste, es decir que la falta de ajuste no es significativa, lo que quiere decir que no hay evidencia de que el modelo no explique adecuadamente la variación en las respuestas. Es importante mencionar que la probabilidad de que la falta de ajuste no fuera significativa es del 32%. Por lo tanto este modelo se puede aceptar ya que el valor esta por encima del 25% que es el mínimo aceptado para considerar la falta de ajuste no significativa (Oh *et al.*, 1995).

Así mismo para analizar la significación del modelo obtenido para la respuesta producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) se consideraron los valores de probabilidad  $P$  de la Tabla ANOVA (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Análisis de Varianza para la significación del modelo de regresión para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *B. licheniformis* Al 1.1, con 9 términos y 23 experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de Cuadrados	$F_0$	Probabilidad $P = P:(H_0:F_0 \leq F_{crit})$
Modelo de Regresión	19,25	9	2,139	63,34	2,85E-09
Residual o error	0,439	13	0,03377		
Error LOF	0,172	5	0,03433	1,027	0,462
Error Puro	0,267	8	0,03343		
Total	19,69	22			

- a. Para este caso el valor  $P$  del modelo de regresión para la respuesta producción de  $Lch_{AL1.1}$  fue de  $P = 2,85 \times 10^{-9}$ , el cual es un valor muy pequeño y menor que el  $\alpha = 0,05$ , indicando que al menos un término del modelo de regresión afecta significativamente a la respuesta  $Y_2$ .

- b. Analizando el segundo valor de  $P$  relacionado con la falta de ajuste, se observó que este valor  $P=0,46$  es mayor al  $\alpha$  (0,05), lo que quiere decir que no existe evidencia del que modelo no explique adecuadamente la variación en la respuesta. Este modelo se podría aceptar ya que el valor es mayor al 25% que suele ser aceptado para considerar la falta de ajuste no significativa (Oh *et al.*, 1995).

Para poder explicar la significación de los coeficientes individuales se debe aplicar otro análisis. Este análisis es la base para la posterior obtención del mejor modelo de optimización, mediante la adición o supresión de coeficientes. Es importante mencionar que un modelo con muchos coeficientes no necesariamente es el mejor, y que un modelo con pocos coeficientes puede mejorar si se añaden otros, para esto es necesario conocer qué coeficientes cumplen un papel realmente significativo en el modelo. Los modelos fueron sometidos a un análisis de los coeficientes individuales, para examinar si existían coeficientes individuales no significativos, y esto nos permite rechazar o eliminar aquellos términos que no fueran estadísticamente significativos que se muestra en anexos (A 1.1).

#### **4.2.1.5 Aplicación de la técnica “autoajuste” del programa Essential Regression para la obtención del mejor modelo de regresión**

El programa Essential Regression (ER) posee un método que combina de forma automática las técnicas de adición y eliminación de variables llamado “Autoajuste”. Este método permite seleccionar un modelo de regresión de entre todos los modelos posibles generados de todas las combinaciones posibles de términos de forma automática. Este proceso se realiza mediante la adición de una nueva variable de acuerdo al método de “*Selección Paso Adelante*” y mediante la reevaluación de las variables existentes en este modelo usando los valores de  $P$  de los coeficientes de regresión individuales, como se ha descrito en el apartado anterior. Así, cuando es necesario una de las variables es eliminada vía “*Eliminación paso atrás*”. Este método posee la ventaja de ofrecer la selección del “mejor modelo” de forma automática, de todos modos

una vez obtenido este modelo se debe comprobar que el nuevo modelo sea realmente significativo.

De esta manera aplicando este método de “autoajuste” se obtuvieron dos modelos de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ), y para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ );

### **Ecuación 5**

$$Y_1 = 8,32 - 2,15 x_1^2 + 2,03x_2 + 2,64x_1x_2 + 1,39x_1 - 0,59x_3^2 - 0,46x_2^2 - 0,48x_2x_3 + 0,43x_1x_3 - 0,13x_3$$

### **Ecuación 6**

$$Y_2 = 3,14 - 0,78x_1^2 - 0,50x_3^2 - 0,45x_2^2 + 0,33x_3 + 0,13x_1 - 0,17x_1x_3 - 0,16x_1x_2$$

Cuando se realiza el autoajuste los términos de la ecuación de regresión aparecen ordenados según su nivel de significación; lo que indica que los términos que aparecen primero son los de mayor influencia sobre la respuesta estudiada.

Una vez obtenido estos modelos ajustados tanto para la respuesta biomasa ( $Y_1$ ) y la respuesta  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ), se comprobó si eran estadísticamente significativas o no, para lo cual se realizó el análisis de varianza para los modelos finales, que se presentan en las siguientes Tablas. (Tabla 4.6 y Tabla 4.7).

De acuerdo a los resultados que se observan en las Tablas ANOVA (Tabla 4.6 y Tabla 4.7);

- a. Los valores  $P$  tanto del modelo de regresión como para la falta de ajuste referentes a la respuesta producción de biomasa ( $Y_1$ ), son idénticos a los obtenidos en el análisis del modelo inicial sin aplicar el método de

“*autoajuste*”, lo que la técnica ha logrado únicamente, es ordenar los términos de acuerdo a su importancia para esta respuesta.

- b. En lo referente a el valor  $P$  para el modelo de regresión para los datos de producción de  $Lch_{AL1.1}$  fue de  $P= 1,038 \times 10^{-10}$ , un valor menor al  $\alpha = 0,05$ , esto indica que el modelo de regresión obtenido era significativo.
- c. En lo referente a la falta de ajuste se pudo observar que el valor  $P= 0,555$ , este valor es mayor al  $0,05$  que corresponde al nivel de significación ( $\alpha$ ), lo que quiere decir que no existe evidencia del que modelo no explique de una forma adecuada las variaciones en la respuesta. En otras palabras la probabilidad de que el ajuste no sea significativo es del  $55\%$ , por lo que sólo el  $45\%$  de las variaciones en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  eran debidas a la inadecuación del modelo.

**Tabla 4.6.** Análisis de Varianza para la significación del modelo de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) por *B. licheniformis* Al 1.1, con 9 términos y 23 experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de Cuadrados	$F_0$	Probabilidad $P= P:(H_0:F_0 \leq F_{crit})$
Modelo de Regresión	224,57	9	24,95	1025,8	4,81E-17
Residual o error	0,316	13	0,02433		
Error LOF	0,147	5	0,0294	1,39	0,323
Error Puro	0,169	8	0,02115		
Total	224,89	22			

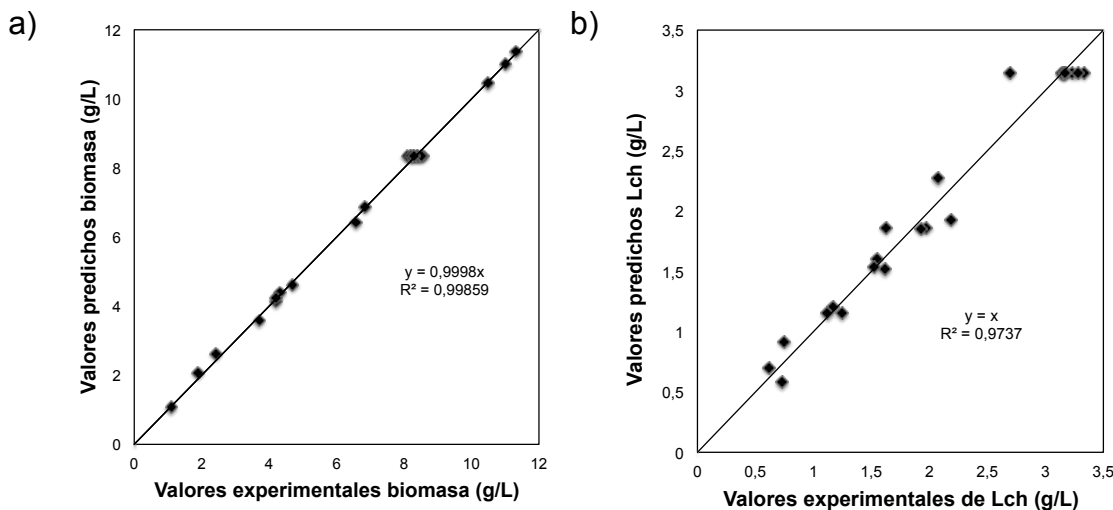
**Tabla 4.7.** Análisis de Varianza para la significación del modelo de regresión para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *B. licheniformis* Al 1.1, con 7 términos y 23 experimentos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de Cuadrados	$F_0$	Probabilidad $P= P:(H_0:F_0 \leq F_{crit})$
Modelo de Regresión	19,17	7	2,739	79,3	1,04E-10
Residual o error	0,518	15	0,03454		
Error LOF	0,189	6	0,03157	0,8645	0,555
Error Puro	0,329	9	0,03652		
Total	19,69	22			

Basados en esta información se puede concluir que la relación entre las respuestas (producción de biomasa y de  $Lch_{AL1.1}$ ), y las variables de acuerdo a los nuevos modelos obtenidos eran estadísticamente significativos.



Adicionalmente para conocer la “bondad del ajuste” del modelo de regresión, a continuación se presentan los gráficos de los valores de las respuestas observadas versus los valores de las respuestas predichas (Figura 4.8 a,b), que se utilizan para ajustar los datos a la línea recta de coeficiente de correlación de  $R$  o  $R^2$  de los modelos de regresión polinomial ajustados.



**Figura 4.8.** Valores experimentales y predichos usando el modelo polinomial de segundo orden ajustado. a) Producción de biomasa. b) Producción de la Lch<sub>AL1</sub>.

En ambos casos se observa un buen ajuste de los valores experimentales y teóricos. En los estudios de optimización donde se aplica MSR, generalmente se utilizan dos variables respuestas (Abalos *et al.*, 2002; Rodríguez-Carmona *et al.*, 2011). Basándonos en esta información, en el presente estudio se analizó la producción de biomasa donde se encuentra un modelo de predicción con un valor del coeficiente de regresión  $R^2=0,99$ , comparable con datos existentes en la bibliografía. Por ejemplo un modelo de regresión con un valor de  $R^2=0,96$  se reportó para la producción de ramnolipidos por *P. aeruginosa* AT 10 (Abalos *et al.*, 2002). Un dato importante de mencionar es que en algunos estudios de optimización de la producción de BT algunos investigadores optan por estudiar una sola respuesta. Por ejemplo, Rodrigues *et al.*, (2006) describieron la relación entre el crecimiento celular y la actividad superficial por lo que utilizaron la variable del crecimiento microbiano como medida para estimar la producción del BT por *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* donde se obtienen un modelo de predicción para biomasa con un  $R^2=0,75$ . Los datos de la literatura nos demuestran que

nuestro modelo propuesto para la producción de biomasa puede explicar mejor las variaciones de esta variable para *B. licheniformis* AL 1.1.

Con respecto a la otra variable de respuesta que se analizó (producción de  $Lch_{AL1.1}$ ). De donde se obtuvo un alto coeficiente de regresión ( $R^2=0,973$ ). Lo cual es muy remarcable, ya que la melaza es un sustrato agroindustrial de gran complejidad. Dentro del contexto bibliográfico, podemos establecer comparaciones con otros modelos de regresión obtenidos para la producción de BT, por ejemplo, para la optimización de la producción de surfactina por *B. amyloliquefaciens* que cuando se hacen crecer en paja de arroz, se obtienen coeficientes de regresión ( $R^2$ ) de 0,98 (Zhu *et al.*, 2013), o en casos donde se utilizan hidratos de carbono como la glucosa para la producción de surfactina por *B. subtilis* DSM 3256 donde el valor de  $R^2$  del modelo de regresión fue de 0,93 (Sen y Swaminathan, 2004). Ya en el caso particular de liquenisina se determinaron las condiciones óptimas de la producción con la aplicación de MSR utilizando como fuente de carbono glucosa por *B. licheniformis* obteniendo un modelo de regresión  $R^2=0,918$  (Joshi *et al.*, 2008b) menor al que hemos obtenido en nuestro trabajo. Estas comparaciones permiten asegurar que el nivel de predicción de nuestros modelos propuestos se encuentran dentro de los lineamientos establecidos por otros autores tanto para la producción de biomasa como de  $Lch_{AL1.1}$ .

#### 4.2.1.6 Análisis matemático de la superficie de respuesta

La aplicación de una estrategia experimental, el DRCC, permitió explorar el espacio del proceso o variables independientes, esto combinado con la aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple y modelización estadística, ha permitido desarrollar una relación apropiada entre la producción de biomasa y producción de  $Lch_{AL1.1}$ , y las variables del proceso. De esta manera, se ha logrado construir modelos matemáticos que relacionaban adecuadamente los factores de estudio escogidos: concentración de melazas, concentración de nitratos y concentración de fosfatos, con la respuestas objetivo de este análisis como lo era la producción de biomasa y producción de  $Lch_{AL1.1}$  por *B. licheniformis* AL1.1. También se llevó a cabo el análisis estadístico de los

modelos polinómicos de segundo orden, donde se comprobó que estos describían los valores experimentales y reales de las variables respuestas adecuadamente, y además poseían un poder predictivo apropiado.

Los modelos polinómicos finales obtenidos para la producción de biomasa y para la producción de Lch<sub>AL1.1</sub> por *B. licheniformis* AL 1.1, respectivamente fueron:

### Ecuación 5

$$Y_1 = 8,32 - 2,15 x_1^2 + 2,03x_2 + 2,64x_1x_2 + 1,39x_1 - 0,59x_3^2 - 0,46x_2^2 - 0,48x_2x_3 + 0,43x_1x_3 - 0,13x_3$$

### Ecuación 6

$$Y_2 = 3,14 - 0,78x_1^2 - 0,50x_3^2 - 0,45x_2^2 + 0,33x_3 + 0,13x_1 - 0,17x_1x_3 - 0,16x_1x_2$$

Una vez analizando estadísticamente estas ecuaciones polinomiales se corroboró el nivel de significación de cada coeficiente y esto permitió conocer como las variables estudiadas afectaban en las respuestas. A continuación se describe sus efectos individuales, combinados y sus interacciones;

Para la respuesta producción de biomasa ( $Y_1$ ):

El modelo final (ecuación 5) consta de 9 términos más el termino independiente donde existen;

- a. Efectos de interacción: el modelo contiene tres interacciones ( $x_1x_2$ , [melazas] x  $[NO_3^-]$ ,  $x_2x_3$   $[NO_3^-]$ x $[PO_4^{3-}]$  y  $x_1x_3$  [melazas] x  $[PO_4^{3-}]$ ), esto quiere decir que en la primera y tercera interacción el efecto de la concentración de Melazas en la producción de biomasa depende de la concentración de nitratos ( $x_1x_2$ ) y de la concentración de fosfatos ( $x_1x_3$ ),

así como el efecto de la concentración de nitratos en la producción de biomasa depende de la concentración de fosfatos ( $x_2x_3$ ).

- b. Efectos cuadráticos: el modelo contiene los tres efectos cuadráticos ( $x_1^2$ ,  $[Melazas]^2$ ,  $x_3^2 [PO_4^{3-}]^2$  y  $x_2^2 [NO_3^-]$ ), esto indica que la relación entre la concentración de melazas, concentración de fosfatos y concentración de nitratos con respecto a la producción de biomasa se ajustaban más a una curva que a una línea recta.
- c. Efectos lineales: como se puede observar el modelo contiene los tres efectos lineales ( $x_2$ ,  $[NO_3^-]$ ,  $x_1 [Melazas]$ , y  $x_3 [PO_4^{3-}]$ ), esto indica que existe un efecto lineal significativo para las tres variables independientes. Lo que nos permite conocer que la producción de biomasa, irá cambiando a medida que cambie la concentración de cada uno de estas variables.

Hasta el momento se ha hecho un análisis global de la incidencia de las variables estudiadas en la producción de biomasa, a continuación analizaremos la influencia de cada una de las variables en la respuesta. Para esto es importante conocer que en la ecuación de regresión los términos están ordenados de acuerdo a su valor de coeficiente de regresión y su nivel de significación. Esto quiere decir que los términos de la ecuación de mayor influencia sobre la variable respuesta son aquellos que aparecen al inicio, con base en esta información podemos concluir que la influencia de las diferentes variables en la producción de biomasa fue la siguiente

- a. **Efecto de la concentración de la fuente de carbono:** de acuerdo a su posición en la ecuación de regresión, la concentración de melazas ( $x_1$ ) es el segundo valor que linealmente más influye en la producción de biomasa, esto si comparamos los valores de sus coeficientes de regresión  $\beta_1 = 1,39 < 2,03$  que corresponde a la concentración de nitratos ( $x_2$ ). A pesar de esto el término que aparece en primera posición en el modelo de regresión es el término cuadrático  $x_1^2$ , lo que indica que el efecto de la concentración de melazas en la producción de biomasa se ajusta a una línea curva que a una línea recta ( $\beta_{11} = -2,15$ ). Esto indica

que a medida que se varía la concentración de melazas en el rango estudiado, se observan variaciones en la producción de biomasa, estas variaciones no deben ser nada despreciables ya que el término cuadrático de la concentración de melazas ( $x_1$ ) y su efecto lineal ocupan la primera y cuarta posición en el modelo de regresión. Por otro lado debe tomarse en cuenta que el efecto de la concentración de melazas depende en gran medida de la concentración de nitratos. Este término de interacción aparece en la tercera posición con un valor de coeficiente de regresión  $\beta_{12}= 2,64$ . Además, existe una interacción de menor influencia y poco apreciable en la producción de biomasa, que indica que el efecto de la concentración de melazas depende de la concentración de fosfatos ( $x_1x_3$ ), si comparamos los valores de regresión  $\beta_{13}=0,43 < 2,64$ , de la interacción ( $x_1x_2$ ), sumado a que ocupa la octava posición en el modelo de regresión, comprobamos su poca influencia.

- b. **Efecto de la concentración de nitratos:** se observó que el término que más influye en la producción de biomasa es el término ( $x_2$ ), la concentración de la fuente de nitrato, este posee un coeficiente que tiene un valor de regresión  $\beta_2= 2,03$ , es decir que la mayor variación de la producción de biomasa sería observada al variar la concentración de nitratos dentro del rango de estudio establecidos. Además el efecto de la concentración de nitratos en la producción de biomasa se ajusta más a una línea curva, en este caso la pendiente de la curva descrita para la concentración de nitratos no es tan fuerte como la descrita para la concentración de melazas ( $\beta_{22}=-0,466 < \beta_{11}= -2,15$ ). Por otro lado el efecto de la concentración de nitratos en la producción de biomasa depende de la concentración de fosfatos  $x_2, x_3$ , esta en comparación con la interacción  $x_1x_2$  descrita anteriormente es poco apreciable y de menor influencia ( $\beta_{23}=-0,481 < \beta_{12}= 2,643$ ).
- c. **Efecto de la concentración de fosfatos:** de acuerdo a su posición en el modelo de regresión, el término correspondiente a la concentración de fosfatos ( $x_3$ ), es el que menos influye en la producción de biomasa, esto ocurre para el rango de estudios analizado. La concentración de fosfatos

se muestra también en forma de línea curva, en este caso la pendiente de la curva descrita para la concentración de fosfatos es ligeramente mayor que la de la concentración de nitratos, ya que se encuentra en la quinta posición en el modelo de regresión ( $\beta_{33} = -0,597 < \beta_{22} = -0,466$ ).

Por último se pudo observar que la mayoría de los coeficientes lineales ( $x_1, x_2$ ) presentes en el modelo ajustado poseen signos positivos, mientras que los coeficientes cuadráticos presentes en el modelo poseen signo negativo, esto se verá reflejado, desde el punto de vista geométrico, en patrones de curvatura convexos.

#### Para la respuesta producción de $Lch_{AL1.1}$ ( $Y_2$ )

El modelo final (ecuación 6) consta de 7 términos más el término independiente o constante existiendo:

- a. Efectos de interacción: el modelo contiene dos interacciones ( $x_1x_2$ , [melazas] $x$ [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] y  $x_1x_3$  [melazas] $x$ [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]) indicando que el efecto de la concentración de melazas en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  depende de la concentración de nitratos, así como de la concentración de fosfatos. El efecto de la concentración de nitratos no depende de la concentración de fosfatos ( $x_2x_3$ ), es decir es una interacción que no tiene un efecto significativo por eso este término se eliminó de la ecuación.
- b. Efectos cuadráticos: el modelo contiene los tres efectos cuadráticos ( $x_1^2$ , [melazas]<sup>2</sup>,  $x_3^2$  [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]<sup>2</sup> y  $x_2^2$ [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) lo que indica que la relación entre la concentración de melazas y producción de  $Lch_{AL1.1}$ , concentración de nitratos y producción de  $Lch_{AL1.1}$ , y concentración de fosfatos y producción de  $Lch_{AL1.1}$  se ajustan más a una línea curva que no a una línea recta.
- c. Efectos lineales: el modelo contiene 2 efectos lineales ( $x_1$ [melazas],  $x_3$ [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]), por lo tanto, existe un efecto lineal significativo para la concentración de melazas y para la concentración de fosfatos. Es decir la producción de  $Lch_{AL1.1}$  variará dependiendo de la concentración de

melazas y concentración de nitratos. En este caso se eliminó el término de la concentración de nitratos ( $x_2$ ) por ser estadísticamente no significativo, esto no quiere decir que la concentración de nitratos no influya en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ya que el término cuadrático de la concentración de nitratos si esta presente en la ecuación de regresión, sino que la producción de  $Lch_{AL1.1}$  cambia muy poco en relación a la concentración de nitratos dentro de los rangos de concentración de nitratos establecidos en el estudio.

Como se realizó anteriormente, a continuación analizaremos la influencia de cada una de las variables en la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , conociendo que en la ecuación de regresión los términos están ordenados de acuerdo a su valor de coeficiente de regresión y su nivel de significación, con base en esta información podemos concluir que el efecto de las diferentes variables en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  fue la siguiente;

- a. **Efecto de la concentración de la fuente de carbono:** se observó que el segundo término que más influye en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  después de la concentración de fosfatos es el término  $x_1$ , que es la concentración de melazas que tiene un valor  $\beta_1=0,136$ . Además como puede verse en la ecuación de regresión el término cuadrático  $x_1^2$  posee un valor  $\beta_{11}=-0,786$  apareciendo en el primer lugar de la ecuación de regresión, lo que indica que el efecto de la concentración de melazas en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  se ajustará a una línea curva que no a una línea recta. Además debe tenerse en cuenta que el efecto de la concentración de Melazas en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  depende en gran medida de la concentración de fosfatos y de la concentración de nitratos,  $x_1x_3$  y  $x_1x_2$  que aparecen en el sexto y séptimo lugar en la ecuación de regresión con valores de coeficientes de regresión muy similares  $\beta_{13}=-0,176$  y  $\beta_{12}=0,166$ .
- b. **Efecto de la concentración de nitratos:** el término que menos influye en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  es el término  $x_2$ , correspondiente a la

concentración de nitratos, esto quiere decir que la producción de  $Lch_{AL1.1}$  cambia muy poco en relación a la concentración de nitratos dentro del rango de estudio establecidos, esto se comprueba ya que el término  $x_2$  no aparece en la ecuación de regresión. A pesar de esto el término cuadrático  $x_2^2$  aparece en tercera posición en la ecuación de regresión con una pendiente menor que los términos cuadráticos correspondientes a la concentración de melazas y fosfatos, esto indica que la poca influencia de la concentración de nitratos se presente en forma de curva.

- c. **Efecto de la concentración de fosfatos:** se observó que el término que más influye en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  es el término  $x_3$ , correspondiente a la concentración de fosfatos, ya que este término presenta un coeficiente de regresión más elevado  $\beta_3=0,331$ . Lo que quiere decir que la mayor variación en los valores de producción de  $Lch_{AL1.1}$  sería observada al variar la concentración de fosfatos dentro del rango de estudio establecido. Además, el efecto de la concentración de fosfatos se ajustará a una línea curva que no a una línea recta, en este caso la pendiente de la curva descrita para la concentración de fosfatos no es tan fuerte como la descrita para la concentración de melazas ( $\beta_{33}=-0,507 < \beta_{11}=-0,786$ ). Es importante destacar que el efecto de interacción concentración de fosfatos y concentración de melazas, como se comentaba arriba, es significativo en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  y aparece en el sexto lugar en el modelo de regresión.

Se puede observar que los coeficientes lineales presentes en el modelo ajustado poseen signo positivo mientras que los coeficientes cuadráticos presentes en el modelo poseen signos negativos, esto se verá reflejado, desde el punto de vista geométrico, en patrones de curvatura convexos, es decir, líneas curvas que van aumentando hasta llegar a un punto en el que empiezan a descender.



#### 4.2.1.7 Análisis gráfico de las superficies de las respuestas

La representación gráfica de las superficies de respuesta obtenidas debe ser de gran ayuda en la visualización y entendimiento de los efectos de los factores sobre las respuestas observados en el análisis matemático de los modelos. Pueden realizarse dos tipos de gráficas de superficie de respuestas, bidimensionales o curvas de nivel y tridimensionales o llamadas de superficie. Así pues, las gráficas tridimensionales de las superficies de respuesta para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) y para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) fueron la aproximación más útil en términos de visualización del sistema.

La gráfica de superficie de respuesta es una gráfica tridimensional que representa la relación funcional entre la respuesta y las variables. Esta gráfica ayuda a visualizar cómo reacciona la respuesta ante cambios de las variables. Las gráficas tridimensionales muestran únicamente dos factores o variables al mismo tiempo, los factores extra deben mantenerse a un nivel constante. Estas gráficas de superficie de respuesta son muy útiles también a la hora de establecer valores de respuesta deseados o determinadas condiciones de operación. La naturaleza de las superficies de respuesta depende de los signos y magnitudes de los coeficientes en la ecuación del modelo, existiendo básicamente cuatro tipos de superficies que incluyen las formas de simple máximo, cresta estacionaria, cresta ascendente y silla de montar o minimax.

Así pues, se dibujaron las gráficas de superficie para las dos respuestas estudiadas  $Y_1$  y  $Y_2$  (Figuras 4.9 y 4.10). Estas gráficas muestran cómo las respuestas, producción de biomasa ( $Y_1$ ) y producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) están relacionadas con dos de los factores o variables del proceso, según las ecuaciones de regresión de los modelos con sus coeficientes (ecuación 5 para la respuesta  $Y_1$  y ecuación 6 para la respuesta  $Y_2$ ), mientras el tercer factor permanece constante. De esta manera, en el eje vertical se representa la función respuesta  $Y$ , mientras que en los ejes horizontales se representan las variables (concentración de melazas,  $x_1$ ; concentración de nitratos,  $x_2$  y concentración de fosfatos,  $x_3$ ), en sus valores codificados. Debido a que las gráficas sólo permiten el estudio de dos variables cada vez, la tercera variable

se mantuvo constante, obteniéndose tres series de gráficas cada una de ellas para dos factores y a los cinco niveles estudiados (-1,68, -1, 0, 1 y 1,68) de la variable que se mantiene a un nivel o valor fijo.

**Para la respuesta  $Y_1$ , producción de biomasa (g/L) (Figura 4.9):**

**a. Influencia de la concentración de la fuente de carbono ( $x_1$ ):**

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.9, serie a, en la que se representan en cinco gráficas la producción de biomasa (g/L) ( $Y_1$ ) frente a los niveles codificados de concentración de nitratos ( $x_2$ ) y concentración de fosfatos ( $x_3$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de Melazas ( $x_1$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, 1 y 1,68).

- ✓ La respuesta  $Y_1$ , producción de biomasa, es considerablemente diferente a medida que varía la concentración de melazas. La producción de biomasa aumenta al aumentar la concentración de la fuente de carbono hasta alcanzar un máximo para un valor aproximado de  $x_1=1$  y no varía de forma apreciable posteriormente cuando se continúa aumentando del nivel +1 al nivel máximo +1,68. Esta variación es muy acusada indicando que la influencia de la concentración de melazas sobre la producción de biomasa es muy importante tal y como se observó en la ecuación polinomial donde los términos de la variable  $x_1$  ocupaban una posición importante en la ecuación de regresión apareciendo como las 1ª, 3ª y 4ª variables de la ecuación.
- ✓ La respuesta no es lineal, como se observa en las gráficas, la forma de la superficie curvada varía a medida que varía la concentración de la fuente de carbono, debido a la importancia del término cuadrático  $x_1^2$ , que aparece en primer lugar en el modelo de regresión.
- ✓ El valor máximo de respuesta que se obtiene en cada caso es diferente conforme varía la concentración de la fuente de carbono, si bien este cambio no es uniforme. El valor máximo de producción de biomasa sufre un ligero aumento cuando la concentración de melazas disminuye del

nivel +1,68 al nivel +1 aumentando la biomasa de 14,16 a 14,24 g/L respectivamente. Posteriormente, a medida que disminuye la concentración de Melazas desde los niveles +1 al -1,68 la producción de biomasa disminuye notablemente hasta valores de 2,5 g/L para el nivel más bajo de concentración de Melazas  $x_1=-1,68$ .

- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_1$  con las otras dos variables ( $x_2$  y  $x_3$ ) se puede observar:

**$x_1x_2$ :** Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie con respecto al eje  $x_2$  es muy diferente. Para valores altos de  $x_1$ , la mayor respuesta se obtiene para valores también altos de  $x_2$ . A medida que disminuye la concentración de Melazas ( $x_1$ ) el máximo valor de respuesta se obtiene para valores cada vez más pequeños de concentración de nitratos ( $x_2$ ). El mayor extremo se da al ensayar la menor concentración de Melazas ( $x_1=-1,68$ ) y, en este caso, el máximo se ha desplazado a valores centrales de concentración de nitratos ( $x_2=-1,68$ ). La interacción de la concentración de melazas-concentración de nitratos es la más importante teniendo en cuenta su significación estadística. En la ecuación de regresión (ecuación 5) el término correspondiente a dicha interacción se encuentra en tercer lugar.

**$x_1x_3$ :** A lo largo del eje  $x_3$  la forma de la superficie prácticamente no cambia para distintos valores de  $x_1$ . El cambio que se aprecia está en los valores absolutos de la respuesta. De todos modos, para todos los casos, la máxima respuesta se obtiene siempre para valores más o menos centrales de  $x_3$ . Esto se confirma en la ecuación de regresión donde este término aparece en octavo lugar.

#### **b. Influencia de la concentración de nitratos ( $x_2$ ):**

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.9, serie b, en la que se representan en cinco gráficas la producción de biomasa (g/L) ( $Y_1$ ) frente a los niveles codificados de concentración de melazas ( $x_1$ ) y concentración de

fosfatos ( $x_3$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de nitratos ( $x_2$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, +1 y +1,68).

- ✓ La respuesta es diferente cuando varía la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , con una variación similar a la del caso anterior. La producción de biomasa aumenta al aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno ( $x_2$ ) hasta alcanzar un valor máximo para  $x_2=+1,68$ . Esto se evidencia en la ecuación polinomial de regresión donde los términos de  $x_2$  aparecen en 2ª y 3ª posición en la ecuación.
- ✓ La respuesta no es lineal ya que varía la forma de la superficie curvada a medida que varía la concentración de  $\text{NO}_3^-$  debido a la importancia del término cuadrático de  $x_2$  en el modelo de regresión.
- ✓ Para el valor más alto de concentración de nitratos ( $x_2=1.68$ ) se obtiene un valor de biomasa de 14,19 g/L. Cuando se disminuye la concentración de nitratos a niveles 1, 0, -1 y -1.68, disminuye hasta 4,68 g/L para el mínimo valor de concentración de nitratos ( $x_2=-1,68$ ).
- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_2$  con las otras dos variables ( $x_1$  y  $x_3$ ) se puede observar:

**$x_1x_2$ :** Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie con respecto al eje  $x_1$  va variando. Para valores altos de  $x_2$ , la mayor respuesta se obtiene para valores también altos de  $x_1$ . A medida que disminuye la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_2$ ) el máximo valor de respuesta se va desplazando lentamente hacia valores cada vez más pequeños de concentración de melazas. Al observar la menor concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_2=-1,68$ ) el máximo se ha desplazado a valores más o menos de 0 de la concentración de la fuente de carbono ( $x_1$ ). En la ecuación de regresión (ecuación 5) el término correspondiente a dicha interacción se encuentra en tercer lugar. Este análisis está de acuerdo con las

observaciones realizadas anteriormente al estudiar la influencia de la concentración de melazas.

$x_2x_3$ : A lo largo del eje  $x_3$  la forma de la superficie varía levemente pasando de una forma prácticamente plana a valores elevados de  $x_2$  y curvándose posteriormente a medida que disminuye el valor de la concentración de nitratos ( $x_2$ ) mostrando la mayor curvatura a niveles próximos entre -1 y -1,68. Esta leve variación se recoge en la ecuación matemática de regresión donde el término de interacción  $x_2x_3$  se ha situado en séptimo lugar por la poca influencia que tiene.

### c. Influencia de la concentración de fosfatos ( $X_3$ ):

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.9, serie c, en la que se representan en cinco gráficas la producción de biomasa (g/L) ( $Y_1$ ) frente a los niveles codificados de concentración de melazas ( $x_1$ ) y concentración de nitratos ( $x_2$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, +1 y +1,68).

- ✓ La forma de la respuesta es prácticamente igual a medida que varía la concentración de  $PO_4^{3-}$ . Esto queda corroborado por la posición de los términos de  $x_3$  en el modelo de regresión, apareciendo el término cuadrático  $x_3^2$  en penúltimo lugar y el término lineal  $x_3$  en último, debido a la poca influencia que posee esta variable sobre la producción de biomasa. La respuesta no es lineal, variando la forma de la superficie curvada de forma leve a medida que varía la concentración de fosfatos. De hecho, la influencia del término cuadrático  $x_3^2$  es menor que la de las variables  $x_1$  y  $x_2$  tal y como se observa en la ecuación de regresión del modelo.
- ✓ Para el valor más alto de concentración de  $PO_4^{3-}$  ( $x_3=1,68$ ) se obtiene un valor máximo de biomasa de 12,13 g/L. Cuando se disminuye al nivel 0 de concentración de fosfatos, la biomasa aumenta ligeramente hasta 14,18 g/L y posteriormente empieza a disminuir alcanzando un valor de

12,85 g/L para el mínimo valor de concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  ensayado ( $x_3 = -1,68$ ).

En este caso podemos comprobar que la concentración de fosfatos no influye prácticamente en la producción de biomasa, siempre dentro de los límites estudiados.

- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_3$  con las otras dos variables ( $x_1$  y  $x_2$ ) se puede observar:

**$x_1x_3$ :** Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie con respecto al eje  $x_1$  prácticamente no cambia para distintos valores de  $x_3$ . Esto queda evidenciado en el modelo de regresión ya que este término figura en octavo lugar en la ecuación de regresión.

**$x_2x_3$ :** A lo largo del eje  $x_2$  la forma de la superficie varía levemente, cambiando primordialmente la curvatura, siendo la máxima hacia valores centrales de  $x_3$  (0). Esta leve variación se recoge en la ecuación de regresión donde el término de interacción  $x_2x_3$  se ha situado en séptimo lugar por la poca influencia que posee corroborando lo que se había observado anteriormente en la serie b de gráficas de las superficies de respuesta.

De esta manera, una vez realizado el análisis de las diferentes superficies de respuesta, se puede destacar:

- a. Las variables que más influyen en la producción de biomasa ( $Y_1$ ) son la concentración de la fuente de carbono ( $x_1$ ) y la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_2$ ), hecho que se pone de manifiesto por los diferentes valores máximos de biomasa que se obtienen a distintos niveles.
- b. Estas dos variables influyen de forma cuadrática, ya que a medida que se van variando los niveles de cada una de ellas, las superficies de respuesta se van curvando cada vez más.

- c. La variable concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $x_3$ ) es la que menos influye en la respuesta  $Y_1$ , dentro del rango de concentraciones de fosfatos ensayado.
- d. La poca influencia que posee la concentración de fosfatos se muestra también de forma cuadrática si bien es poco apreciable.
- e. La interacción concentración de melazas-concentración de nitratos ( $x_1x_2$ ) es la más importante influyendo, no solamente en el valor máximo de respuesta, sino también en la forma y la posición relativa de la curva (ésta sube y baja, se desplaza de derecha a izquierda y además se curva más o menos).
- f. La interacción concentración de nitratos-concentración de fosfatos ( $x_2x_3$ ) es muy poco significativa, es muy leve.
- g. La interacción concentración de melazas-concentración de fosfatos ( $x_1x_3$ ) es tan poco significativa que el programa de ajuste de regresión la sitúa en último lugar.

## Resultados y Discusión

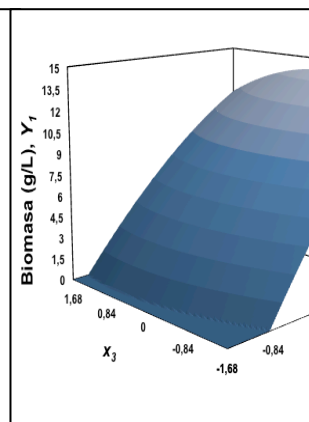
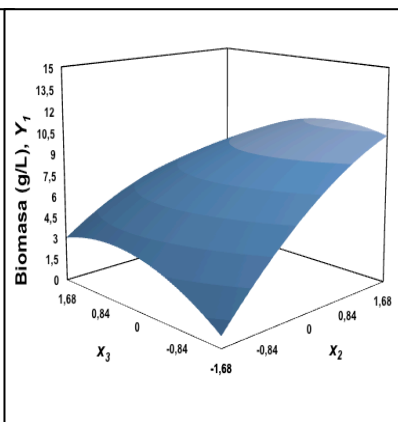
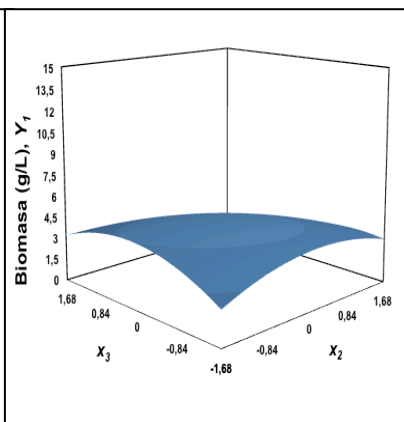
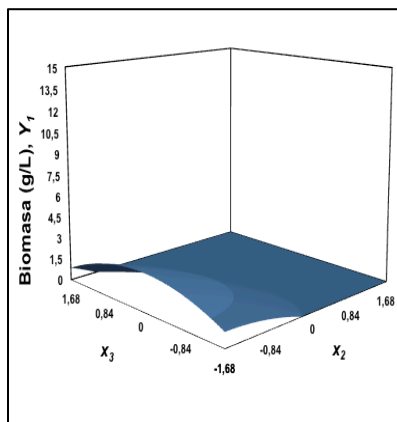
**Figura 4.9.** Gráfico de superficie de respuesta mostrando la concentración de Melazas ( $x_1$ ), concentración de nitratos ( $x_2$ ) sobre la producción de Biomasa ( $Y_1$ ) por *B. licheniformis* AL 1.1 según el modelo matemático ajustado completo. Serie a) (concentración de nitratos), c) (concentración de fosfatos).

Serie a)  $x_1 = -1,68$

$x_1 = -1$

$x_1 = 0$

$x_1 = 1$

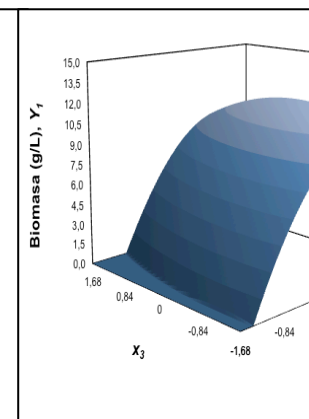
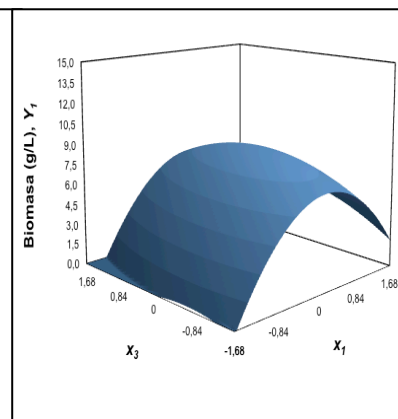
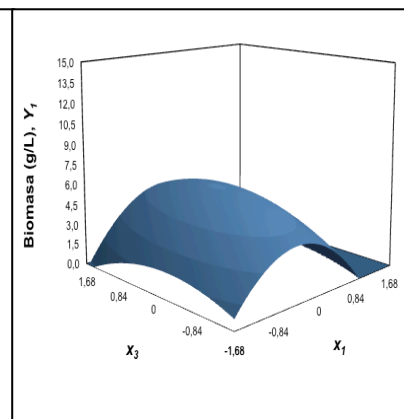
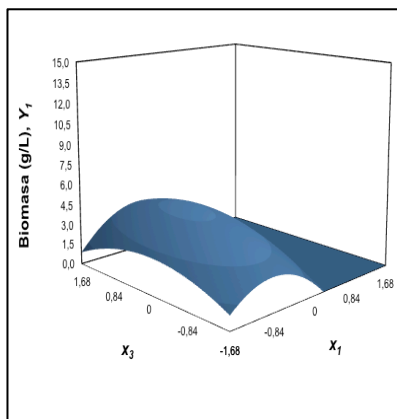


Serie b)  $x_2 = -1,68$

$x_2 = -1$

$x_2 = 0$

$x_2 = 1$





**Resultados y Discusión**

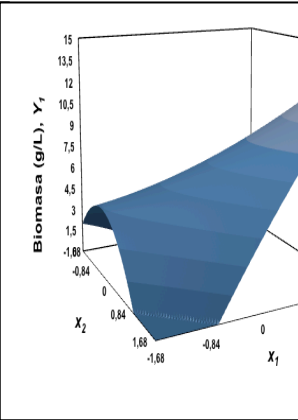
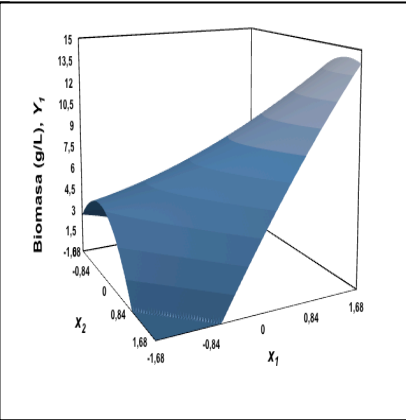
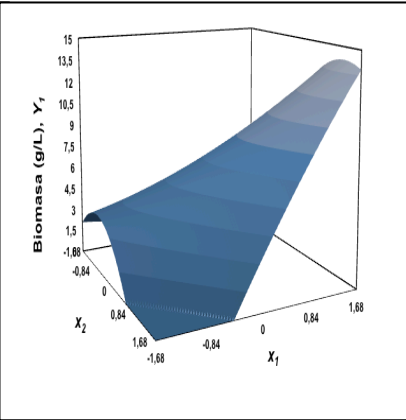
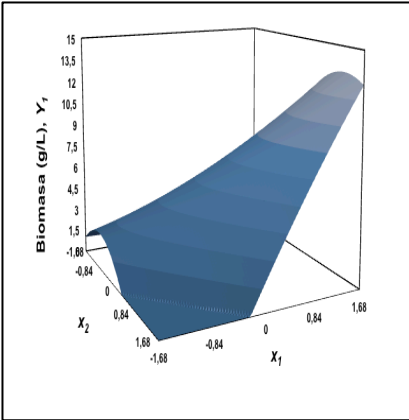
---

Serie c)  $x_3 = -1,68$

$x_3 = -1$

$x_3 = 0$

$x_3 = 1$



## Para la respuesta $Y_2$ , producción de $Lch_{AL1.1}$ (g/L) (Figura 4.10):

### **a. Influencia de la concentración de la fuente de carbono ( $x_1$ ):**

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.10, serie a, en la que se representan en cinco gráficas la producción de  $Lch_{AL1.1}$  (g/L) ( $Y_2$ ) frente a los niveles codificados de concentración de nitratos ( $x_2$ ) y concentración de fosfatos ( $x_3$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de Melazas ( $x_1$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, 1 y 1,68).

- ✓ La respuesta  $Y_2$ , producción de  $Lch_{AL1.1}$ , cambia sensiblemente a medida que varía la concentración de melazas. Así, puede observarse que  $Y_2$  aumenta con la concentración de la fuente de carbono hasta alcanzar un máximo, cuando el nivel es cercano al centro ( $x_1=0$ ), descendiendo al seguir aumentando esta concentración. Esta variación de la producción es muy acusada indicando que la influencia de la concentración de melazas sobre la producción de  $Lch_{AL1.1}$  es muy importante tal y como se observó en la ecuación polinomial donde los términos de la variable  $x_1$  ocupaban el primer y quinto lugar en la ecuación de regresión.
- ✓ La variación que sufre la respuesta  $Y_2$ , producción de  $Lch_{AL1.1}$ , no es lineal. Como se observa en las gráficas, la forma de la superficie es muy abrupta, con un pronunciado máximo en la zona central, debido a la importancia del término cuadrático  $x_1^2$  en el modelo de regresión, que ocupa el primer lugar.
- ✓ El valor máximo de respuesta que se obtiene en cada caso es diferente conforme varía la concentración de la fuente de carbono, si bien este cambio no es uniforme. El valor máximo de producción de  $Lch_{AL1.1}$  aumenta paulatinamente a medida que aumenta la concentración de la fuente de carbono, alcanzando un valor máximo de 3,19 g/L para una concentración de melazas intermedia ( $x_1=0$ ). Al aumentar  $x_1$  por encima del valor central, la producción de  $Lch_{AL1.1}$  disminuye, llegando a alcanzar un valor de 1,15 g/L para el nivel más alto ( $x_1=1,68$ ).

- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_1$  con las otras dos variables ( $x_2$  y  $x_3$ ) se puede observar:

$x_1x_2$ : Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie con respecto al eje  $x_2$  no es muy diferente. En todos los casos, el máximo valor de respuesta se obtiene para valores centrales de la concentración de nitratos ( $x_2=0$ ). Esta poca influencia de la interacción se pone de manifiesto en la ecuación de regresión (ecuación 6), puesto que el término correspondiente a dicha interacción se encuentra en último lugar.

$x_1x_3$ : A lo largo del eje  $x_3$  la forma de la superficie tampoco cambia apenas para distintos valores de  $x_1$ . Esto se evidencia en la ecuación de regresión donde este término de interacción aparece en sexto lugar.

Si comparamos los valores absolutos de los coeficientes de los términos  $x_1x_3$  y  $x_1x_2$  (Tabla A.6, Anexos 1) se puede observar que son iguales ( $\beta_{13}=-0,176$  y  $\beta_{12}=-0,166$ ) así como su error estándar (error estándar  $x_1x_2=x_1x_3= 0,06571$ ), lo cual indica que ambas interacciones deben tener la misma importancia relativa aunque el programa de ajuste los ha colocado en el orden anteriormente comentado.

#### **b. Influencia de la concentración de nitratos ( $X_2$ ):**

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.10, serie b, en la que se representan en cinco gráficas la producción de LchAL1.1 (g/L) ( $Y_2$ ) frente a los niveles codificados de concentración de melazas ( $x_1$ ) y concentración de fosfatos ( $x_3$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de nitratos ( $x_2$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, 1 y 1,68).

- ✓ La respuesta  $Y_2$  varía con la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_2$ ). La producción de Lch<sub>AL1.1</sub> aumenta al aumentar la concentración de nitratos hasta alcanzar un valor máximo para  $x_2=0$  y posteriormente disminuye al aumentar  $x_2$  del nivel 0 al nivel 1,68. Sin embargo este efecto no es tan

acusado como el que se produce en el caso de la concentración de melazas. Esto queda evidenciado en la ecuación de regresión del modelo, donde se observa que el término lineal de  $x_2$  no aparece y el término cuadrático se encuentra por detrás del de  $x_1$ .

- ✓ La respuesta no es lineal ya que varía la forma de la superficie curvada a medida que varía la concentración de  $\text{NO}_3^-$  debido a la importancia del término cuadrático  $x_2^2$  en el modelo de regresión, si bien aparece después de los términos cuadráticos de las variables  $x_1$  y  $x_3$ .
- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_2$  con las otras dos variables ( $x_1$  y  $x_3$ ) se puede observar:

**$x_1x_2$ :** Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie con respecto al eje  $x_1$  apenas varía. En la ecuación de regresión el término correspondiente a dicha interacción se encuentra en último lugar. Este análisis está de acuerdo con las observaciones realizadas al estudiar la influencia de la concentración de la fuente de carbono citadas anteriormente.

**$x_2x_3$ :** A lo largo del eje  $x_3$  la forma de la superficie tampoco varía apenas a medida que cambia  $x_2$ . Esto se recoge en la ecuación de regresión del modelo ya que el término de interacción  $x_2x_3$  no aparece.

### c. Influencia de la concentración de fosfatos ( $X_3$ ):

Esta influencia puede apreciarse en la Figura 4.10, serie c, en la que se representan en cinco gráficas la producción de LchAL1.1 (g/L) (Y2) frente a los niveles codificados de concentración de Melazas ( $x_1$ ) y concentración de nitratos ( $x_2$ ) manteniendo fijo el nivel de la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) en cada uno de sus niveles codificados estudiados respectivamente (-1,68, -1, 0, +1 y +1,68).

- ✓ La respuesta varía a medida que cambia la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$ . La producción de Lch<sub>AL1.1</sub> aumenta al aumentar la concentración de

fosfatos, alcanzando su valor máximo para el valor central de  $x_3 = 0$ . Esta influencia es menor que la ejercida por la fuente de carbono y mayor que la observada por la concentración de nitratos. Esto queda corroborado por la posición de los términos incluyendo  $x_3$  en el modelo de regresión, apareciendo después de los términos  $x_1$  y por delante de los de  $x_2$ .

- ✓ La respuesta no es lineal, ya que varía la forma de la superficie curvada siendo de mayor importancia el cambio en la curvatura de la superficie ( $x_3^2$ ) que no en la forma global de esta superficie ( $x_3$ ). De hecho, el término  $x_3^2$  es más influyente que el término  $x_3$ , apareciendo éste en cuarto lugar en la ecuación de regresión del modelo.
- ✓ La existencia de interacciones de la variable  $x_3$  con las otras dos variables ( $x_1$  y  $x_2$ ) se puede observar:

**$x_1x_3$ :** Comparando las 5 gráficas de la serie, la forma de la superficie a lo largo del eje  $x_1$  casi no varía para distintos valores de  $x_3$ . La interacción  $x_1x_3$  tiene la misma importancia relativa que  $x_1x_2$  como se puede observar en la ecuación de regresión por la similitud de coeficientes, error estándar y probabilidad.

**$x_2x_3$ :** A lo largo del eje  $x_2$  la forma de la superficie no varía apreciablemente. Esto se recoge en la ecuación de regresión donde el término de interacción  $x_2x_3$  no aparece.

Una vez realizado el análisis de las diferentes superficies de respuesta podemos destacar:

- a. Aunque las tres variables influyen en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  la variable que presenta una influencia más drástica es la concentración de melazas apreciándose en los diferentes valores de máximo de producción de  $Lch_{AL1.1}$  que se obtienen a distintos niveles de  $x_1$ .
- b. Las tres variables influyen de forma cuadrática ya que a medida que se van variando los niveles respectivamente las superficies de respuesta se van curvando más y más.

- c. Las interacciones concentración de fuente de carbono-concentración de nitratos ( $x_1x_2$ ) y concentración de fuente de carbono-concentración de fosfatos ( $x_1x_3$ ) influyen con similar importancia en la respuesta obtenida. Los coeficientes de dichos términos en la ecuación de regresión son del mismo orden de magnitud.
- d. De forma diferente a lo que ocurría en la ecuación de regresión del modelo para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) en este caso la interacción concentración de nitratos concentración de fosfatos ( $x_2x_3$ ) no influye.

## Resultados y Discusión

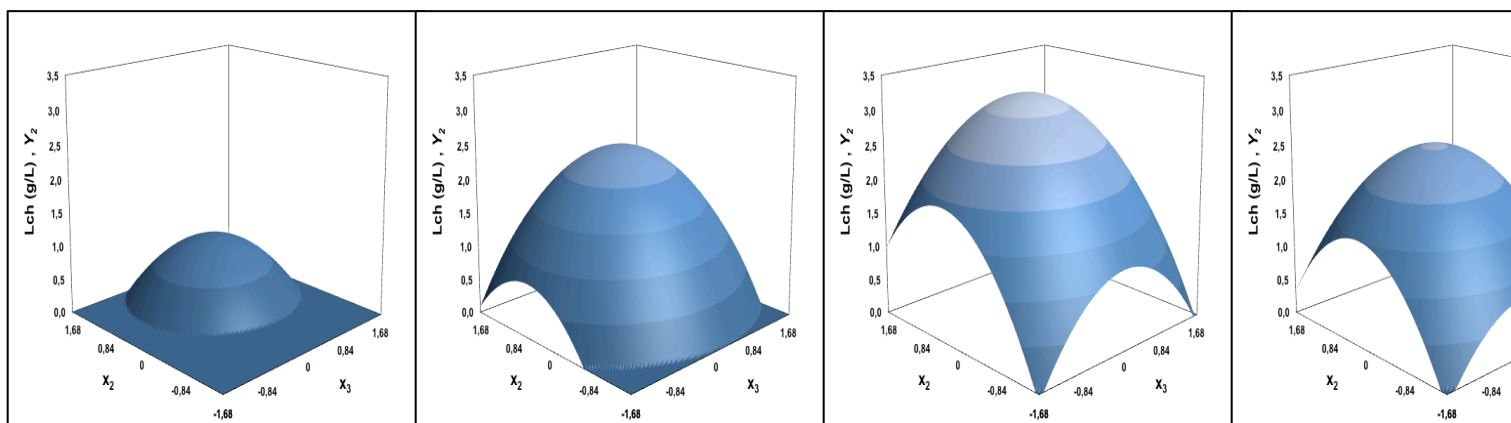
**Figura 4.10.** Gráfico de superficie de respuesta mostrando la concentración de melazas( $x_1$ ), concentración de nitratos ( $x_2$ ), y producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *B. licheniformis* AL 1.1 según el modelo matemático ajustado completo. Serie a, (concentración de nitratos), c (concentración de fosfatos).

Serie a )  $x_1 = -1,68$

$x_1 = -1$

$x_1 = 0$

$x_1 = 1$

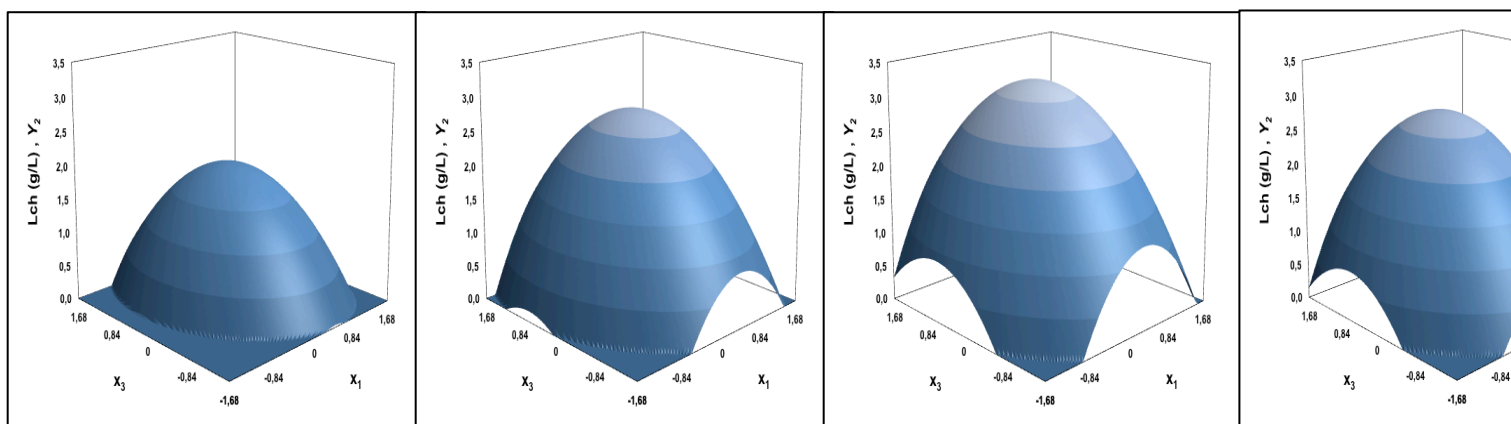


Serie b )  $x_2 = -1,68$

$x_2 = -1$

$x_2 = 0$

$x_2 = 1$



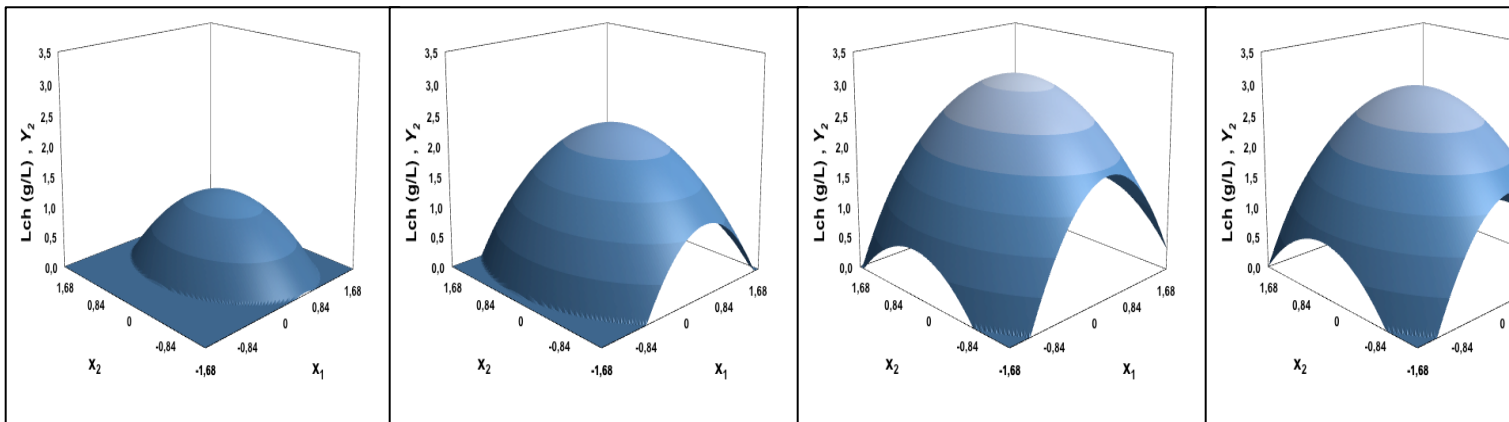
## Resultados y Discusión

Serie c)  $x_3 = -1,68$

$x_3 = -1$

$x_3 = 0$

$x_3 = 1$





#### 4.2.1.8 Obtención de los valores óptimos

Una vez realizado el análisis matemático – estadístico y gráfico de las superficies de respuestas, se ha obtenido un conocimiento global del compartimiento de las variables estudiadas en los rangos establecidos. La aplicación de la MSR, además de proporcionar información sobre el sistema permitió encontrar un conjunto de condiciones óptimas, de los factores estudiados que permiten encontrar valores máximos tanto en la producción de biomasa y producción de  $Lch_{AL1.1}$ .

El programa *Essential Regression* (ER) posee una herramienta llamada *Optimize* que nos permite determinar los valores máximos y mínimos de una función haciendo uso de la macro de *Solver*. Utilizando esta herramienta se logró determinar los valores óptimos de concentración de Melazas ( $X_1$ ), concentración de  $NO_3^-$  ( $X_2$ ), y concentración de fosfatos  $PO_4^{3-}$  ( $X_3$ ) que maximizan las funciones respuestas, producción de biomasa  $Y_1$  y producción de  $Lch_{AL1.1}$   $Y_2$ , respectivamente por *B. licheniformis* AL1.1, dentro de los intervalos de concentraciones utilizado en el diseño de experimentos.

A partir del modelo para la respuesta  $Y_1$ , producción de biomasa (g/L) (Ecuación 5), se obtiene el óptimo matemático, en valores codificados de cada una de las variables, calculado mediante la aplicación del programa ER y la macro Solver, dentro del intervalo estudiado fue:

**Tabla 4.8.** Valores óptimos para máxima producción de biomasa y valor predicho de biomasa en esas condiciones.

Variable	Valor óptimo
$X_1$	1,33
$X_2$	1,68
$X_3$	-0,31
Valor máximo predicho (g/L)=14,45	

Como se puede observar en la Tabla 4.8, los valores codificados de las variables se encuentran dentro del intervalo estudiado (1,68 y -1,68). En la Figura 4.11, se puede apreciar el efecto de cada una de las variables en la producción de biomasa, cuando éstas se fijan en sus niveles óptimos;

- a. Así pues cuando fijamos el valor óptimo de  $x_1=1,33$ , se puede apreciar el efecto de la concentración de nitratos ( $x_2$ ), y de la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) sobre la producción de biomasa, En la Figura 4.11, serie a, se representa la producción de biomasa (g/L) versus los niveles codificados de la concentración de nitratos y concentración de fosfatos. Se puede apreciar claramente que para el nivel óptimo de concentración de melazas  $x_1=1,33$ , necesita de niveles altos de concentración de nitratos para favorecer la producción de biomasa. En lo que respecta a la concentración de fosfatos, ésta no tiene mayor influencia en la producción de biomasa, pero se puede observar que, a valores centrales de concentración de fosfatos, se obtiene la máxima respuesta para la producción de biomasa (14,45 g/L).

Como se observó tanto en la ecuación de regresión para la producción de biomasa como en el análisis de la superficie de respuesta, la interacción concentración de melazas-concentración de nitratos es la más importante teniendo en cuenta su significación estadística, esto lo podemos comprobar observando el gráfico ya que para niveles bajos de concentración de nitratos la producción de biomasa disminuye considerablemente. Se observa que la interacción con la concentración de fosfatos no influye demasiado en la producción de biomasa.

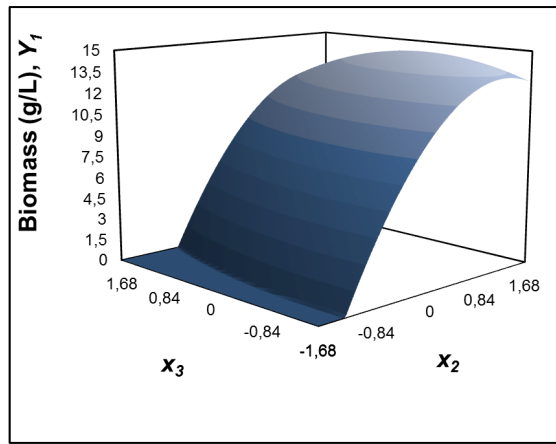
- b. Cuando fijamos el valor de  $x_2=+1,68$  el valor óptimo de concentración de nitratos, se puede apreciar el efecto de la concentración de melazas ( $x_1$ ), y la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) sobre la producción de biomasa. En la Figura 4.11, serie b, se representa la biomasa frente a los niveles codificados para la concentración de melazas y concentración de fosfatos. Como se puede observar en la gráfica, valores altos de concentración de melazas favorecen la producción de biomasa, pero

cuando se aumenta la concentración por encima del óptimo  $x_1=1,33$  el valor de la biomasa presente una ligera disminución. En esta gráfica podemos notar nuevamente la importante interacción de estas dos variables ( $x_1$  y  $x_2$ ), ya que la máxima producción de biomasa ocurre para valores altos tanto de la concentración de melazas como de la concentración de nitratos.

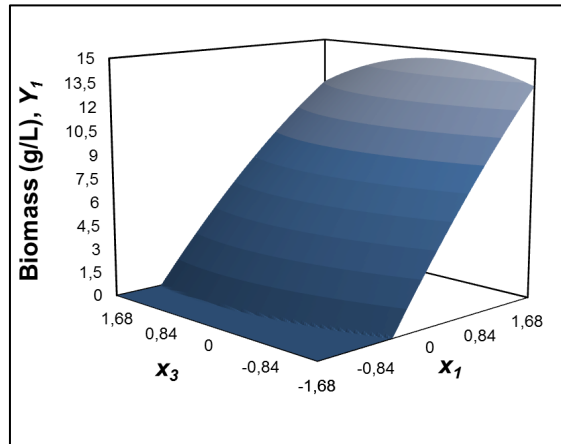
- c. Como se ha comentado anteriormente, la concentración de fosfatos no representa un factor de relevante importancia para la producción de biomasa, pero a pesar de esto, el valor máximo predicho para la producción de biomasa de 14,45 g/L, se obtiene para concentraciones de fosfatos  $x_3=-0,31$ . Las interacciones de esta variable con  $x_1$  y  $x_2$  son de menor importancia que la interacción  $x_1x_2$ .

Con respecto a la producción de biomasa, Saimmai *et al.*, (2011) publicaron que el incremento en las concentraciones de melazas (10 hasta 100 g/L) se refleja, en un aumento del crecimiento microbiano para cepas de *B. licheniformis* TR7 y *B. subtilis* SA9. Esto es consistente con lo que hemos encontrado en nuestro trabajo, donde se comprobó que la producción de biomasa se favorece con altas concentraciones de melazas, hasta que se alcanza el valor máximo (180 g/L), por encima de este valor, el crecimiento microbiano disminuye. Además, en las condiciones óptimas de producción de biomasa, *B. licheniformis* AL1.1 no sintetiza Lch<sub>AL1.1</sub>, esto confirma que no se puede establecer una relación entre el crecimiento microbiano y la producción de Lch<sub>AL1.1</sub>, como si ocurre para la producción de BT a partir de bacterias probióticas (Rodrigues *et al.*, 2006). Este resultado sugiere que la producción Lch<sub>AL1.1</sub> no está asociada solamente a la fase de crecimiento.

a)  $x_1 = 1,33$



b)  $x_2 = 1,68$



c)  $x_3 = -0,31$

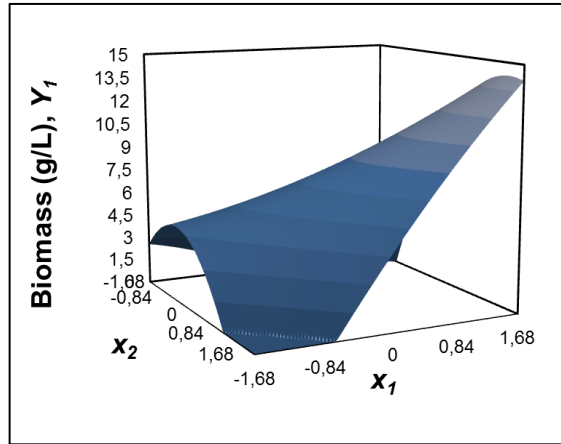


Figura 4.11. Niveles óptimos para la producción de biomasa ( $Y_1$ )

Para los rangos establecidos hemos obtenido las concentraciones óptimas de producción de biomasa, en la Figura 4.11, serie b, donde se mantiene  $x_2 = 1,68$  constante se puede apreciar claramente como al llegar a un

punto máximo, la producción de biomasa presenta una ligera disminución, confirmado de esta manera que los rangos establecidos para el estudio fueron los adecuados. Las variables codificadas se tradujeron a sus valores reales, obteniéndose de esta forma los valores de concentración (g/L) (Tabla 4.9) que permiten la obtención de la máxima producción de biomasa ( $Y_1 = 14,45$  g/L).

**Tabla 4.9.** Condiciones óptimas para la producción de biomasa ( $Y_1$ )

Variable	Valor óptimo real (g/L)
$X_1$	180,21
$X_2$	12
$X_3$	7,5

Para la respuesta  $Y_2$ , producción de  $L_{ch_{AL1.1}}$  (g/L) (Ecuación 6) el óptimo matemático, en valores codificados de cada una de las variables, calculado mediante la aplicación del programa ER y la macro Solver, dentro del intervalo estudiado fue:

**Tabla 4.10.** Condiciones óptimas para máxima producción de  $L_{ch_{AL1.1}}$  y valor predicho de  $L_{ch_{AL1.1}}$  en esas condiciones.

Variable	Valor óptimo
$x_1$	0,0515
$x_2$	-0,009
$x_3$	0,318
Valor máximo predicho (g/L) = 3,1985	

Como se puede observa en la Tabla 4.10, los valores codificados de las variables se encuentran dentro del intervalo estudiado (+1,68 y -1,68). En la Figura 4.12 se puede apreciar el efecto de cada una de las variables en la producción de  $L_{ch_{AL1.1}}$ , cuando éstas se fijan en sus niveles óptimos;

- En la Figura 4.12, serie a, cuando fijamos el valor óptimo de  $x_1 = 0,0515$ , se puede apreciar el efecto de la concentración de nitratos ( $x_2$ ), y de la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) sobre la producción. En esta gráfica se representa la producción de  $L_{ch_{AL1.1}}$  (g/L) versus los niveles codificados

de la concentración de nitratos y concentración de fosfatos. Se puede observar claramente que para el nivel óptimo de concentración de melazas  $x_1=0,0515$ , la máxima producción se favorece cuando los niveles tanto de la concentración de nitratos como la concentración de fosfatos se encuentra en torno a los valores centrales.

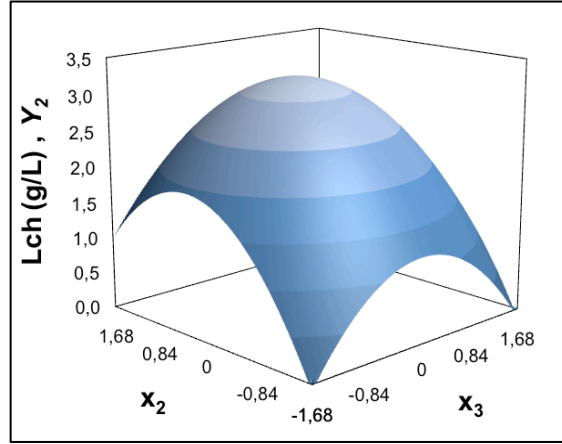
Cuando las valores de las concentraciones de nitratos y fosfatos se acerca al nivel cero, el valor máximo de producción de  $Lch_{AL1.1}$  que se obtiene esta alrededor de los 3 g/L. A pesar de que en el modelo de regresión polinomial, indica que existen interacciones significativas ( $x_1x_2$ ,  $x_1x_3$ ) para la producción, gráficamente no se pueden apreciar tan claramente como si se han comentado las que existen para la producción de biomasa.

- b. Cuando fijamos el valor de  $x_2=-0,009$  (Figura 4.12, serie b), el valor óptimo de concentración de nitratos, se puede apreciar el efecto de la concentración de melazas ( $x_1$ ), y la concentración de fosfatos ( $x_3$ ) sobre la producción de  $Lch_{AL1.1}$ . En la gráfica se representa esta producción frente a los niveles codificados para la concentración de melazas y concentración de fosfatos. Como se puede observar, valores centrales de concentración de melazas al igual que valores centrales de concentración de fosfatos favorecen la máxima producción, es decir para  $x_1=0,0515$  y  $x_3 =0,318$  se obtiene el máximo valor de  $Lch_{AL1.1}$  (valor predicho 3,1985 g/L). De igual forma, las interacciones entre el valor óptimo de concentración de nitratos con las otras dos variables son poco apreciables gráficamente.
- c. Por último al mantener la concentración de fosfatos en su nivel óptimo constante  $x_3=0,318$  (Figura 4.12, serie c), la máxima respuesta se obtiene para valores de  $x_1=0,0515$  y  $x_2=-0,009$ , obteniendo el mayor valor predicho por el modelo de regresión que es  $Y_2= 3,1985$  g/L.

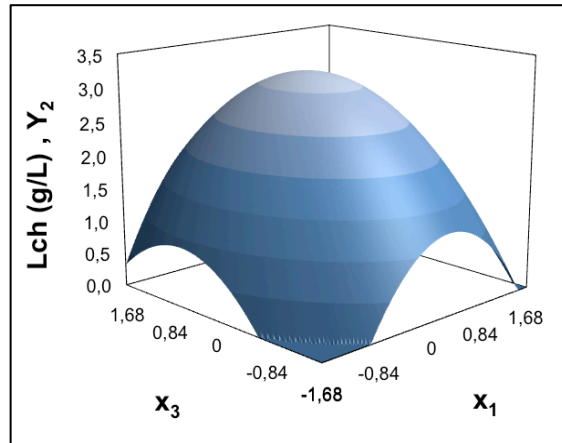
En lo referente a las interacciones de esta variable con  $x_1$  y  $x_2$ , en el primer caso sabemos que existen porque forman parte del modelo de regresión, pero gráficamente no son apreciables, en cambio la interacción  $x_2x_3$

no tiene ninguna significación para el modelo de regresión por eso no forma parte de la ecuación. Para la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , a diferencia que para la producción de biomasa, hemos encontrado los valores óptimos cercanos al punto central, como se puede observar en las gráficas, esto indica que hemos logrado seleccionar adecuadamente los rangos para el análisis.

a)  $x_1=0,0515$



b)  $x_2 = -0,009$



c)  $x_3 = 0,31$

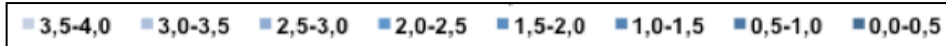
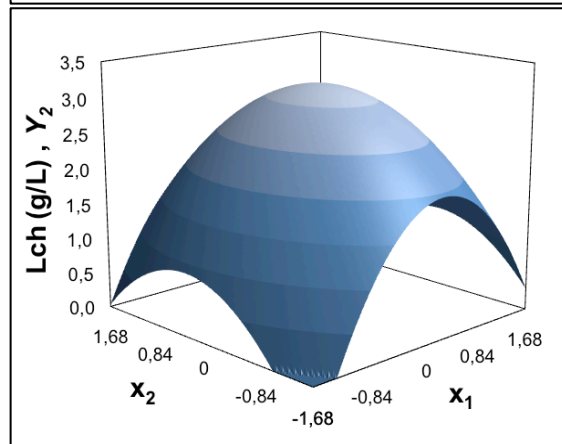


Figura 4.12. Niveles óptimos para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ )

Para finalizar presentamos los valores reales (Tabla 4.11) para cada una de las variables codificadas, obteniéndose de esta forma los valores de concentración (g/L) que permiten la obtención de la máxima producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2= 3,1985$  g/L).

**Tabla 4.11.** Condiciones óptimas para la producción de  $Lch_{AL1.1}$

Variable	Valor óptimo real (g/L)
$X_1$	107,82
$X_2$	6,43
$X_3$	9,7

De igual manera, se ha reportado concentraciones óptimas de melazas (40 g/L) para la producción de lipopéptidos por *B. licheniformis* TR7 y *B. subtilis* SA9 (Saimmai et al., 2011). Algunos investigadores utilizaron valores cercanos a los 70 g/L, de melazas para la producción de lipopéptidos por *B. subtilis* y *B. HS3 20 B*, además indican que concentraciones por encima de los 90 g de melazas/L conducen a una inhibición de la producción de lipopéptidos (Joshi et al., 2008a). En nuestro trabajo la concentración óptima de melaza fue de 107,82 g/L (producción de  $Lch_{AL1.1}$ ), tres veces más de lo que se ha reportado por otros autores. Nuestra hipótesis para explicar la diferencia, esta relacionada con la diferente composición de las melazas que se utilizan, ya que estas podrían cambiar dependiendo de factores como las condiciones bajo las cuales se cultiva, además del tipo de la fuente de la cual se obtienen (caña de azúcar o de palmera frutal). Sin embargo, es claro que cuando la concentración de melazas se incrementa por encima de su valor óptimo (107,82 g/L) la producción de  $Lch_{AL1.1}$  disminuye (Figura 4.12 a). Confirmando que a concentraciones altas de melazas la producción de  $Lch_{AL1.1}$  se inhibe, ya que favorece el crecimiento microbiano de AL 1.1.

En lo que respecta a la adición de sales de  $NO_3^-$  y  $PO_4^{3-}$  al medio de cultivo, tal como se mencionó antes, son componentes necesarios tanto para el crecimiento de *B. licheniformis* AL 1.1 y la producción de  $Lch_{AL1.1}$ .

Analizando la fuente de nitrógeno, si consideramos el modelo de



regresión para la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , encontramos que la fuente de nitrógeno ( $NaNO_3$ ) no afecta significativamente su producción, recalcando que esto ocurre dentro de los intervalos estudiados. Este resultado es remarcable ya que el producto resultante es un lipopéptido. Sin embargo, al ver la Figura 4.12b ligeramente se observa que el aumento o la disminución de esta variable conduce a cambios en la producción de  $Lch_{AL1.1}$ . Varios investigadores han demostrado que cuando *B. subtilis* se cultiva en medios pobres en nitrógeno, la producción de biosurfactante se inhibió (Das y Mukherjee, 2007).

En nuestro caso la producción no se inhibe para concentraciones bajas de  $NaNO_3$  esto puede ser debido a la naturaleza de la melazas, que pueden además de aportar carbohidratos también puede contener restos de proteína que pueden ser utilizados para la producción del lipopéptido. Para la producción de biomasa en cambio la fuente de  $NaNO_3$  fue esencial para el crecimiento de *B. licheniformis* AL 1.1.

Finalmente, en cuanto a las sales de fosfatos, estas ejercen un efecto tampón, manteniendo un pH adecuado tanto para el crecimiento de *B. licheniformis* AL1.1 y la producción de  $Lch_{AL1.1}$ .

#### **4.2.1.9 Validación experimental de los modelos**

Una vez finalizada la etapa de obtención de modelos, se finalizó el proceso con la realización de experimentos de verificación para validar los resultados obtenidos bajo condiciones experimentales específicas. El objetivo de validar el modelo matemático, es demostrar que la ecuación polinomial obtenida, se ajusta y describe correctamente la función respuesta. De esta manera, la comprobación de cualquier modelo matemático no debe realizarse utilizando los mismos resultados experimentales que se emplearon para la construcción del mismo, sino a partir de nuevos experimentos, en condiciones escogidas al azar, dentro del intervalo o rango de concentraciones de validez del modelo. Los resultados experimentales obtenidos con estos nuevos puntos son comparados entonces con los valores predichos por el modelo en esas condiciones (Oh *et al.*, 1995). Por otro lado, la confirmación de los modelos predichos suele ser examinada también, y de forma más habitual, mediante

experimentos adicionales independientes, en las condiciones óptimas sugeridas en el proceso de optimización. Muchos autores utilizan este método de verificación en la MSR (Rodríguez-Carmona *et al.*, 2011). En este trabajo se realizaron los dos tipos de experimentos adicionales para estudiar la validez de los modelos descritos para la producción de biomasa y producción de  $Lch_{AL1.1}$ : primero, diez experimentos distribuidos dentro del rango de concentraciones experimentales y, por otro lado, se realizaron ensayos de validación de las condiciones óptimas para la obtención de la máxima producción de biomasa y producto.

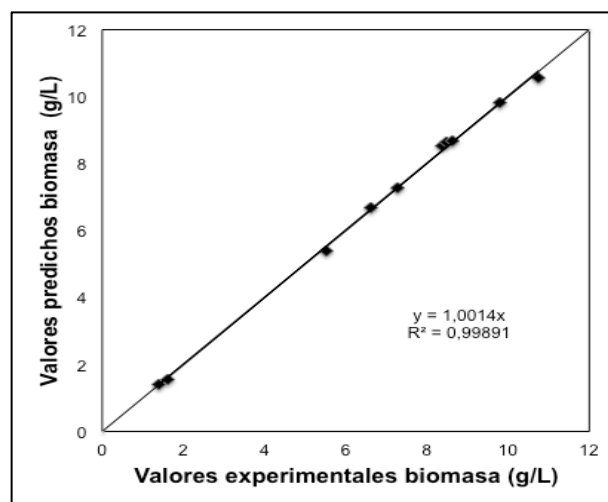
Las combinaciones de las variables en la comprobación de los modelos se exponen en la Tabla 4.12, en la que se muestran tanto los valores teóricos como los experimentales de las dos respuestas estudiadas. El programa Essential Regression (ER) posee una herramienta para predecir valores teóricos. Se introducen los valores de las variables y el programa proporciona el valor de la respuesta para un intervalo de confianza de 95%. Como se puede observar, los valores tanto para la producción de biomasa como producción de  $Lch_{AL1.1}$ , se encuentran dentro de los rangos estudiados, es decir que han sido seleccionados adecuadamente ya que están distribuidos a lo largo de todo el rango experimental.

En las gráficas (Figura 4.13 y Figura 4.14), se han representado los valores teóricos frente a los experimentales, tanto para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) como para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ). En las dos Figuras se observa el grado de ajuste conseguido entre valores experimentales y teóricos  $Y_{i\text{ teórica}} = Y_{i\text{ experimental}}$ , con coeficientes de correlación de  $R^2=0,9989$  y  $R^2=0,9929$  para la producción de biomasa y  $Lch_{AL1.1}$ , respectivamente. Además, ambas pendientes son bastante cercanas a la unidad.

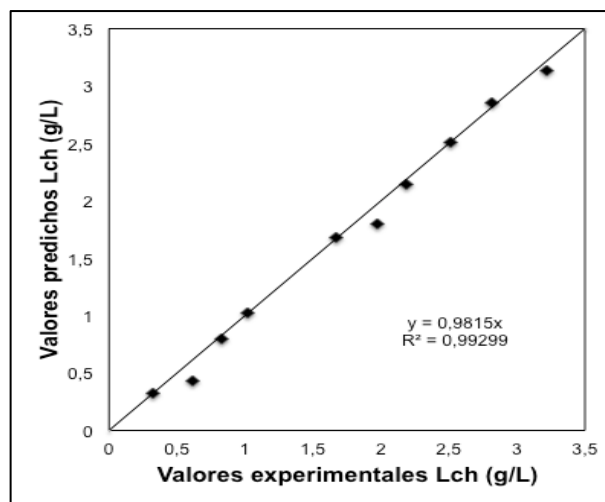
**Tabla 4.12.** Matriz experimental de comprobación del modelo de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) y producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *B. licheniformis* AL 1.1.

Valores codificados de las variables			Valores reales de las variables (g/L)			$Y_1$ , exp. Biomasa media (g/L)	$Y_1$ , predicha Biomasa predicha (g/L)	$Y_2$ , exp. $Lch_{AL1.1}$ (g/L)	$Y_2$ , predicho $Lch_{AL1.1}$ (g/L)
$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$				
0,5	0,5	0,5	133,28	8,14	10,43	9,79	9,824	2,81	2,85
-1,68	0,5	0	10	8,14	8,5	1,38	1,409	0,32	0,327
0,2	0	0	116,31	6,5	8,5	8,37	8,521	3,22	3,138
0	1	1	105	9,77	12,37	8,64	8,688	2,51	2,512
1,5	1	1	189,83	9,77	12,37	10,75	10,56	0,62	0,432
0,5	0,5	-1,68	133,28	8,14	2	8,49	8,63	1,02	1,02
1	0	-1,68	161,55	6,5	2	5,51	5,391	0,83	0,8
1	0	-1	161,55	6,5	4,63	6,63	6,681	1,97	1,8
1	-1,2	1	161,55	2,58	12,37	1,61	1,566	1,67	1,684
1	0	1	161,55	6,5	12,37	7,28	7,276	2,19	2,14

Estos resultados confirman que los modelos de regresión obtenidos en el presente trabajo, resultaron adecuados para predecir, tanto la producción de biomasa como la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , en función de las concentraciones de los tres componentes ensayados del medio de cultivo en el rango experimental estudiado.



**Figura 4.13.** Gráfica de correlación biomasa predicha/biomasa experimental. Comprobación del modelo de regresión para la producción de biomasa,  $Y_1$ , por *B. licheniformis* AL 1.1.



**Figura 4.14.** Gráfica de correlación  $Lch_{AL1.1}$  predicho/  $Lch_{AL1.1}$  experimental. Comprobación del modelo de regresión para la producción de biomasa,  $Y_1$ , por *B. licheniformis* AL 1.1.

#### 4.2.1.10 Validación de las condiciones óptimas.

La comprobación experimental de las condiciones óptimas para la obtención de la máxima producción de biomasa y máxima producción de  $Lch_{AL1.1}$  por *B. licheniformis* AL 1.1, se realizaron en las mismas condiciones que los tratamientos de la matriz del diseño, pero fijando las tres variables estudiadas a la concentración para la cual la producción de biomasa  $Y_1$  y producción de  $Lch_{AL1.1}$  alcanza su valor máximo según los modelos de regresión. En las Tablas 4.13 y 4.14, se puede observar que, para las dos respuestas estudiadas, los valores predichos por los modelos de regresión son muy similares a los obtenidos experimentalmente. Además, en el caso de producción de biomasa el error cometido en la predicción teórica con respecto al experimental es, tan solo, del 5,5% y en la producción de  $Lch_{AL1.1}$  es de 0,35%.

**Tabla 4.13.** Comprobación de las concentraciones óptimas para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) por *B. licheniformis* AL 1.1.

Valores codificados de las variables			Valores reales de las variables (g/L)			$Y_1$ exp. Biomasa media (g/L)	$Y_2$ predicho Biomasa media (g/L)
$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$		
1,33	1,68	-0,31	180,21	12	7,3	13,69	14,45

El error que se presenta en la producción de biomasa, es debido a que en los valores óptimos de concentraciones de los componentes del medio, se observó que el microorganismos tiene la capacidad de sintetizar polisacáridos, lo que generó problemas en la medición de la biomasa. En cuanto a los valores óptimos para la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , el valor del error es muy pequeño, por lo que se puede asegurar que el modelo de regresión predice adecuadamente esta respuesta.

**Tabla 4.14.** Comprobación de las concentraciones óptimas para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *B. licheniformis* AL 1.1.

Valores codificados de las variables			Valores reales de las variables (g/L)			$Y_2$ exp. $Lch_{AL1.1}$ cruda media (g/L)	$Y_2$ predicho $Lch_{AL1.1}$ cruda media (g/L)
$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$		
0,05	-0,009	0,31	107,82	6,43	9,7	3,21	3,2

Finalmente en la Tabla 4.15 se presenta en resumen los medios utilizados para la optimización de la producción de BT. El medio MM1 es el punto de partida, en el estudio preliminar se trabajo empíricamente con el fin de conocer los componentes que favorecían la producción de BT. De este primer ensayo se obtiene el medio MM2 que además de conseguir un incremento en la producción de BT, el estudio nos permitió conocer que la cepa AL 1.1 tiene la capacidad de crecer utilizando solamente carbohidratos (menos lactosa) y

que con fuentes oleosas pierde su capacidad de producción. Este dato permite que al plantearnos la utilización de residuos agroindustriales se limiten la búsqueda de sustratos con aportaciones nutricionales similares. Una vez seleccionada la fuente alternativa se determinó los tres componentes esenciales para la producción de BT y la composición óptima se presenta en el medio MOM (Tabla 4.15).

**Tabla 4.15** Medios de cultivo utilizado para la producción de BT por AL 1.1.

<b>Medios de cultivo (g/L)</b>	
<b>Medio inicial (MM1)</b>	<b>Medio optimizado Melazas (MOM)</b>
Glucosa, 10; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 4; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5,7; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,01; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,14; CaCl <sub>2</sub> 7x10 <sup>-6</sup> ; solución de oligoelementos, 0,05 mL	Melazas 107,82; NaNO <sub>3</sub> , 6,43; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4; Na <sub>2</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5,7.

Como se puede ver, se obtiene un medio más simple y el hecho de ser a partir de un residuo agroindustrial lo convierte en económico. Pero también en términos de producción de BT hay un incremento considerable que puede observarse en la Tabla 4.16

**Tabla 4.16** Datos de producción de BT obtenidos de los diferentes medios utilizados.

<b>Parámetro</b>	<b>Medio inicial</b>	<b>Medio diseñado</b>	
		<b>Teórico</b>	<b>Experimental</b>
BT (g/L)	0,21	3,19	3,2
Biomasa (g/L)	1,5	8,5	8,4
YP/X (g/g)	0,14	0,37	0,38
P(mg/Lh)	8,75	44,3	44,4

Es muy claro que los cambios en los medios de cultivo contribuyen favorablemente en la producción de BT. Al comparar el medio inicial (MM1) con el optimizado de melazas encontramos que la producción de BT se ha incrementado en aproximadamente 15 veces. También se confirma un incremento en el rendimiento celular y la producción volumétrica. Estos

resultados demuestran la importancia de la optimización de los componentes de los medios de cultivo. En nuestro trabajo hemos logrado darle un valor agregado a un sustrato de bajo coste.

#### 4.2.1.11 Curva de crecimiento

La cinética de producción de Lch<sub>AL1.1</sub> por *B. licheniformis* AL 1.1 en el medio óptimo de melazas (72 h cultivo) se presenta en la Figura 4.15. Se puede observar claramente que AL 1.1 presenta una fase log que va desde las 12 hasta las 36 h de cultivo y se observa un aumento en la producción de Lch<sub>AL1.1</sub> en relación con el crecimiento celular. Al mismo tiempo se produce un descenso paulatino de la tensión superficial de 52 hasta 35,6 mN/m. Luego de 48 h de incubación la tensión superficial alcanza el valor más bajo de 30 mN/m momento a partir del cual se detecta una acumulación notable de Lch<sub>AL1.1</sub> en el medio de cultivo. Este nivel de producción se mantiene incluso cuando se alcanza la fase estacionaria del crecimiento.

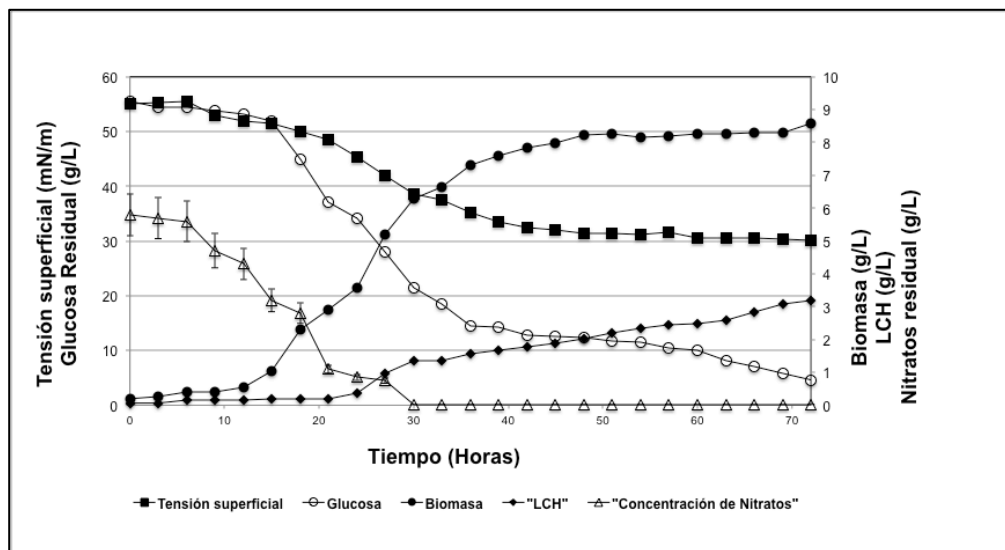


Figura 4.15. Curva de producción de Lch<sub>AL1.1</sub> por *B. licheniformis* AL 1.1. (Medio óptimo).

La producción de Lch<sub>AL1.1</sub> se mantuvo hasta las 72 h (fase estacionaria). Como se mencionó en la primera parte del trabajo, cuando AL 1.1 utiliza glucosa como fuente de carbono, la producción máxima se alcanza a las 24 h. La producción más lenta (72 h) puede estar relacionada con la asimilación y el

metabolismo de la melazas, que es más lento y difícil que la glucosa, al ser un azúcar simple y rápidamente disponible (Coronel-León *et al.*, 2015). La cinética de acumulación de Lch<sub>AL1.1</sub> por *B. licheniformis* AL 1.1, presenta un perfil de producción característico, parcialmente asociado al crecimiento bacteriano. En estos resultados queda claro que la acumulación de Lch<sub>AL1.1</sub> se inicia durante la etapa exponencial de crecimiento, siendo ésta máxima al inicio de la fase estacionaria. Nitschke y Pastore, (2006) describieron la biosíntesis de un TS en agua residual de yuca, cuya producción empieza en la fase exponencial y continúa durante la fase estacionaria, lo cual está en concordancia con nuestros resultados.

El consumo de melazas fue medido como glucosa residual, y queda claro que su asimilación está asociada con el crecimiento y la producción de Lch<sub>AL1.1</sub>, confirmando la importancia de este parámetro, tal como se describe en el análisis de la superficie de respuesta. De acuerdo con la Figura 4.15 los nitratos detectables se consumieron a las 30 h de cultivo. A pesar de ello tanto la producción de Lch<sub>AL1.1</sub> como el crecimiento continuaron incrementándose considerablemente. En el caso del crecimiento este proceso podría ser consecuencia de la utilización de fuentes nitrogenadas almacenadas durante el crecimiento inicial a nivel intracelular.

Otra posibilidad sería la contribución de nutrientes presentes (no cuantificados) en las melazas que juegan un papel importante para alcanzar los valores máximos de crecimiento y producción (3,2 g/L). A lo largo del crecimiento de AL 1.1 el valor pH (6-7) no cambió considerablemente, confirmando la importancia de los fosfatos como agente tampón.

Cuando *B. licheniformis* AL1.1 creció en las condiciones óptimas de producción de biomasa, fue posible incrementar la producción de 1,5 g/L hasta 13,69 g/L, representando un incremento de aproximadamente nueve veces comparado con el medio MM1. Con respecto a la producción de Lch<sub>AL1.1</sub> el aumento fue de aproximadamente 15 veces de 0,21 g/L hasta 3,20 g/L.



El valor de producción de 3,20 g/L de Lch<sub>AL1.1</sub> , es más alto que los 1,1 g/L estimados de liquenisina reportados para *B. licheniformis* R2 cuando crece en un medio mineral que contiene glucosa como fuente de carbono (Joshi *et al.*, 2008b), además nuestro medio es más simple. Otros investigadores como Nitschke *et a.*, (2006) reportaron que cuando *B. subtilis* LB5 utilizaba agua residual de yuca para la producción de lipopéptidos alcanzaban rendimientos de 3 g/L. Para una fuente de carbono diferente como el uso de melazas de dátiles, *B. subtilis* B20 producía 2,29 g/L de biotensioactivos (Al-Bahry *et al.*, 2013). Adicionalmente cuando Saimmai *et al.*, (2011) utilizaban melazas de caña de azúcar para la producción a partir de *B. licheniformis* TR7 y *B. subtilis* SA9, llegaron a valores de producción de 3,26 y 3,56 g/L respectivamente. Esto demuestra que los niveles de producción alcanzados en nuestras condiciones experimentales se encuentran de acuerdo a los datos publicados en la literatura especializada y en algunos de nuestros valores de producción son mayores.

**5. Caracterización de la estructura  
química del BT producido por *Bacillus  
licheniformis* AL 1.1**



## 5. Caracterización de la estructura química del BT producido por *Bacillus licheniformis* AL 1.1

El género *Bacillus* incluye varias especies de importancia industrial y tiene una evidencia histórica de su empleo inocuo en alimentos y en la industria. Productos como enzimas, antibióticos, aminoácidos y péptidos antifúngicos son hoy en día suministrados por diferentes casas comerciales. Se ha descrito para este género, la producción de BT, especialmente lipopéptidos (LP). Como ejemplos de estos productos podemos destacar a la surfactina, iturina y fengicina (Stein, 2005; Nagao *et al.*, 2006).

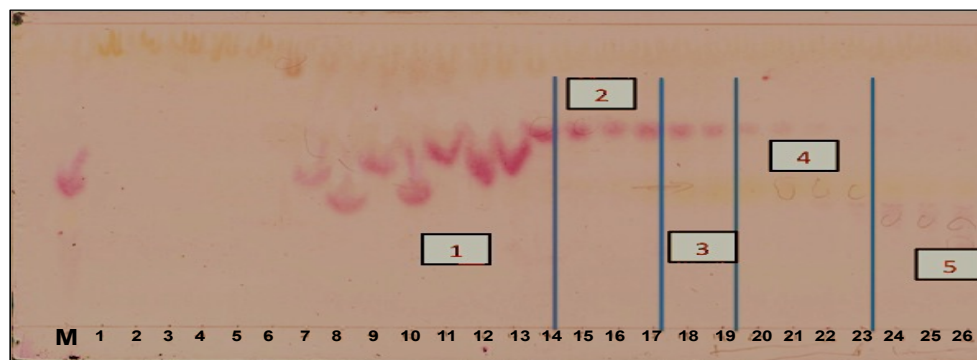
En la literatura, se puede encontrar información relacionada con la producción de LP a partir de diferentes cepas de *B. licheniformis*. Por ejemplo, Yakimov *et al.*, (1995), caracterizaron el LP producido por *B. licheniformis* BAS50 como Liquenisina A. Años más tarde, Grangemarda *et al.*, (1999) demostraron que *B. licheniformis* IM1307, sintetizaba un nuevo LP al que describieron como Liquenisina G. Trabajos más recientes demuestran la producción de un nuevo LP al que se ha caracterizado como liqueniformin producido por *B. licheniformis* MS3 (Biria *et al.*, 2010). Obviamente, el proceso de caracterización química es una etapa crucial en el estudio de BT, por lo que la siguiente fase del trabajo consiste en el estudio detallado de la estructura química del BT que produce *B. licheniformis* AL 1.1, tomando como hipótesis que el BT que produce es un lipopéptido.

Los métodos convencionales para caracterizar LP comienzan con las etapas de purificación tales como cromatografía en columna, y posterior análisis utilizando técnicas como Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS), Gases masas (GC-MS) o Resonancia magnética nuclear (RMN) (Li *et al.*, 2008).

## 5.1 Purificación del extracto orgánico obtenido del precipitado del sobrenadante (extracción S-L)

Una de las técnicas más utilizada para la purificación de BT es la cromatografía de adsorción en columna. Este procedimiento ha sido utilizado por otros grupos, como es el caso de Yakimov *et al.*, (1995). No obstante, también existen otros métodos como por ejemplo el empleado por Liu *et al.*, (2008). Dichos autores purificaron el LP producido por *B. subtilis* HSO 121 utilizando una columna de octadecilo (C18) acoplada a un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). Por otra parte, Biriá *et al.*, (2010) , para purificar Liqueniformina, utilizaron un sistema de electroflotación que genera burbujas en el seno de la disolución, mediante la reacción de electrólisis del agua provocada por la corriente eléctrica.

La purificación de BT se ha realizado por cromatografía de adsorción en columna, utilizando la misma fase móvil que se empleó para la TLC. Durante el proceso de purificación las fracciones recogidas fueron analizadas por TLC, y reveladas con reactivo de Molish. El análisis de las fracciones (Figura 5.1), nos permitió realizar 5 grupos de fracciones según su  $R_f$ . Las dos primeras fracciones son similares al compuesto mayoritario observado en la muestra total del extracto orgánico (Figura 5.1, muestra M) y se observa un producto con alta pureza. En las fracciones 3, 4 y 5 se evidencia la presencia de más de un producto.



**Figura 5.1.** Cromatografía en capa fina (TLC) del extracto orgánico. Revelado con reactivo de Molish.

Para determinar si alguna de las 5 fracciones poseía actividad superficial, se ha considerado el criterio descrito por Rosen, (2004) quien establece que un buen tensioactivo puede bajar la tensión superficial del agua de 72 hasta 35 mN/m. Los extractos de las fracciones similares se disolvieron en agua y se midió la tensión superficial. Solamente las fracciones 1, 2 y 3 cumplen con el criterio establecido por Rosen, ya que provocan el descenso de la tensión superficial del agua de 72 mN/m hasta 29,7, 33,2 y 35,1 respectivamente. Diversos valores de tensión superficial se han descrito para BT producidos por *Bacillus sp.* Uno de estos BT es surfactina que tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial hasta 28 mN/m (Peypoux *et al.*, 1999). La liquenisina A también es capaz de reducir la tensión superficial del agua alcanzando valores similares (Yakimov *et al.*, 1995).

Se realizó una nueva TLC para comprobar la pureza de las fracciones 1, 2 y 3. En la Figura 5.2 se puede observar que la fracción 1, la cual se definió como extracto orgánico purificado (EOP), presenta una mayor pureza en comparación con las otras fracciones, y que el mismo producto ( $R_f = 0,50$ ) que está presente en la fracción 1 se observa en las fracciones 2 y 3. El hecho de que el producto con propiedades tensioactivas ( $R_f = 0,50$ ), aparezca en las tres fracciones sugiere que los valores de tensión superficial alcanzados por las fracciones 2 y 3 sean en parte debidos al efecto de la fracción 1 (EOP). Los estudios siguientes sobre la caracterización química del tensioactivo se realizaron con el extracto orgánico purificado (EOP).



**Figura 5.2.** Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos obtenidos de la columna de purificación. EOP (Fracción 1), fracción 2 y fracción 3. Reactivo de Molish.

### 5.1.1 Determinación del peso molecular del extracto orgánico purificado por ionización por electrospray - Espectrometría de masas (ESI-MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que puede proporcionar información tanto cualitativa (estructura de la molécula) como cuantitativa (masa molecular) en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados.

Los espectros de masas del extracto orgánico purificado, obtenidos a partir de la aplicación de la técnica (ESI-MS), se pueden apreciar en la Figura 5.3 y 5.4. El espectro en modo positivo se presenta en la Figura 5.3, donde se observan varios iones, que corresponden al peso molecular de los componentes del extracto purificado. Se evidencia una serie de iones  $[M+H]^+$  a  $m/z$  993, 1007, 1021, 1035, con los correspondientes iones  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1015, 1029, 1043, 1057. Por otro lado en la Figura 5.4, se muestra el espectro que corresponde a la ionización en modo negativo, donde se pueden apreciar los iones moleculares desprotonados  $[M-H]^-$  con sus correspondientes valores de relación  $m/z$  991, 1005, 1019, 1033 y 1047, cuyos iones mayoritarios se encuentran a  $m/z$  1005, 1019 y 1033. Los iones mayoritarios tanto en modo positivo como negativo se corresponden (Tabla 5.1).

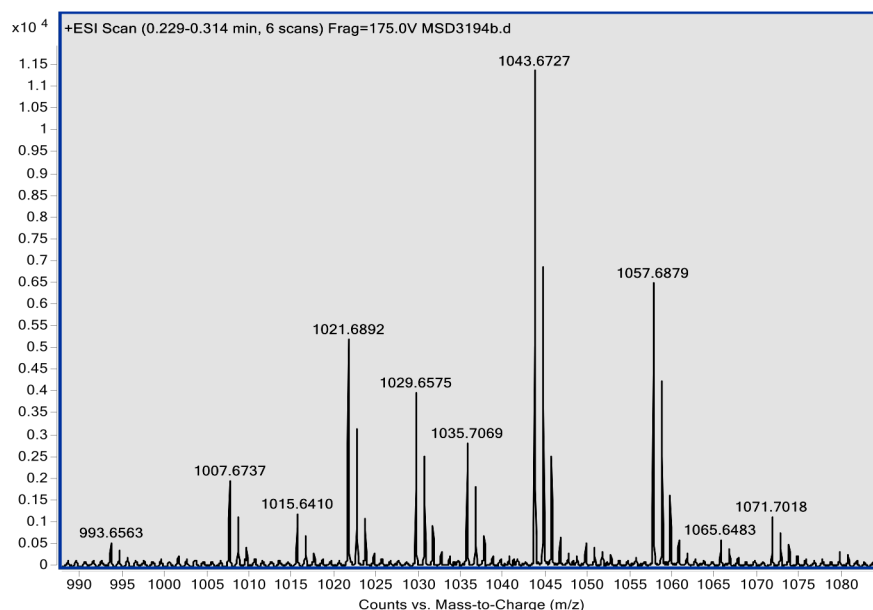


Figura 5.3. Espectro parcial de masas por electrospray en modo positivo

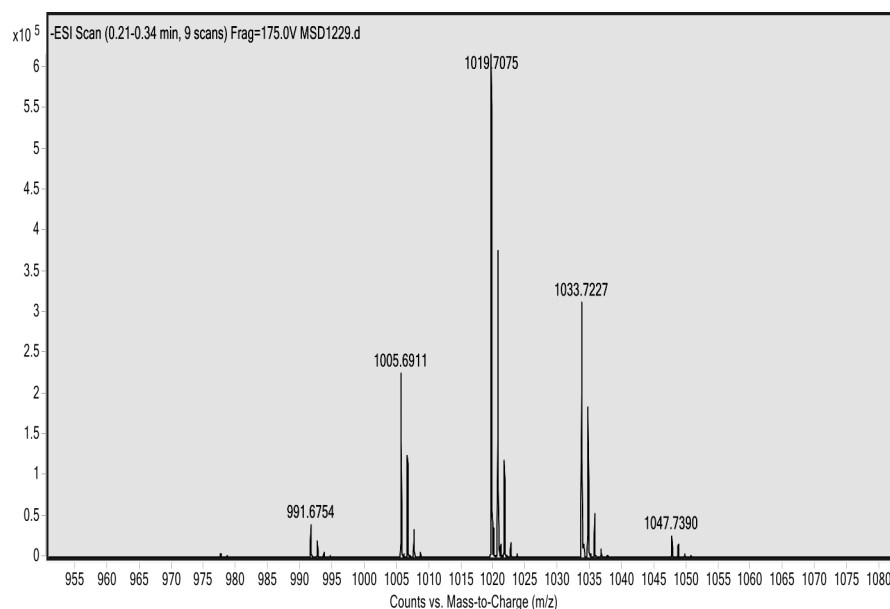
Estos iones mayoritarios corresponden a los pesos moleculares del extracto purificado ( $[M+Na]^+$  1029, 1043, 1057).

**Tabla 5.1.** Iones correspondientes en modo positivo y negativo.

<b>Iones</b>		
<b>MH<sup>+</sup></b>	<b>MNa<sup>+</sup></b>	<b>MH<sup>-1</sup></b>
993	1015	991
1007	1029	1005
1021	1043	1019
1035	1057	1033

Al analizar la relación entre los iones, podemos destacar que existe una diferencia entre cada ión de 14 unidades. Esto sugiere que el producto puede ser una mezcla de LP que pueden diferir en alguna parte de su estructura. Dentro de este contexto Liu *et al.*, (2008) encontraron el mismo patrón para surfactina producida por *B. subtilis* HSO 121, y ellos proponen que esta diferencia (14 unidades) puede ocurrir por las siguientes suposiciones: (i) diferencias en los grupos CH<sub>2</sub> de la cadena de ácidos grasos; (ii) diferencias en la parte peptídica, es decir un aminoácido se cambia y la diferencia de la masa molecular es exactamente 14, (iii) o, puede darse el caso de que un aminoácido sea metil esterificado en la parte peptídica, y que después el grupo hidroxilo en el residuo aminoacídico sea remplazado por el grupo metoxilo y como resultado la diferencia de la masa molecular podría ser de 14 unidades. Por lo tanto, la diferencia de 14 en el peso molecular no siempre significa que pueden ser homólogos de otro LP, sino que es necesario, analizar tanto la parte peptídica como el residuo del ácido graso.





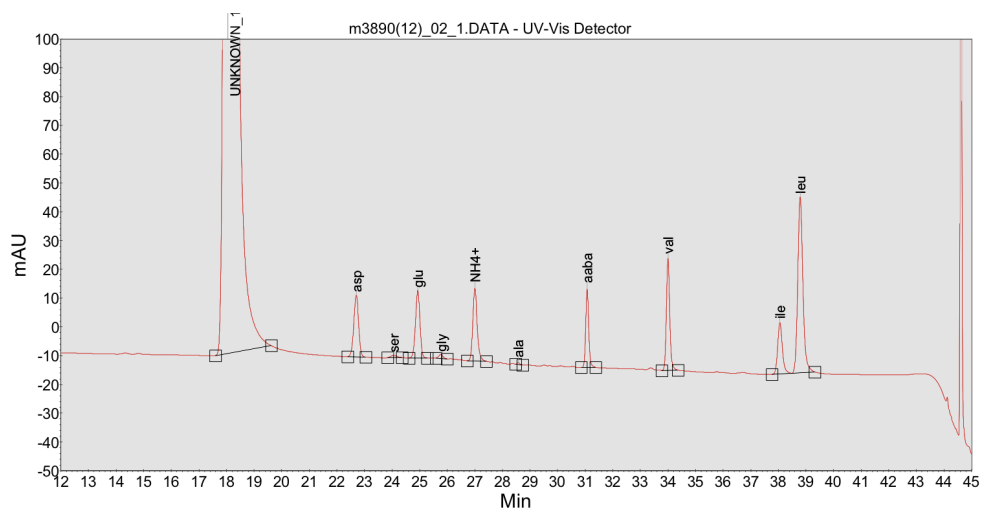
**Figura 5.4.** Espectro parcial de masas del EOP por electro spray modo negativo.

De acuerdo a la hipótesis que manejamos, existe una alta probabilidad de que *B. licheniformis* AL 1.1 produzca un BT del tipo lipopeptídico. Los pesos moleculares encontrados ( $[M+Na]^+$  1029, 1043, 1057) siguen avalando esta posibilidad. En un trabajo Li *et al.*, (2008) demuestran la capacidad de *B. licheniformis* HSN221 para producir diferentes lipopéptidos en función de las condiciones de cultivo y reportan que el peso molecular de liquenisina A es ( $[M+Na]^+$  1029, 1043, 1057) similar al encontrado en nuestro trabajo. Además al comparar con la surfactina ( $[M+Na]^+$  1030, 1044, 1058) también encontramos similitud (Arima *et al.*, 1968). Como se puede ver los LP son generalmente mezclas de compuestos homólogos. En este sentido Li *et al.*, (2012) indican que los LP son mezclas de isómeros que difieren ligeramente en sus propiedades físico-químicas. Dichas variaciones vienen dadas por modificaciones en su estructura tales como cambios en la ramificación y longitud de su componente hidrófobo, además de sustituciones entre los aminoácidos que conforman el anillo péptidico (parte hidrofílica). En este contexto una investigación realizada por el grupo de Pecci *et al.* (2010), quienes utilizan la técnica ESI-MS para caracterizar la surfactina producida por *B. licheniformis* V9T14, encuentran que los pesos moleculares de la surfactina son de  $[M+Na]^+$   $m/z$  1030, 1044, y 1058, por lo que al compararlos con los obtenidos en nuestro trabajo ( $[M+Na]^+$  1029, 1043, 1057) detectamos que

existe una diferencia de 1 unidad. Esta diferencia puede deberse a la presencia de un determinado aminoácido (Gln o Glu; Asp o Asn) que aporte una amida de cadena simple a la molécula de BT. Estos son cambios estructurales comunes que se presentan en LP. Dentro de los LP existe una considerable diversidad estructural, como consecuencia de las diferencias en el tipo, número y configuración de los aminoácidos en la cadena peptídica, así como en la longitud y tipo de ácido graso. Por ejemplo, diversas cepas de *B. subtilis* producen más de veinte moléculas diferentes, entre ellos, muchos LP y algún compuesto con actividades antibióticas (Christie, 2013).

### **5.1.2 Composición y estructura de la parte hidrofílica del extracto orgánico purificado**

Una muestra del extracto orgánico purificado fue hidrolizada, luego de realizar una extracción orgánica, se utilizó la fase acuosa y como resultado, se encontró que la parte hidrofílica o parte peptídica estaba compuesta por cinco aminoácidos: ácido aspártico o asparagina (Asx), ácido glutámico o glutamina (Glx), valina (Val), isoleucina (iLe) y leucina (Leu) (Figura 5.5). Bajo las condiciones de hidrólisis en las que hemos trabajado es difícil identificar a los siguientes aminoácidos: ácido aspártico o asparagina y ácido glutámico o glutamina ya que las condiciones de hidrólisis causan la ruptura de estos aminoácidos. El análisis por HPLC también permite conocer la proporción de los aminoácidos presentes en el EOP. Por lo que el resultado completo de la parte peptídica es la siguiente: Asx:Glx:Val:iLe:Leu con su respectiva proporción 1:1:1:1:3 (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Perfil de los aminoácidos presentes en la fracción acuosa del hidrolizado, y posterior derivatización con el 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidilo carbamato, analizados por HPLC.

Como se ha descrito anteriormente, los LP presentan una gran variedad de estructuras, el mejor conocido es la surfactina; del cual se ha determinado la composición de aminoácidos. Liu *et al.*, (2008) indicaron que la cabeza polar de surfactina producida por *B. subtilis* HSO 121, estaba compuesta de los siguientes aminoácidos: Asp:Glu:Val:Leu en proporciones 1:1:1:4. También se pueden encontrar diferencias estructurales entre LP producidos incluso en bacterias de la misma especie. Las aportaciones de Haniyavarn *et al.*, (2003) demostraron que a partir de *B. licheniformis* F2.2 se obtienen dos LP con diferente parte peptídica. Uno que contiene los siguientes aminoácidos Ala:Glu:iLe:Orn:Pro:Thr:Tyr en proporciones de 1:3:1:1:1:2 y el otro conformado por Glu:iLe:Orn:Pro:Thr:Tyr:Val en las siguientes cantidades 3:1:1:1:1:2:1. A pesar de estas variaciones, el LP que mayormente se asocia con *B. licheniformis* es la liquenisina que es un heptapéptido cíclico, cuya composición de aminoácidos es Asx:Glx:Val:iLe:Leu, similar a la que hemos obtenido en nuestro trabajo. Obviamente las posiciones en la secuencia peptídica y las proporciones dependen del tipo de liquenisina. Hasta el momento se han reportado las liquenisinas A (Yakimov *et al.*, 1995), B (Lin *et al.*, 1994), C (Jenny *et al.*, 1991), D (Konz *et al.*, 1999), G (Grangemarda *et al.*, 1999) y el tensioactivo BL86 (Horowitz *et al.*, 1990).

Después de determinar los aminoácidos presentes en la parte hidrofílica del extracto orgánico purificado, es importante conocer la secuencia en la cual

están ubicados dichos aminoácidos. Existen varias técnicas para conocer la secuencia de aminoácidos. Una de ellas es la aplicación de la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Esta técnica permite analizar la secuencia de aminoácidos sin necesidad de realizar una hidrólisis, pudiéndose utilizar el compuesto completo. Yang *et al.* (2006) determinaron la secuencia de aminoácidos de la surfactina producida por *B. subtilis* HSO121 utilizando dicha técnica. Estos autores describieron una metodología importante para el análisis de los residuos de aminoácidos presentes en las fragmentaciones que se obtienen de MS/MS de surfactina.

En nuestro trabajo de los espectros de masas obtenidos del análisis MS/MS de los iones moleculares sodio-ionizado (Figura 5.6) se han definido dos iones precursores (1057,7 y 1043,7), y a partir de estos se realizaron las fragmentaciones. A continuación, la principal tarea es determinar la conexión entre los residuos de aminoácidos en la cadena peptídica. Para ello se utilizó la diferencia de masas de los iones productos (fragmentaciones) que se analizan a continuación (Tabla 5.2, 5.3 y 5.4).

**Tabla 5.2.** Fragmentaciones comunes que se encuentran en el espectro de masas del ión precursor de 1057,7 (Componente 1) y del ión precursor 1043,7 (Componente 2).

<b>ión Precursor 1 (1057,7)</b>	<b>ión Precursor 2 (1043,7)</b>
701,5	701,5
657,5	657,5
594,4	594,4
481,3	481,3
382,2	382,2
267,2	267,2

Para un mejor entendimiento los definiremos como componente 1 que corresponde al ión precursor 1057,7 y componente 2 al que se refiere a 1043,7. Al comparar los espectros de masas del componente 1 y 2 se pueden apreciar iones productos que se encuentran en ambos espectros (Tabla 5.2). Esto significa que ambos componentes tienen la misma parte peptídica, y estos picos son los signos de la presencia de residuos de aminoácidos en el extracto

orgánico purificado, por lo que el análisis de los mismos puede proveer información importante acerca de la conexión de los aminoácidos en la parte peptídica. Adicionalmente, en la Tabla 5.3 se resumen una serie de picos, que como característica principal es que se encuentran en el componente 1 y que guardan relación con picos que se encuentran en el componente 2, esta relación viene dada por la diferencia de 14 unidades entre los picos, lo cual indica que los componentes difieren en la cadena alifáticas.

**Tabla 5.3.** Fragmentaciones que se encuentran en el espectro de masas del componente 1 y 2 y que se diferencian en 14 unidades.

<b>ión Precursor 1 (1057,7)</b>	<b>ión Precursor 2 (1043,7)</b>
1057,7	1043,7
944,7	930,6
831,6	817,6
814,5	800,5
715,6	702,6
670,6	656,6

La diferencia de los picos también puede ser utilizada para determinar la conexión de algunos residuos de aminoácidos en la cadena peptídica, siempre y cuando la diferencia entre estos picos sea la misma masa de un residuo de aminoácido. Para analizar la secuencia de aminoácidos nos centraremos en el componente 2 (Figura 5.6b) ya que es el ión mayoritario. Para ello se han recopilado una serie de iones productos que se presentan la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Valores de los residuos de aminoácidos identificados del espectro MS/MS

	<b>Serie de Picos</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Residuo de aminoácido</b>
<b>I</b>	1043,7—930,6	113	Leu
	930,6—817,6	113	Leu
	817,6—702,6	115	Asp
	594,4—481,3	113	Leu
<b>II</b>	481,3—382,2	99	Val
	382,2—267,2	115	Asp

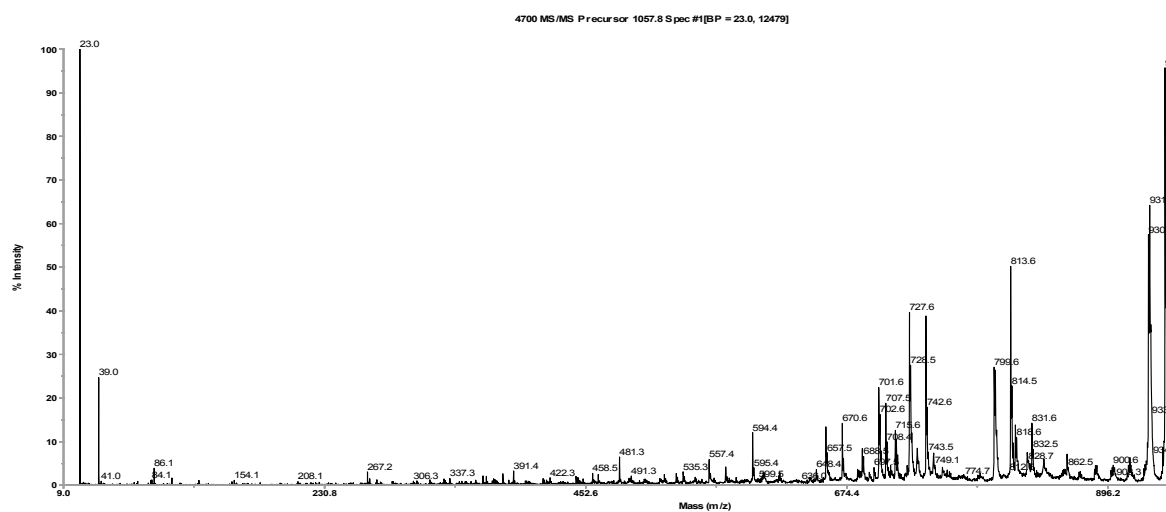
A partir de aquí se han detectado la siguiente serie de picos: 1043,7—930,6—817,6—702,6, que de acuerdo a los valores de diferencia entre los picos (Tabla 5.4, serie I) sugieren una secuencia Leu-Leu-Asp. Además, se

evidencia una segunda serie de picos, 594,4—481,3—382,2—267,2 (Tabla 5.4, serie II) que sugieren una secuencia Leu-Val-Asp. Una de las limitaciones en el análisis de espectrometría de masas es que no se puede diferenciar entre Leu e iLe ya que el valor del residuo de aminoácido es el mismo (113), por lo que, sabiendo que en el EOP solo existe una Val, un Asp, tres Leu y una iLe, la secuencia de residuos de aminoácidos en el péptido debe estar en la forma de iLe/Leu- iLe/Leu-Val-Asp-iLe/Leu-iLe/Leu.

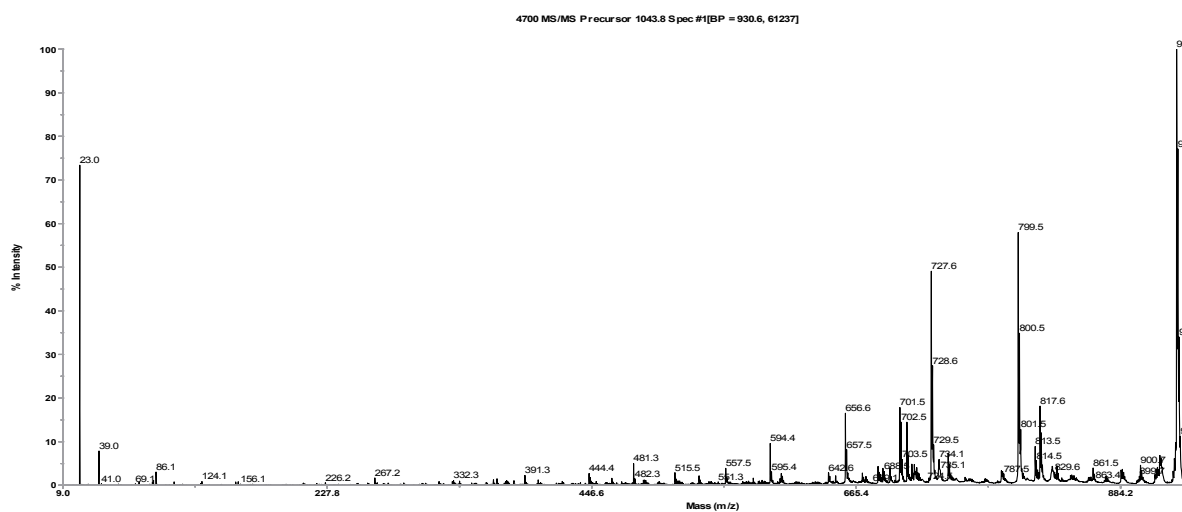
Para toda secuencia de aminoácidos es necesario determinar el residuo de aminoácido que se encuentra tanto en la posición N-terminal como C-terminal. Para esto, el mecanismo de fragmentación puede proporcionar información útil. Para determinar el N- terminal y el C- terminal de la cadena peptídica seguiremos las recomendaciones dadas por Yang *et al.*, (2006) quienes utilizan el mecanismo de la transferencia de doble hidrógeno (DHT) o también conocido como reordenamiento de McLafferty con doble transferencia de hidrógeno. Yang *et al.*, (2006) indican que cuando a la estructura del éster se añade el OH<sub>2</sub>, entonces en la parte C-terminal la masa del fragmento se debería incrementar en 18,01 unidades, y en cambio para la estructura amida se debería añadir el NH<sub>3</sub> a la parte C-terminal y su masa se incrementaría en 17,01 unidades. En este sentido, analizando en profundidad el espectro MS/MS del componente 2 (1043,7, Figura 5.7b), podemos observar que a partir del ión precursor 1043,7 se formó el pico 817,6 debido a la pérdida de los residuos iLe/Leu-iLe/Leu, además se evidencia la formación de un pico a 799,5 que concuerda con una pérdida de masa correspondiente a un fragmento Leu-iLe+OH<sub>2</sub> (m/z 244,2), de hecho la presencia de un pequeño pico a 267,2 también corrobora la secuencia Leu-Ile ya que este pico representa el fragmento sodio-ionizado (Leu-Ile-OH<sub>2</sub>+Na<sup>+</sup>). Esto confirma que la estructura de éster ha sido formada por el grupo carbonilo de Leu y el grupo hidroxilo de la parte alifática en el EOP. En otras palabras, la iLe/Leu sirve como el C-terminal de la cadena peptídica. Por lo que, considerando lo explicado anteriormente al analizar la serie de picos I y II (Tabla 5.4) del componente 2, se sugiere que la secuencia peptídica puede ser: N→iLe/Leu→iLe/Leu→Val→Asp→iLe/Leu→iLe/Leu→C.

## Resultados y Discusión

a)



b)



**Figura 5.6.** Espectro de masas del EOP sodio-ionizado, realizado por espectrometría de masas en tandem (MS/MS) de un lipopéptido sodio-ionizado. Ión precuro a) 1057,7 y b) 1043,7.

Como hemos mencionado, no es posible distinguir entre los residuos Leu e iLe por espectrometría de masas (ESI). Sin embargo, vamos a plantear la hipótesis de que la única iLe detectada mediante el análisis de aminoácidos se encuentra en la posición 7, formando el enlace éster con el ácido graso  $\beta$ -hidroxi, tal como ocurre con todas los liquenisinas que contienen iLe, que se han reportado hasta ahora en la literatura (liquenisina A , D y G, Nerurkar, 2010). Por lo que, en conjunto estos patrones de fragmentación permiten establecer la siguiente secuencia del hexapéptido N→Leu→Leu→Val→Asp→Leu→Ile→C correspondiente a la cabeza polar. Finalmente, para analizar el último residuo determinado, Glx, este solo podría estar conectado a la Leu N-terminal; este hecho es apoyado por la serie de iones 702,6 (Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val), 817,8 (Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val-Asp), 930,6 (Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu Val-Asp-Leu), y, finalmente, 1043,7 (Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Ile) que se forman (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.**Valores de los residuos amoniacidicos identificados del espectro MS/MS

<b>Iones productos</b>	<b>Parte peptídica</b>
702,6	(Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val)
817,8	(Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val-Asp)
930,6	(Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu Val-Asp-Leu)
1043,7	(Na + hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Ile)

La masa de los fragmentos indica que Glx, tiene una amida de cadena lateral, es decir, una glutamina (Gln), también de acuerdo con la masa incluso molar del compuesto (tiene un número par de átomos de nitrógeno, ocho para ser precisos, como Asx, es un ácido aspártico (Asp), tal como se explicó anteriormente). Por tanto, la secuencia de los residuos de aminoácidos en la parte peptídica del EOP es N→Gln→Leu→Leu→Val→Asp→Leu→iLe→C.

### **5.1.3 Composición de la parte hidrofóbica del extracto orgánico purificado analizado por ESI/MS.**

Se han utilizado diferentes métodos para determinar la composición de la parte hidrófoba de los lipopéptidos. Zhao *et al.* (2012), utilizaron la

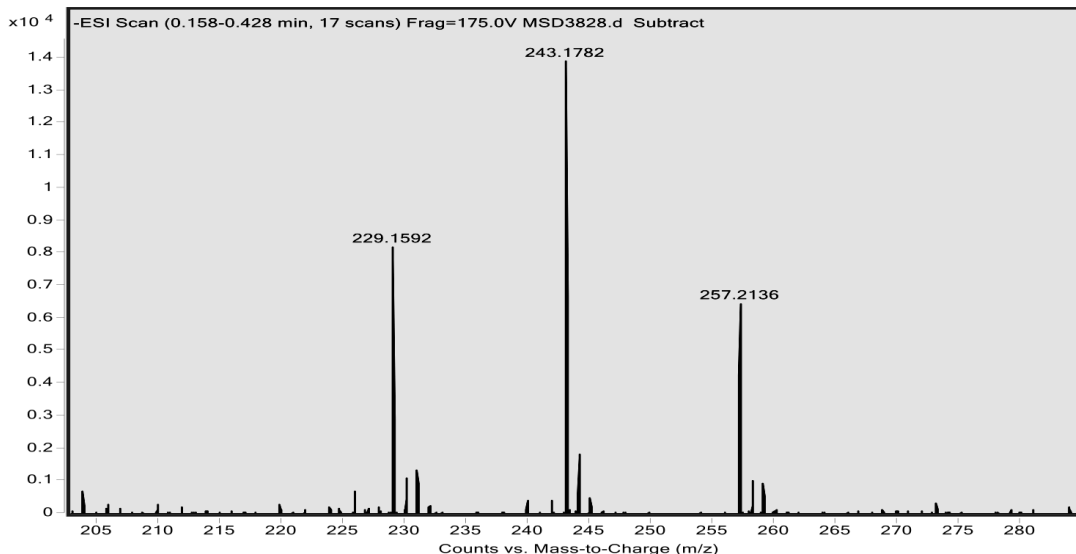


cromatografía de gases/espectrometría de masas (GS/MS) para la caracterización del ácido graso de surfactina. Otro grupo, utilizó tres técnicas para caracterizar el ácido graso de surfactina. En primer lugar ESI-MS/MS para identificar la presencia del ácido graso monohidroxilado, a paso seguido, aplicaron la técnica GC/MS para distinguir la posición del ácido graso hidroxilo y por último la aplicación de resonancia magnética nuclear (Liu *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo, el análisis de ácidos grasos se realizó a partir de la fracción orgánica obtenida de la hidrólisis del EOP de acuerdo a lo que se describe en el apartado 3.5.4. Esta fracción orgánica fue analizada por ESI-MS y el espectro de masas se presenta en la Figura 5.7.

En el espectro de masas de la Figura 5.7, se observan tres masas moleculares de 229, 243 y 257, existiendo entre ellas una diferencia de 14 unidades. Esto indica la presencia de ácidos grasos de diferentes longitudes. En el trabajo realizado por Yang *et al.*, (2007), se indica que el residuo de ácido graso puede ser obtenido por la diferencia entre la masa molecular del EOP y de los residuos aminoácidos que conforman la cabeza peptídica. Por lo que, considerando que la masa molecular de la molécula completa del EOP es 1043,7 (Na+hidroxiacil-Gln-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Ile y que el peso de la cabeza polar es de 817, al restar del peso global obtenemos un valor de 226,7 que corresponde a un C<sub>14</sub>. Al comparar con el valor obtenido en el espectro de masas (229,15), se evidencia un ligero incremento que puede ser debido a la presencia de moléculas de H. Estos resultados sugieren que los picos encontrados en el espectro se corresponden con cadenas de ácidos grasos  $\beta$ -hydroxy con las siguientes longitudes C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>16</sub>. Al compararlos con ácidos grasos de otros lipopéptidos, parece ser que existe una alta heterogeneidad en la longitud de la cadena de ácido graso hidroxilado, que va en dependencia de las especies microbianas. Por ejemplo, Bonmatin *et al.*, (2003) indican que *B. subtilis* S499 produce surfactinas con ácidos grasos con longitud de entre C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>, mientras que otros ácidos grasos de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* HSO121 tienen longitudes entre C<sub>12</sub>-C<sub>17</sub> (Liu *et al.*, 2007). Adicionalmente, Yakimov *et al.*, (1995) demostraron que *B. licheniformis* BAS50 produce liquenisina A con una longitud de cadenas lipídicas entre C<sub>12</sub>-C<sub>17</sub>. Mientras,

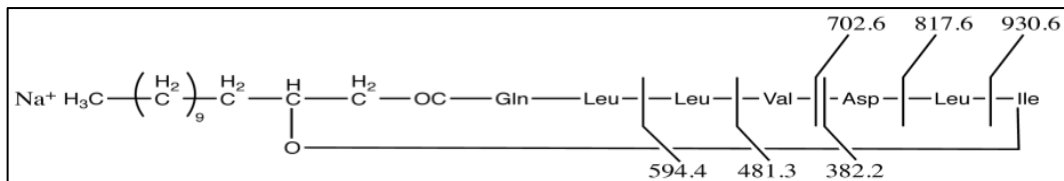
Batrakov *et al.*, (2003) demostraron que la cepa *B. licheniformis* 603 produce lipopéptidos con ácidos grasos de C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>.



**Figura 5.7.** Espectro de masas (ESI-MS) del residuo de ácido graso del extracto orgánico purificado en modo negativo.

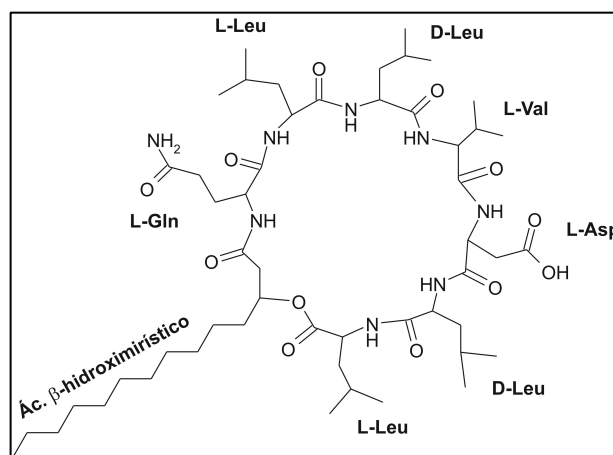
En conclusión, las diferentes técnicas empleadas han permitido confirmar la hipótesis inicial ya que se ha identificado el extracto orgánico purificado producido por *B. licheniformis* AL 1.1 como un lipopéptido con la siguiente composición en la parte peptídica: Gln, Asp, Val, Leu e iLe en proporciones 1:1:1:3:1. En lo que respecta, a la secuencia de estos aminoácidos, por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), posterior definición del C-terminal y el N-terminal, y de acuerdo al criterio del reordenamiento de McLafferty con doble transferencia de hidrógeno, ha dado como resultado la secuencia peptídica: N→Gln→Leu→Leu→Val→Asp→Leu→iLe→C que se presenta en la Figura 5.8. Finalmente, del análisis de los ácidos grasos se demostró que el BT producido por la cepa AL 1.1 es un mezcla de lipopéptidos homólogos que tienen una misma cadena peptídica pero difieren la longitud de la cadena hidrófoba (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>16</sub>).

Adicionalmente se realizó un ESI-masas, obteniendo información, como su fórmula molecular: C<sub>52</sub> H<sub>93</sub> N<sub>8</sub> O<sub>12</sub>, su respectivo peso molecular Pm= 1021,6. El peso molecular de 1021,6 corresponde al ión mayoritario que le corresponde una longitud de ácido graso  $\beta$ -hydroxy de C<sub>14</sub>.



**Figura 5.8.** Estructura cíclica del lipopéptido y sus fragmentaciones obtenidas por MS/MS.

De acuerdo a la información bibliográfica hemos identificado que el EOP tiene una relación estructural similar a las liquenisinas A (Yakimov *et al.*, 1995), C (Jenny *et al.*, 1991) y D (Konz *et al.*, 1999). Por lo cual la estructura química es similar a la que se presenta en la Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Estructura química de la liquenisina producida por *B. licheniformis* AL 1.1.

Obviamente, para confirmar el tipo exacto de liquenisina son necesarios estudios complementarios, que vayan encaminados a la determinación de la configuración de los aminoácidos (L o D). En todo caso, nuestro EOP, se ha denominado como liquenisina purificada (Lch<sub>AL1.1</sub> purificada). Para los siguientes estudios hemos utilizado la Liquenisina<sub>AL1.1</sub> (Lch<sub>AL1.1</sub> o extracto orgánico) que es el producto obtenido por extracción orgánica a partir de la Lch<sub>AL1.1</sub> precipitada. Es importante destacar que de los 3,2 g/L que se han optimizado previamente el 35% corresponde a liquenisina purificada, es decir aproximadamente 1 g/L de producto puro lo cual no es un valor nada despreciable.



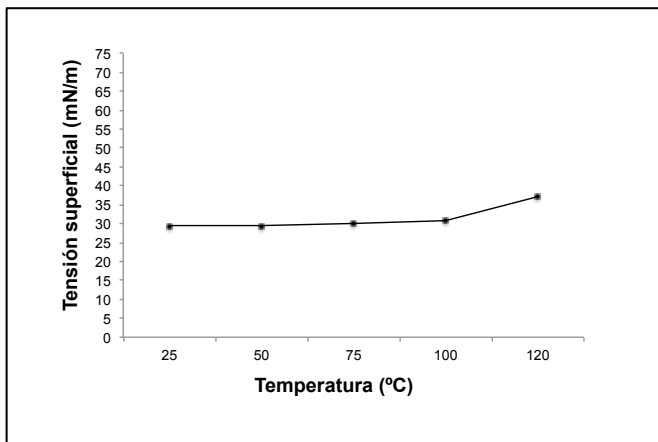
tensión interfacial que produce, y la eficiencia que está relacionada con el valor de la CMC, y es la cantidad mínima de tensioactivo que produce ese descenso máximo (Rosen, 2004). La cmc de la Lch<sub>AL1.1</sub> (15 mg/L) es inferior a la de la surfactina que tiene una cmc=25 mg/L (Cooper *et al.*, 1981), lo cual indica que la Lch<sub>AL1.1</sub> es un tensioactivo muy eficiente. El valor de la cmc de la Lch<sub>AL1.1</sub> es similar a la cmc de otras liquenisinas como la liquenisina A (12 mg/L), arthrofactin (13,5 mg/L) y tensioactivo BL86 (10 mg/L), pero menor que la liquenisina B (20 mg/L) (Yakimov *et al.*, 1995). Esto confirma la fuerte actividad superficial de las liquenisinas.

### **5.2.2 Estudio de la estabilidad de la Lch<sub>AL1.1</sub> a la temperatura, pH y fuerza iónica**

Los BT pueden ser aplicados en procesos industriales de muy diversa índole. Para evaluar la potencial aplicación de la Lch<sub>AL1.1</sub> en estos campos se estudió la estabilidad de la Lch<sub>AL1.1</sub> en condiciones extremas de temperatura, pH y en presencia de altas concentraciones de sal. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que después del tratamiento térmico, la solución de la Lch<sub>AL1.1</sub> conserva su actividad superficial, ya que los valores de tensión superficial se mantienen entre 29,5-30,7 mN/m en un amplio rango de temperatura (25, 50, 75 y 100°C), y solamente después de ser sometida a esterilización (120°C, 20 min) la tensión superficial alcanza los 37,1 mN/m (Figura 5.11). Estos resultados muestran una buena estabilidad térmica de la Lch<sub>AL1.1</sub>, indicando la posibilidad de su empleo en procesos industriales que utilizan temperaturas elevadas.

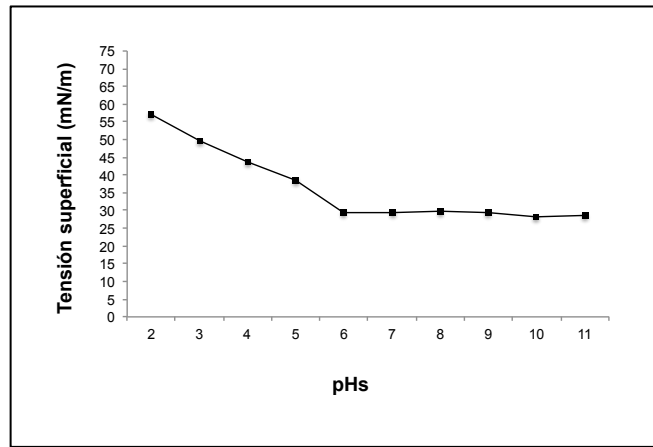
Varios estudios confirman la estabilidad de los BT en condiciones extremas de temperatura. Al-Bahry *et al.*, (2013) reportaron que los valores de tensión superficial del BT producido por *B. subtilis* B20 son estables en un amplio rango de temperaturas (40-100°C). Del mismo modo, Vilela *et al.*, (2014) expusieron que el lipopéptido producido por *Brevibacterium luteolum* mantiene su actividad superficial hasta los 70°C y que al incrementar por encima de esta temperatura, la actividad superficial se ve afectada provocando un ligero incremento en la tensión superficial de 27 hasta 38 mN/m. Otros BT

también mantienen su actividad superficial en condiciones extremas de temperatura, como es el caso del ramnolípido producido por *P. aeruginosa* o del glicolípido producido por *Acinetobacter* sp (Bordoloi y Konwar, 2008; Chen *et al.*, 2012). La resistencia térmica indica una posible aplicabilidad en procesos de fabricación que envuelven tratamientos térmicos previos a la comercialización.



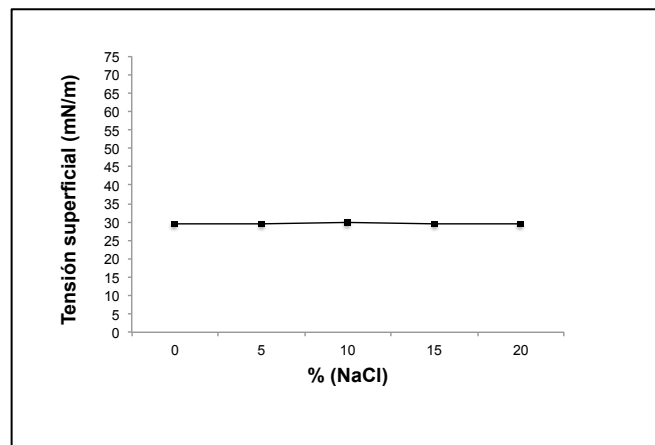
**Figura 5.11.** Efecto de la temperatura sobre la actividad superficial de la Lch<sub>AL1.1</sub>.

Al estudiar la actividad superficial de la Lch<sub>AL1.1</sub> en un amplio rango de pHs (Figura 5.12) se observó que dicha actividad permaneció estable entre pHs 6 y 11. Cuando los valores de pH fueron inferiores a 6, se formó una suspensión turbia, como consecuencia de la precipitación del BT, y cuyo efecto inmediato fue que la tensión superficial del medio subió hasta 57,3 mN/m. Otros autores describieron un comportamiento similar al trabajar con un lipopéptido producido por *B. luteolum*, ya que a pH 4 el valor de tensión superficial de este BT se incrementó debido a su precipitación (Vilela *et al.*, 2014). De igual modo, para el lipopéptido producido por *B. subtilis* B20 la actividad superficial se afectó a pHs entre 2-4 (Al-Bahry *et al.*, 2013). Un comportamiento contrario fue descrito por Burgos-Díaz *et al.*, (2011), quienes informaron que la actividad superficial del BT producido por *Sphingobacterium* sp. (mezcla de fosfolípidos) no se veía afectada a pH ácidos (1–5), aunque, al aumentar el pH del medio a 7 o superior, el valor de tensión superficial se incrementaba. Esta respuesta probablemente está ligada a la diferente naturaleza química de los tensioactivos estudiados.



**Figura 5.12.** Efecto de diferentes pHs sobre la actividad superficial de la Lch<sub>AL1.1</sub>.

En cuanto al efecto de la fuerza iónica (5-20% de NaCl) sobre la actividad superficial (Figura 5.13), no se observó ningún cambio en la respuesta, lo que indica que la actividad superficial de este BT no se ve afectada por la fuerza iónica. El hecho de que la actividad superficial no cambie puede favorecer la formación de emulsiones estables a diferentes concentraciones de sales, o que la Lch<sub>AL1.1</sub> sea adecuada para procesos de biorremediación en ambientes marinos, o que pueda ser aplicada en formulaciones industriales con elevados contenidos de sal. Nitschke y Pastore, (2006) informaron que el BT producido por *B. subtilis* mantenía la actividad superficial en presencia de concentraciones de NaCl de hasta el 20%.

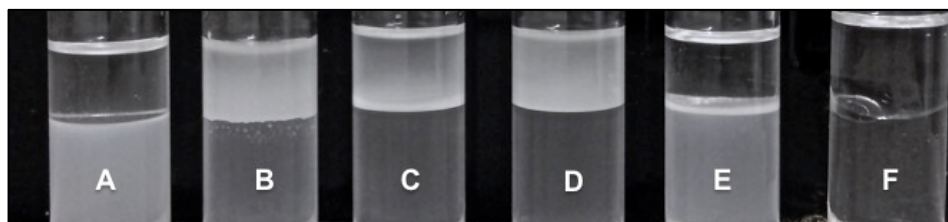


**Figura 5.13.** Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la actividad superficial de la Lch<sub>AL1.1</sub>.

### 5.2.3 Estudio de la capacidad emulsionante de la Lch<sub>AL1.1</sub>.

La capacidad emulsionante es otra propiedad valiosa en muchas áreas. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren, que la actividad emulsionante depende de la afinidad de la Lch<sub>AL1.1</sub> por los sustratos oleosos y del compuesto hidrófobo. Existen varios tipos de emulsiones. En nuestro trabajo nos hemos centrado en las emulsiones simples o emulsiones en dos fases, que son creadas generalmente por la mezcla de dos líquidos inmiscibles (solución de la Lch<sub>AL1.1</sub>-aceite). Los tipos comunes de emulsión en dos fases son: i) emulsiones de aceite en agua (O/W), cuando las gotas de aceite se dispersan en una fase acuosa, y ii) los sistemas menos frecuentes son los formados por gotas de agua dispersadas en una fase de aceite que se denominan emulsiones de agua en aceite (W/O).

En este sentido se evaluó la capacidad emulsionante de la Lch<sub>AL1.1</sub> con 5 aceites empleados en la industria cosmética. Este efecto emulsionante fue medido en términos del índice de emulsión a las 24 h ( $E_{24}$ ). Al poner en contacto la solución de la Lch<sub>AL1.1</sub> (15 mg/l) con el palmitato de isopropilo y miristato de isopropilo, se observó la formación de emulsiones traslucidas en la fase acuosa ( $E_{24}=66,7\%$ ) (Figura 5.14). En cambio, en presencia del octildodecanol, etilhexanoato de cetearilo y triglicéridos caprílico cáprico, se observó una ligera emulsión en la fase acuosa, y una emulsión translúcida en la fase oleosa, obteniendo un  $E_{24}$  del 100% (Figura 5.14).



**Figura 5.14.** Emulsiones obtenidas con agua destilada, Lch<sub>AL1.1</sub> y diferentes aceites utilizados en la industria cosmética: palmitato de isopropilo (A), octildodecanol (B), cetearílico ethylhexaonate (C), los triglicéridos caprílico cáprico (D) y miristato de isopropilo (E). El control contiene miristato de isopropilo/agua destilada (F).

La emulsión que se forma entre la solución de la Lch<sub>AL1.1</sub> y los distintos aceites depende de la longitud de las cadenas de carbono que componen



dichos productos oleosos. Inicialmente identificamos que cuando la solución de la Lch<sub>AL1.1</sub> se mezclaba con el palmitato de isopropilo (C<sub>16</sub>) y miristato de isopropilo (C<sub>17</sub>) se formaba una emulsión del tipo aceite en agua (O/W). En la Figura 5.14 (A, E) se aprecia esa turbidez en la fase acuosa que corresponde a la emulsión. En contraste, cuando la solución de la Lch<sub>AL1.1</sub> se pone en contacto con el octildodecanol (C<sub>8</sub>), etilhexanoato (C<sub>10</sub>) de cetearilo y triglicéridos caprílico cáprico (C<sub>12</sub>), se forman emulsiones principalmente en la fase oleosa, tal como se pueden apreciar en la Figura 5.14 (B,C,D), lo que corresponde a una emulsión de W/O, confirmando la formación de dos tipos de emulsiones en un mismo sistema.

Resultados similares fueron obtenidos por Abu-Ruwaida *et al.*, (1991) quienes estudiaron la capacidad emulsionante del BT producido por *Rhodococcus* sp. ST-5 y reportan valores de E<sub>24</sub> entre 38-78% con hidrocarburos como heptano, keroseno. Además describieron que a medida que se incrementa la longitud de las cadenas de carbono de los hidrocarburos, la actividad emulsionante del BT disminuía. La importancia de la capacidad emulsionante de lipopéptidos ha sido descrita por varios autores. Zhao *et al.*, (2013) encontraron que el lipopéptido producido por *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibe valores de E<sub>24</sub> más altos con aceites de soja (83,3%), que con hidrocarburos como gasolina (28,2 %) y diésel (42,3 %). Por otra parte, Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) reportaron valores de E<sub>24</sub> obtenidos para surfactina con hidrocarburos como hexadecano (60%), diesel (65%) y kerosene (60%). Janek *et al.*, (2010) indicaron que pseudofactin II un lipopeptido producido por *Pseudomonas fluorescens* BD5 presentó mejores índices de emulsificación que dos tensioactivos químicos (Triton X, Tween 20), además de ser efectivo con hidrocarburos aromáticos y aceites de plantas. En estos dos últimos trabajos citados, los datos de E<sub>24</sub> fueron similares a los alcanzados por la Lch<sub>AL1.1</sub> (64-100%). El hecho de que la Lch<sub>AL1.1</sub> pueda formar emulsiones O/W es importante, ya que este tipo de emulsiones son ampliamente utilizadas en el campo farmacéutico, cosmético y de alimentación (Lin y Wang, 2004).

Hasta el momento hemos descrito que la Lch<sub>AL1.1</sub> tiene propiedades emulsionantes, pero son necesarios estudios complementarios para determinar

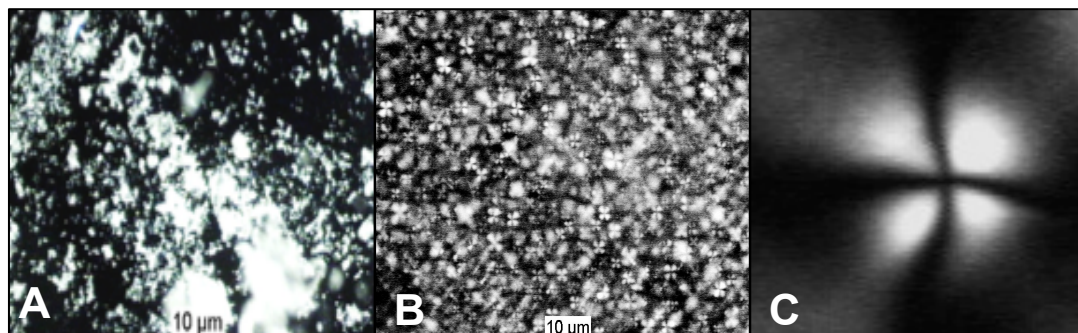
el tamaño de las gotas de las emulsiones y de esta manera conocer si se tratan de macro-emulsiones (>400 nm), nano-emulsiones (100-400 nm) o micro-emulsiones (<100 nm) (Rosen, 2004). De acuerdo a las observaciones realizadas (Figura 5.14), es muy posible que para las mezclas de la Lch<sub>AL1.1</sub>/octildodecanol, Lch<sub>AL1.1</sub>/etilhexanoato de cetearilo y Lch<sub>AL1.1</sub>/triglicéridos caprílico cáprico, la apariencia traslúcida que aparece en la fase acuosa, pueda estar relacionada a la formación de nano-emulsiones. Las micro-emulsiones son translúcidas, cinéticamente estables y el tamaño de las gotas es menor de 100 nm, a diferencia de las nano-emulsiones (las cuales requieren una cantidad alta de BT) pueden ser preparadas con concentraciones razonables de BT (<10%). Las micro-emulsiones se utilizan en diversas aplicaciones industriales, como el desarrollo de productos de cuidado personal, cosméticos, salud y agroquímicos (Solans *et al.*, 2005).

Actualmente, el consumo de productos cosméticos que contengan BT está aumentando como resultado de la notable actividad superficial y biológica de los BT, especialmente de los lipopéptidos, lo que facilita la aplicación de este tipo de productos en este sector. Además, las diferentes propiedades de los BT (anti-adhesivos, antimicrobianos, antiinflamatorios) han abierto el abanico de posibilidades en los distintos campos de aplicación, donde se pueden adicionar como ingredientes multifactoriales, principalmente en el desarrollo de productos cosméticos (Kanlayavattanakul y Lourith, 2010).

#### **5.2.4 Formación de cristales líquidos**

Los biotensioactivos, debido a su naturaleza anfifílica, forman en solución acuosa micelas, a partir de una cierta concentración. Cuando se aumenta la concentración de un tensioactivo las micelas se empaquetan en una serie de disposiciones geométricas formando agregados supramoleculares. La forma de estos agregados depende de la forma individual de las micelas que las forman. Estos agregados o estructuras son conocidos como cristales líquidos. Los cristales líquidos tienen el orden molecular de los cristales sólidos y la movilidad de los líquidos. Los cristales líquidos más representativos son de estructura hexagonal, laminar y cúbica (Rosen, 2004).

Las estructuras de cristales líquidos son importantes no solo en la modificación de la viscosidad de las soluciones de tensioactivos, sino también, en la estabilización de espumas, emulsiones, en detergentes, lubricación y en otras aplicaciones (Boschkova *et al.*, 2002). En este trabajo, se ha utilizado el método de penetración de Lawrence, (1958) para determinar el tipo de cristal líquido que forma la Lch<sub>AL1.1</sub>. Este método consiste en observar con un microscopio equipado con luz polarizada, la penetración del agua en la muestra sólida de la Lch<sub>AL1.1</sub> (Figura 5.15 A) que se encuentra en un porta objeto a 25 °C. La penetración del agua por capilaridad produce un gradiente de concentraciones a lo largo del cual pueden observarse diferentes texturas de cristal líquido. Después de varios minutos, se puede distinguir una textura de mosaico típica de cristal líquido laminar (Figura 5.15B). En la Figura 5.15 C se muestra con detalle una cruz de malta. La formación de este tipo de estructuras se ha observado para otros BT, tal como lo describe Burgos-Díaz *et al.*, (2013) para el BT producido por *Sphingobacterium detergens*.

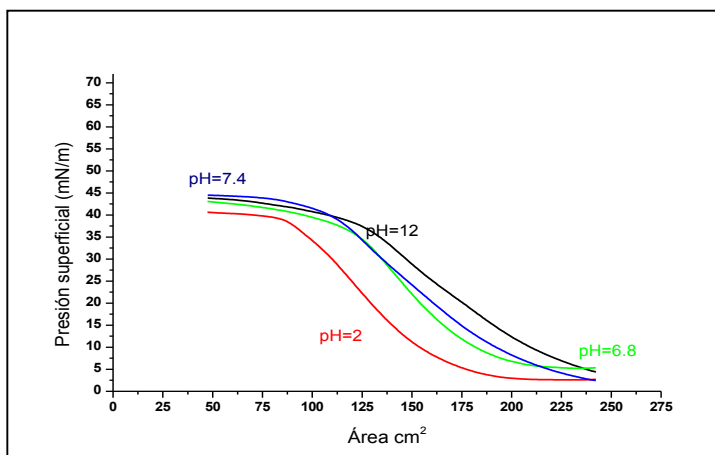


**Figura 5.15.** Formación de cristales líquidos A) Muestra cristalina, B) Mosaico de cruces de malta, C) Cruz de malta.

### 5.2.5 Isotermas de adsorción de la Lch<sub>AL1.1</sub>

La balanza de Langmuir permite la caracterización fisicoquímica de las monocapas depositadas en la interfase aire/agua. La presencia de una monocapa extendida en la interfase modifica el valor de la tensión superficial, definiéndose la presión superficial ( $\pi$ ) como:  $\pi = Y_0 - Y$ ; donde  $Y_0$  es la tensión superficial de la interfase en ausencia de la monocapa y  $Y$  es el valor de la tensión superficial en presencia de la monocapa depositada (Rosen, 2004). La Lch<sub>AL1.1</sub> en solución acuosa se comporta como un ácido fuerte liberándose los

protones al medio y quedando la  $Lch_{AL1.1}$  con carga negativa debido al grupo carboxilato.



**Figura 5.16.** Isothermas de presión superficial-área de las monocapas de la  $Lch_{AL1.1}$  a distintos valores de pHs de la subfase; pH 2 (I), pH 6.8 (I), pH 7.4 (I), pH 12 (I) a 25 °C.

Con el objetivo de estudiar cómo influye la protonación del grupo carboxilo (Asp) en las propiedades de adsorción, se estudiaron las isoterma de adsorción de la  $Lch_{AL1.1}$  depositadas sobre subfases a diferentes pHs. La Figura 5.16, muestra las isoterma presión superficial-área ( $\pi-A$ ) de las monocapa de la  $Lch_{AL1.1}$  en subfases con distintos valores de pH a 25 °C. Todas las isoterma  $\pi-A$  representadas en la Figura 5.16 presentan el perfil correspondiente a un tensioactivo parcialmente soluble. La variación del pH de la subfase contribuye a que las isoterma presenten un perfil diferente. A pH 2 se observan definidas la fase gaseosa (FG), líquido expandido (LE) y la fase de colapso (FC). En cambio a pHs 6.8, 7.4 y 12 las isoterma presentan perfiles similares, con una FG muy corta, pero con la fase LE y FC bien definida.

Con respecto a los valores de  $\pi$ , se puede observar que el incremento del pH provoca un aumento de la presión superficial. A pH 2 el valor de  $\pi$  es cercano a 40 mN/m, mientras que a pHs 6.8, 7.4 y 12 se encuentran valores cercanos a los 45 mN/m.

Una diferencia remarcable es que la FC en las isoterma a pHs 6.8, 7.4 y 12 presentan valores de área por molécula ( $A=125 \text{ cm}^2$ ) mayores que en la isoterma a pH 2 ( $A=75 \text{ cm}^2$ ). Estas diferencias, pueden ser debidas a que a pH 2 las moléculas de  $Lch_{AL1.1}$  no están ionizadas y se comportan como no

iónicos, por tanto las interacciones electrostáticas entre moléculas vecinas no existen. Debido a la ausencia de estas interacciones las moléculas no se repelen, por tal razón la fase de colapso a pH 2 aparece a valores de  $A$  menores. Al aumentar el pH de la subfase el equilibrio de ionización se desplaza hacia la forma ionizada apareciendo fuerzas electrostáticas de repulsión que interfieren en el ordenamiento de las moléculas. En estas condiciones la fase de colapso aparece a valores de  $A$  mayores.

Eeman *et al.*, (2006) reportan valores similares de  $\pi$  para surfactina, en subfases con pH 7.2, con un perfil de isothermas similares a las encontrado con la  $Lch_{AL1.1}$ . En otro trabajo Song *et al.*, (2007) demuestran que cuando el pH disminuye de 10 a 2 la  $\pi$  aumenta de 28 – 38 mN/m, además el perfil de las curvas en comparación con la  $Lch_{AL1.1}$  es distinto. En este último caso las diferencias pueden ser debidas a que la molécula de surfactina tiene dos grupos carboxilo (Glu y Asp) por uno de la  $Lch_{AL1.1}$  (Asp).

**6. Estudio de las propiedades biológicas  
de Liquenisina**



## 6. Estudio de las propiedades biológicas de la Liquenisina.

### 6.1 Efecto de la liquenisina (Lch<sub>AL1.1</sub>) en células procariotas

#### 6.1.1 Estudio de la actividad antimicrobiana de la Lch<sub>AL1.1</sub>.

El rápido aumento en la incidencia de infecciones bacterianas, particularmente las provocadas por microorganismos resistentes a varios antibióticos, ha renovado el interés por el desarrollo de nuevos antimicrobianos. La actividad antimicrobiana de los BT no es un tema reciente, ya que por ejemplo, Ábalos *et al.*, (2001) estudiaron la actividad antimicrobiana de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* AT10, encontrando una alta actividad en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra bacterias Gram negativas. Dichos autores describen, valores de CMI de 0,5 y 8 µg/ml para *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. Para *B. subtilis* y *Clostridium* sp. valores de CMI de 16 y 128 µg/ml respectivamente. Por otra parte, Das *et al.* (2008) informaron sobre la actividad antimicrobiana de la surfactina producida por *Bacillus circulans*, describiendo valores de CMI de 10 y 200 µg/ml para *Proteus vulgaris* NCIM 2857 y *Micrococcus flavus* NCIM 2376 respectivamente. Estos autores demostraron mayor actividad antimicrobiana con los LPs que con antibióticos muy conocidos como la penicilina y estreptomicina. A diferencia de los ramnolípidos y la surfactina, en nuestro trabajo hemos observado que la Lch<sub>AL1.1</sub> muestra una actividad inhibitoria débil (CMI) contra los siguientes microorganismos patógenos: *E. coli* ATCC 25922 (256 µg /ml), *E. coli* O157:H7 (512 µg/ml), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (1024 µg/ml), MRSA ATCC 43300 (1024 µg/ml) y *C. albicans* ATCC 10231 (1024 µg/ml). Fueron especialmente resistentes *Y. enterocolitica* ATCC9610, *Mycobacterium phlei* ATCC 41423, *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ya que la CMI fue >1024 µg/ml. Adicionalmente, se puede citar la actividad antimicrobiana del BT producido por *Lactobacillus paracasei* frente a *E. coli*, *S. agalactiae* y *S. pyogenes* a una concentración de 25 g/L, muy superior a las concentraciones ensayadas en nuestro trabajo (Gudiña *et al.*, 2010).



### 6.1.2 Efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> en la adhesión microbiana

Los biofilms son agregados de microorganismos que se adhieren y crecen en una superficie. La formación del un biofilm es un proceso gradual y dinámico, que se puede explicar en varias etapas: (i) unión inicial, (ii) fijación irreversible, (iii) desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm, (iv) maduración, y (v) dispersión (Srey *et al.*, 2013). Los microorganismos tienen la habilidad de adherirse y crecer sobre superficies de diferentes materiales (acero inoxidable, polipropileno, plásticos, cauchos, madera, etc.) y este tipo de crecimiento puede ser el origen de contaminaciones en diferentes industrias y ambientes hospitalarios. Las superficies húmedas pueden proporcionar un sustrato sólido idóneo para el desarrollo y persistencia de los biofilms, ecosistemas difíciles de evitar o eliminar (Bridier *et al.*, 2014). En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> en la primera etapa de la formación de biofilm.

Generalmente, los procesos de limpieza y desinfección son las estrategias más comúnmente empleadas para controlar la implantación de patógenos en equipos industriales (Jahid y Ha, 2012). Para estos procedimientos se utilizan productos químicos y esto puede contribuir a que los microorganismos adquieran cierto grado de resistencia (Srey *et al.*, 2013) y/o se dañen las superficies tratadas. Por lo tanto, hoy en día se están introduciendo nuevos enfoques para intentar controlar la formación de biofilms en la industria. Recientemente, Bridier *et al.* (2014) describieron una serie de estrategias para evitar la formación de biofilms que se han denominado “verdes” y que incluyen productos como aceites esenciales, bacteriófagos, enzimas, biocidas y biotensioactivos. Los BT, son considerados productos verdes como consecuencia de su origen, de su específico modo de acción, baja toxicidad y relativa facilidad de preparación y uso (Cameotra y Makkar, 2004).

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, se ha estudiado el efecto del pre-tratamiento y post-tratamiento de una superficie de poliestireno con la Lch<sub>AL1.1</sub>, en la adhesión de seis microorganismos (*Escherichia coli* O157:H7 CECT 4267, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Listeria monocytogenes* ATCC

15313, MRSA, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Campylobacter jejuni*) que crean problemas de contaminación en la industria alimentaria y también en ambiente hospitalario. Para analizar los resultados obtenidos, se emplearon curvas dosis-respuesta (concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> vs % inhibición de la adhesión). Los datos experimentales se ajustaron al modelo logístico ( $y = d / 1 + e^{b(\log(x) - \log(e))}$ ), con tres parámetros, donde **d** es la asíntota superior (máxima inhibición de la adhesión), **b** es la pendiente en el punto de inflexión de la curva y **e** es la dosis efectiva 50 (ED<sub>50</sub>).

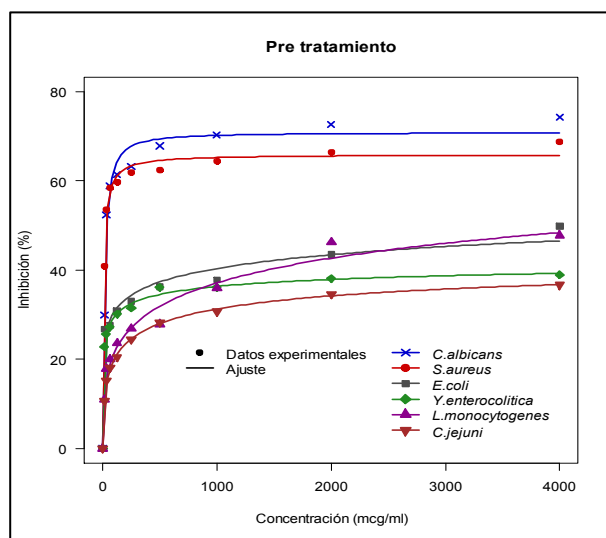
La actividad de la Lch<sub>AL1.1</sub> frente a los diversos microorganismos la definiremos con dos parámetros: eficacia y eficiencia. La eficacia es la inhibición de la adhesión provocada por la Lch<sub>AL1.1</sub>, expresada en porcentaje. La eficiencia viene medida por la dosis efectiva 50 (ED<sub>50</sub>) o concentración de tensioactivo que reduce a la mitad la adhesión microbiana respecto al control.

#### **6.1.2.1 Efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> como pre-tratamiento inhibidor de la formación de biofilm.**

La adsorción primaria entre microorganismos y superficies abióticas está mediada generalmente por interacciones inespecíficas. Primero se produce un acercamiento y posteriormente se establecen las fuerzas de atracción/repulsión donde las interacciones hidrofóbicas tienen probablemente más influencia en el desarrollo de la adhesión primaria. La hidrofobicidad puede variar considerablemente entre microorganismos y entre cepas, dependiendo de las moléculas superficiales (Dunne, 2002). La adición de un BT a una superficie modifica su hidrofobicidad, interfiriendo en la adhesión microbiana y en el proceso de desorción, pudiéndose utilizar como estrategia para retrasar el inicio de la formación de un biofilm (Gudiña *et al.*, 2010).

En el estudio del pre-tratamiento (Figura 6.1) de las superficies de poliestireno con la Lch<sub>AL1.1</sub>, los resultados obtenidos indican una rápida saturación de la inhibición de adhesión microbiana al incrementar la concentración de tensioactivo. De acuerdo con el modelo logístico, la máxima inhibición de la adhesión se obtuvo con *C. albicans* con un 70,9 %, seguida de MRSA con una inhibición del 65,9%. Para *Y. enterocolitica* fue del 45,6% y

para *C. jejuni* del 46,2%. El hecho de que a partir de una determinada concentración de Lch<sub>AL1.1</sub> (diferente para cada microorganismo) el porcentaje de inhibición de adhesión no se incrementa, hace que el modelo de inhibición se ajuste al modelo logístico e indica una saturación de Lch<sub>AL1.1</sub> en la superficie pre-tratada. Además por medio del modelo se calculó la concentración que inhibía el 50% de la adhesión microbiana (ED<sub>50</sub>) siendo de 17,2 µg/ml para *C. albicans*, de 8,3 µg/ml para MRSA, de 16,1 µg/ml para *Y. enterocolitica* y de 188,54 µg/ml para *C. jejuni* (Figura 6.1 y Tabla 6.1).



**Figura 6.1.** Curvas dosis-respuesta (inhibición de la adhesión microbiana) usando un modelo logístico ( $y = d / 1 + \exp^{b(\log(x) - \log(e))}$ ). Pre-tratamiento con la Lch<sub>AL1.1</sub>.

Estos resultados indican que la Lch<sub>AL1.1</sub> es muy eficaz para evitar la adhesión especialmente de *C. albicans* y MRSA. Mientras que, en términos de eficiencia, la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> es muy eficiente principalmente contra MRSA seguido de *Y. enterocolitica* y *C. albicans*, siendo menos eficiente contra *C. jejuni*. Por otro lado, para *E. coli* y *L. monocytogenes*, los resultados obtenidos de inhibición de la adsorción, no se ajustan a la ecuación logística hecho que se manifiesta en una ausencia de saturación del proceso. Sin embargo, experimentalmente se determinaron los valores máximos de inhibición de la adhesión, que fueron 49,8% y 49,7% respectivamente, valores que se obtuvieron a las concentraciones más altas de la Lch<sub>AL1.1</sub> ensayadas (4000 µg/ml). Estos datos indican que el pre-tratamiento con la Lch<sub>AL1.1</sub> tiene una menor eficacia para impedir la adhesión de estas especies bacterianas a una superficie de poliestireno.

Para explicar el mecanismo por el cual la Lch<sub>AL1.1</sub>, impide la adhesión de los microorganismos nos basamos en que la superficie de la mayoría de los microorganismos está cargada negativamente, y la extensión de la carga varía con las condiciones de crecimiento (Shi y Zhu, 2009). Además, la Lch<sub>AL1.1</sub> es un BT aniónico debido al residuo del ácido aspártico, que está cargado negativamente a pH 7,2 (potencial zeta= -37,6 mV). Estos datos sugieren que la Lch<sub>AL1.1</sub>, modifica la superficie de poliestireno, de manera similar a la descrita para surfactina y ramnolípidos. Estos BT pueden hacer que el poliestireno sea menos hidrófobo, probablemente como consecuencia de la orientación de las moléculas en la superficie que hace que se expongan los grupos cargados negativamente (Zezi do Valle Gomes y Nitschke, 2012). Por lo tanto, el efecto de inhibición podría ser consecuencia de las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las cargas negativas de la superficie microbiana y la carga negativa de la superficie de poliestireno (recubierto con moléculas de la Lch<sub>AL1.1</sub>), lo que se traduce en porcentajes altos de eliminación de adhesión microbiana, principalmente contra *C. albicans* y MRSA.

Para *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* y *C. jejuni* los valores de inhibición de la adhesión son menores del 50%. Esta menor eficacia sugiere que otros factores como por ejemplo la presencia de apéndices celulares o la producción de exopolisacáridos podrían estar presentes y favorecer la adhesión de estas bacterias. El común denominador en estas bacterias es la presencia de flagelos. Van Houdt y Michiels (2010) indican que el flagelo puede afectar la adherencia y la formación de biofilm por diferentes mecanismos dependiendo del tipo de bacterias. Primero, la motilidad puede ser necesaria para alcanzar la superficie permitiendo que las células puedan superar las fuerzas de repulsión entre ellas y la superficie. Este mecanismo es posiblemente más importante bajo condiciones de estancamiento que en condiciones de flujo. Además, la motilidad puede ser requerida para moverse a lo largo de la superficie, por lo tanto, facilita el crecimiento y la propagación del biofilm. Finalmente, los flagelos por si mismos (como apéndices de superficie) pueden mediar directamente la adherencia a la superficie. Shi y Zhu (2009) también mencionan la importancia de las superficies hidrófobas como los flagelos, exopolisacáridos para reducir las fuerzas de repulsión entre la

interacción de dos superficies, favoreciendo la adhesión microbiana.

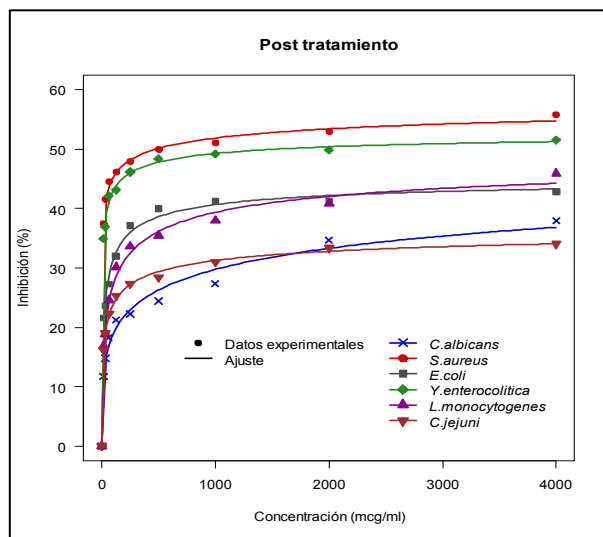
La adhesión de bacterias patógenas a superficies de poliestireno fue inhibida por dos lipopéptidos producidos por *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Rivardo *et al.*, 2009). Además, la adhesión de *L. monocytogenes* a placas de microtiter (poliestireno) se redujo en un 84% cuando la superficie fue tratada con surfactina (1 mg/ml) y en un 82% cuando se trató con ramnolípidos purificados (7,5 mg/ml) (de Araujo *et al.*, 2011). En otro trabajo, Janek *et al.*, (2012) caracterizaron la acción antiadhesiva de pseudofactin II contra *C. albicans* SC 5314, *C. albicans* ATCC 20231, *P. mirabilis* ATCC 21100 y *E. coli* ATCC 10536 con porcentajes de reducción entre 80-99% a una concentración de 0,5 mg/ml. Otros autores informan sobre la acción de surfactina (0,25 mg/ml) y ramnolípidos (1 mg/ml) contra *L. monocytogenes* evitando la adhesión en un 57, 8 y 42% respectivamente, además demuestran que surfactina no tiene la capacidad de evitar la adhesión de *S. aureus*, mientras que los ramnolípidos (1 mg/ml) evitan la adhesión de este microorganismos en un 67,8% (Zezzi do Valle Gomes y Nitschke, 2012). Estas aportaciones bibliográficas confirman que los datos obtenidos en nuestro trabajo se encuentran en concordancia con los descritos y es más, en algunos casos la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> es mucho mejor.

#### **6.1.2.2 Efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> como agente antiadherente en el post-tratamiento**

Tras la formación de biofilm, se midió la capacidad de la Lch<sub>AL1.1</sub> para eliminar los microorganismos que quedaban adheridos en la superficie (Figura 6.2). De forma similar al estudio anterior, los resultados obtenidos se han ajustado a una ecuación logística, indicando la presencia de un proceso de desorción de microorganismos que presenta una saturación, no incrementando a pesar de aumentar la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub>. De acuerdo con la ecuación logística, la eliminación (inhibición de la adhesión) más elevada fue del 62,3% para MRSA, siguiéndole una inhibición del 53,9% para *Y. enterocolitica*, 51,31% para *L. monocytogenes*, 45,8% para *E. coli* y de 38,2% para *C. jejuni*. A diferencia del estudio anterior, la menor eliminación se obtuvo con *C. albicans* ya que nada más se consiguió un 38% y además el

comportamiento del proceso fue diferente ya que no presentó saturación del proceso a concentraciones elevadas, indicando una menor eficacia de la Lch<sub>AL1.1</sub> frente a esta levadura.

El ajuste a la ecuación logística permitió calcular la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> que redujo el 50% de los microorganismos adheridos (ED<sub>50</sub>) indicando una eficiencia elevada ya que los valores obtenidos fueron muy bajos: 2,79 µg/ml para MRSA, 4,09 µg/ml para *Y. enterocolitica*, 24,47 µg/ml para *E. coli* O157:H7, 30,68 µg/ml para *C. jejuni* y 76,89 µg/ml para *L. monocytogenes* (Figura 6.2 y Tabla 6.1).



**Figura 6.2.** Curvas dosis-respuesta (inhibición de la adhesión microbiana) usando un modelo logístico ( $y = d / 1 + \exp^{b(\log(x) - \log(e))}$ ). Post-tratamiento con Lch<sub>AL1.1</sub>.

Como se ha mencionado, la Lch<sub>AL1.1</sub> tiene una actividad débil para eliminar el biofilm fresco de *C. albicans* (38%). Una característica distintiva de los biofilms de *C. albicans* es la presencia de una mezcla de formas morfológicas. Douglas (2003) observó que la adhesión inicial de las células de esta levadura se produjo después de 3 a 6 horas de incubación, por la formación del tubo germinativo, por lo que es muy probable que bajo las condiciones experimentales de nuestro trabajo (20 h de incubación) la adhesión de *C. albicans* sea muy fuerte, limitando la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub>. Otros factores que podrían explicar la baja actividad de la Lch<sub>AL1.1</sub> frente *C. albicans* pueden ser la neutralización de la carga negativa de la Lch<sub>AL1.1</sub> debido a la existencia de cambios en la pared celular de *C. albicans* durante el

crecimiento en respuesta a las condiciones operativas (temperatura y tiempo de incubación) o por la excreción de metabolitos ácidos, provocando en todos los casos un descenso de las fuerzas de repulsión sin modificar por lo tanto, la adhesión microbiana (Shakerifard *et al.*, 2009).

La actividad de la Lch<sub>AL1.1</sub> en el post-tratamiento puede ser debida a que la Lch<sub>AL1.1</sub> penetra y se absorbe entre la interfase de la superficie sólida y las bacterias adheridas que han formado el biofilm, reduciendo la tensión interfacial, favoreciendo así el desprendimiento bacteriano. McLandsborough *et al.*, (2006) describen que las interacciones atractivas entre la superficie microbiana y la superficie sólida pueden disminuir en presencia de BT, lo que facilitaría la eliminación del biofilm.

Los resultados de ambos tratamientos se presentan en la Tabla 6.1. Al comparar ambos procesos, se observa claramente que la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> en el pre-tratamiento es más eficaz para cuatro de los seis microorganismos probados con excepción de *Y. enterocolitica* y *L. monocytogenes*. En cuanto a la eficiencia, en principio en el post-tratamiento se obtienen los valores más bajos de ED<sub>50</sub> sin embargo los valores de inhibición son menores a los alcanzados en el pre-tratamiento (Tabla 6.1). No obstante, el cambio más marcado ocurre con *C. albicans*, para el cual se obtiene el valor más alto de inhibición en el pre-tratamiento mientras que en el post-tratamiento la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> es mucho menor. Es importante destacar en el post-tratamiento se asegura, por el diseño del ensayo, que la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> que actúa es la adicionada y por lo tanto más elevada, mientras que la concentración de microorganismos puede ser inferior por el lavado previo. Por lo tanto, hay una mayor cantidad de la Lch<sub>AL1.1</sub> para actuar con la superficie celular de los microorganismos previamente adheridos y aun así el resultado es menor. A diferencia, en el pre-tratamiento, se trabaja a unas concentraciones determinadas de la Lch<sub>AL1.1</sub> pero no se tiene la certeza de la cantidad real de BT restante en cada pocillo tras el lavado, responsable de la interacción.

**Tabla 6.1.** Comparación del pre-tratamiento y el post-tratamiento, el símbolo (–) significa que los datos no se ajustan al modelo logístico.

Microorganismos	Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
	Porcentaje de inhibición de la adhesión	ED <sub>50</sub> (µg/ml)	Porcentaje de Eliminación	ED <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33292	46,2	188,54	38,27	30,68
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CECT 4267	49,8	—	45,8	24,47
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	45,6	16,1	53,9	4,09
<i>Listeria Monocytogenes</i> ATCC 15313	49,7	—	51,3	76,89
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	65,9	8,3	62,3	2,79
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	70,9	17,2	38	—

Los resultados obtenidos en ambos tratamientos, demuestran que la Lch<sub>AL1.1</sub> tiene una alta actividad antiadherente y capacidad para eliminar el biofilm previamente formado. Sin embargo, es común que en el post-tratamiento se encuentren resultados menores con respecto al pre-tratamiento, de hecho Janek *et al.*, (2012) encontraron que pseudofactin II era capaz de eliminar el biofilm de *C. albicans* SC 5314, *C. albicans* ATCC 20231, *P. mirabilis* ATCC 21100 y *E. coli* ATCC 10536 en un 26 y 70% a concentraciones de 0,5 mg/ml, valores menores con respecto al pre-tratamiento. En otro trabajo, Zezzi do Valle Gomes y Nitschke, (2012) determinaron que surfactina (0,1 mg/ml) es capaz de eliminar el biofilm de *L. monocytogenes* (95,9%), mientras que los ramnolípidos (0,25 mg/ml) eran menos eficaces (26,5%). Con *S. aureus* los ramnolípidos (0,25 mg/ml) y surfactina (0,1 mg/ml) eliminan el biofilm en un 58,5 y 63,7% respectivamente, mientras que con *S. enteritidis* la surfactina y ramnolípidos, en las mismas concentraciones, eliminan el 35,3 y 30,9% respectivamente. En términos generales, la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> tanto en el pre-tratamiento y post-tratamiento se encuentra acorde a lo publicado por otros autores, es más en cuanto a los valores de concentración, los que hemos utilizado son mucho menores que los reportados por Gudiña *et al.*, (2010), quienes indican una alta capacidad antiadherente de un BT contra *S. aureus* (72,0%), *S. epidermidis* (62,1%), *S. agalactiae* (60%) y una baja acción contra *P. aeruginosa* (16,5%) y *E. coli* (11,5%) a una concentración de 25 mg/ml.

Srey *et al.*, (2013) mencionan que las células de biofilms son más resistentes a los agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas,



porque tienen una barrera compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que impide o disminuye el contacto con los agentes antimicrobianos. Además, la aplicación de los antimicrobianos para controlar los biofilms generalmente provoca una pérdida de potencia y efectividad debido a la exposición repetida contra los microorganismos, lo que puede generar variantes resistentes. Así pues el hecho de que la Lch<sub>AL1.1</sub> tenga una actividad antimicrobiana débil, puede ser una ventaja para evitar la generación de cepas resistentes. Por lo tanto, las propiedades antimicrobianas y anti-adhesivas de Lch<sub>AL1.1</sub> pueden encontrar su aplicación como recubrimiento en implantes biomédicos y/o en la industria de alimentos para prevenir la colonización y formación de biofilms de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

En resumen la Lch<sub>AL1.1</sub> podría ser una interesante alternativa para controlar el crecimiento de biofilms de MRSA, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* y *C. jejuni*, bacterias que se han descrito como agentes patógenos transmitidos por alimentos (Shi y Zhu, 2009). Por otra parte, teniendo en cuenta que *C. albicans* es reconocida como un importante patógeno en infecciones nosocomiales (Boucherit-Atmani *et al.*, 2011) se han obtenido resultados interesantes sobre la acción de Lch<sub>AL1.1</sub> frente a esta levadura, especialmente cuando el LP se utiliza para el pre-tratamiento de superficies.

## **6.2 Efecto de la liquenisina (Lch<sub>AL1.1</sub>) en células eucariotas**

### **6.2.1 Permeabilización de membranas biológicas y membranas modelo por la Lch<sub>AL1.1</sub>**

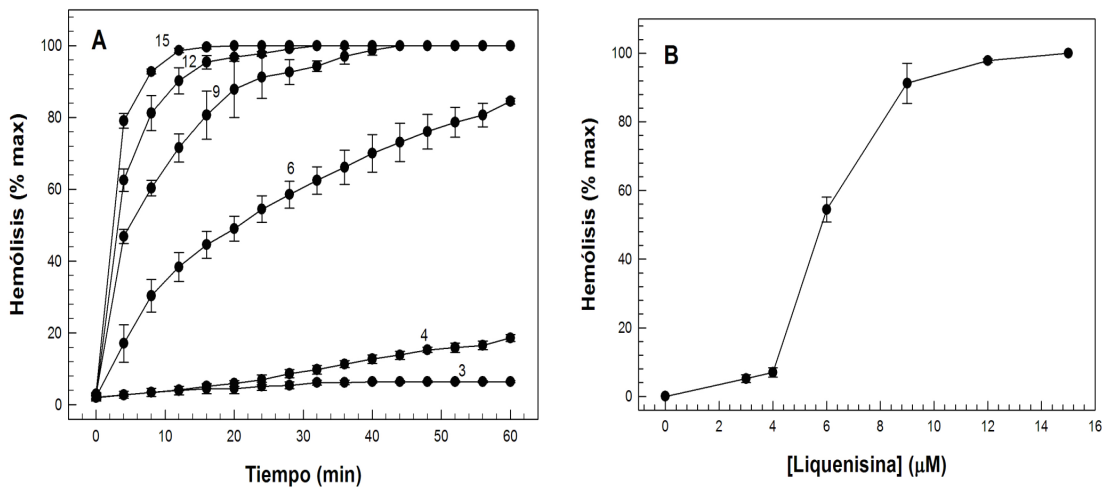
De acuerdo a la estructura descrita previamente, la Lch<sub>AL1.1</sub> producida por la cepa *B. licheniformis* AL 1.1 posee una cola hidrofóbica formada por un ácido graso que puede tener diferente longitud (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>16</sub>), y una cabeza polar que contiene siete aminoácidos con la siguiente secuencia (N→Gln→Leu→Leu→Val→Asp→Leu→iLe→C) (Figura 5.9). El residuo de ácido aspártico (Asp) proporciona un grupo carboxilo libre a la molécula de Lch<sub>AL1.1</sub>, que dependiendo del pH puede estar protonado (neutro) o disociado (negativo). La

naturaleza anfifílica de la liquenisina podría suponer una fuerte influencia en las propiedades estructurales y funcionales de las membranas fosfolipídicas. Estos efectos podrían ser responsables de su actividad biológica, por lo que se planteó realizar un estudio sobre el mecanismo de permeabilización de membranas biológicas y membranas modelo por este lipopéptido. Es importante remarcar que las acciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre las membranas que se estudian a continuación tienen lugar a concentraciones muy por debajo de su cmc (14,7  $\mu$ M, 15 mg/L), indicando que esta actividad no es debida a la solubilización de las membranas.

#### **6.2.1.1 Permeabilización de glóbulos rojos inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub>**

Los BT se comportan de la misma manera que los TS químicos en el sentido de que pueden penetrar las membranas biológicas, y alterar su estructura y función. La interacción de un BT con eritrocitos conduce normalmente a la hemólisis, que puede ser debida a la permeabilización de la membrana, mediante la formación de 'poros' o zonas de permeabilización aumentada para solutos polares de bajo peso molecular, o por rotura de la membrana (solubilización). Estos efectos ocurren usualmente a concentraciones variables del BT, que dependen de la naturaleza del compuesto y de sus características fisicoquímicas, principalmente de su cmc.

En la Figura 6.3 se muestran los experimentos de hemólisis de eritrocitos humanos inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub>, que se determinó por la liberación de hemoglobina. En la Figura 6.3A se muestra la cinética de la hemólisis a diversas concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub>, sobre todo a concentraciones por debajo de su cmc. Después de la adición del lipopéptido, se puede observar que la liberación de la hemoglobina de los glóbulos rojos (hemólisis) ocurre en una manera dependiente del tiempo, hasta alcanzarse el 100%. Adicionalmente se observa que la velocidad del proceso aumentó con la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> de una manera no lineal, ya que se puede observar un salto brusco alrededor de la cmc.



**Figura 6.3. A.** Salida de hemoglobina de eritrocitos humanos inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub> en función del tiempo. Los eritrocitos se incubaron a 37°C a varias concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> (3, 4, 6, 9, 12, 15 μM), las muestras fueron recolectadas a diferentes intervalos de tiempo y se determinó el porcentaje de liberación de hemoglobina. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes ± error estándar (barras de error). **B.** Nivel de hemólisis de acuerdo a la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> después de 24 min. de contacto con la Lch<sub>AL1.1</sub>.

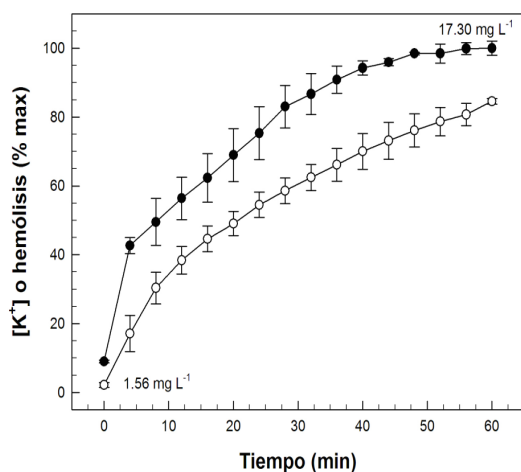
En la Figura 6.3B se muestra el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> después de 24 min de incubación. La hemólisis varió con la concentración de Lch<sub>AL1.1</sub> de una manera sigmoideal. El comportamiento sigmoideal de la hemólisis inducida por Lch<sub>AL1.1</sub> es indicativo de un proceso complejo en el cual es necesario que se acumule suficiente biotensioactivo para inducir la lisis osmótica de los eritrocitos. Como se ha comentado anteriormente para la velocidad inicial, se pudo ver que el grado de hemólisis también aumentó bruscamente alrededor de 4-5 μM, para llegar a un máximo alrededor de 12 μM.

### 6.2.1.2 Liberación de K<sup>+</sup> de eritrocitos humanos inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub>

El conocimiento de la cinética de la liberación de K<sup>+</sup> desde los eritrocitos, y su comparación con la de hemoglobina, normalmente aporta datos importantes sobre el mecanismo de la hemólisis. La liberación de K<sup>+</sup> inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub> en los eritrocitos humanos se monitorizó usando un ensayo discontinuo paralelo (Figura 6.4) bajo las mismas condiciones que se han descrito para la hemólisis. Se observó claramente que la salida de K<sup>+</sup> era un proceso más rápido y que precedía a la hemólisis. Por ejemplo, después de 4

minutos la liberación de  $K^+$  fue del 45% del máximo (100%), mientras que la liberación de hemoglobina todavía era del 18% con respecto al máximo (80%).

Dada la importancia de las posibles aplicaciones potenciales de los BT, por ejemplo en cosmética o para el transporte de fármacos, se ha estudiado la actividad hemolítica de varios ejemplos representativos, incluyendo lipopéptidos como la surfactina (Kracht et al., 1999; Dufour et al., 2005) y la iturina A (Aranda et al., 2005), y glicolípidos como los ramnolípidos producidos por *Burkholderia pseudomallei* (Haussler et al., 1998) o *Pseudomonas aeruginosa* (Sánchez et al., 2010), o los trealoslípidos producidos por *Rhodococcus sp.* (Zaragoza et al., 2010). Los resultados presentados aquí, utilizando membranas biológicas, son complementarios a esos trabajos, y proporcionan evidencia experimental para explicar el mecanismo molecular de la hemólisis de los eritrocitos humanos inducida por la  $Lch_{AL1.1}$ .



**Figura 6.4.** Cinética relativa de la salida de hemoglobina y de  $K^+$  de eritrocitos humanos inducida por la  $Lch_{AL1.1}$  ( $6 \mu M$ ) en función del tiempo. La  $Lch_{AL1.1}$  fue añadida al tiempo cero desde una solución de 2 mM preparada en DMSO. Las muestras se tomaron cada 4 min y se determinó la concentración de hemoglobina (○círculos blancos) y de  $K^+$  (●círculos negros). La concentración inicial y final externa de  $K^+$  se indica en la curva. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar (barras de error).

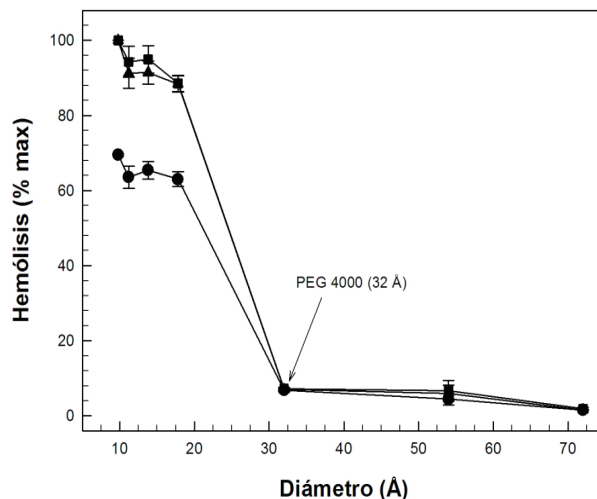
La actividad hemolítica de los tensioactivos y consecuentemente de los biotensioactivos, puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes (Bielawski, 1990). La hemólisis puede estar causada por rotura directa de la membrana a través de su solubilización, lo cual ocurre a relaciones altas tensioactivo/membrana, o puede deberse a la permeabilización de la

membrana para solutos de bajo peso molecular, lo que ocurre normalmente a concentraciones bajas y conduce a la lisis osmótica. Las curvas de la hemólisis inducida por la  $Lch_{AL1.1}$  mostradas en la Figura 6.3 son indicativas de un proceso rápido que incluso tienen lugar a concentraciones bajas de lipopéptido ( $4 \mu M$ ), por debajo de su cmc. Estas curvas difieren de las mostradas para el trealosalípido (Zaragoza *et al.*, 2010), donde las curvas de liberación de hemoglobina muestran un periodo de retardo en el rango de minutos, lo que sugiere que el alojamiento adecuado del glicolípido en la membrana antes de la hemólisis fue un proceso lento. La ausencia de este período de retardo en las curvas de  $Lch_{AL1.1}$  indica que la inserción de este lipopéptido en la membrana diana es bastante rápida. Los puntos experimentales fueron recogidos cada 4 min, por lo que no podemos descartar la presencia de un periodo de retardo menor que este tiempo, no obstante las curvas sugieren lo contrario. La salida más rápida de  $K^+$  con respecto a la de hemoglobina (Figura 6.4) inducida por la  $Lch_{AL1.1}$ , es una primera indicación de que ésta no se produce a través de la solubilización de la membrana. Lo más probable es que la  $Lch_{AL1.1}$  induzca una formación temprana de regiones permeables en la membrana de los eritrocitos, lo que permite la liberación de  $K^+$ , que da lugar a cambios osmóticos entrando agua debido al gradiente osmótico, y dañándose los eritrocitos lo que causa finalmente la salida de hemoglobina. Estos datos apoyan que la hemólisis se produce mediante un mecanismo coloide-osmótico.

### **6.2.1.3 Efecto de protectores osmóticos en el proceso de hemólisis inducida por la $Lch_{AL1.1}$**

Cuando la hemólisis tiene lugar a través de un proceso coloide-osmótico, debería ser posible evitar la hemólisis de los eritrocitos al añadir un soluto no permeable de tamaño adecuado a la disolución acuosa externa. La razón de esta consideración se basa en el hecho de que si la presión osmótica de la hemoglobina intracelular se equilibra con otro soluto añadido al tampón externo, el cual no puede pasar a través del poro de membrana, entonces no ocurrirá la hemólisis. Aunque el diferente comportamiento cinético de la salida de  $K^+$  y de hemoglobina se podría explicar mediante un mecanismo coloide-

osmótico, se buscaron estas otras evidencias adicionales para confirmar este mecanismo. Por lo tanto, con el fin de demostrar de forma inequívoca esta hipótesis se realizó un experimento de protección osmótica (Figura 6.5). Estos experimentos utilizan protectores osmóticos de diferentes tamaños, lo que también permite la determinación del tamaño del “poro” en la membrana. En la Figura 6.5 se muestra el porcentaje de la hemólisis en función del diámetro del protector osmótico presente en cada caso. Se encontró que la hemólisis puede ser evitada por compuestos que tienen un tamaño igual o mayor al del PEG 4000. Este resultado fue independiente de la concentración de Lch<sub>AL1.1</sub> e indicó que el tamaño del poro estaba cercano al diámetro del PEG 4000, es decir 32 Å.



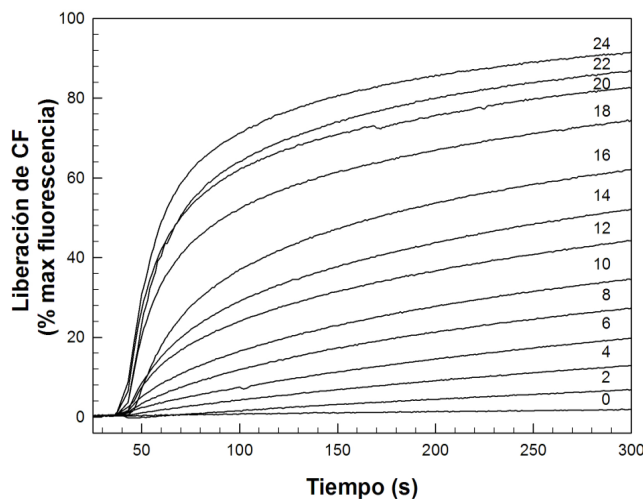
**Figura 6.5.** Hemólisis de eritrocitos humanos inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub> en presencia de protectores osmóticos. Las hemólisis se determinó bajo las mismas condiciones que en la Figura 6.3A, en la presencia de protectores osmóticos: sacarosa, polietilenglicol 400, 600, 1000, 4000, 6000 y 10000, en orden de menor a mayor diámetro. Las concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> fueron 6 (círculos), 9 (triángulos) y 12 μM (cuadrados). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes ± error estándar (barras de error).

Los experimentos de protección osmótica mostrados en la Figura 6.5 confirmaron el mecanismo coloide-osmótico antes sugerido. Así, un tamaño de poro de 32 Å de diámetro (correspondiente al PEG 4000) sería suficiente para dar lugar al flujo libre de solutos de bajo peso molecular como el K<sup>+</sup> que tiene un radio iónico de 1,33 Å, tal como se ha observado. No tenemos datos experimentales que nos den detalles sobre la estructura de esas regiones de permeabilización, o poros, en las membranas celulares sanguíneas, pero podríamos especular que deberían consistir en un número determinado de moléculas de la Lch<sub>AL1.1</sub> interactuando fuertemente unas con otras o, debido a

su naturaleza anfifílica, con fosfolípidos vecinos. Esta acumulación de moléculas de la  $Lch_{AL1.1}$  en una región definida de la membrana del eritrocito podría llevar a la permeabilización localizada para pequeños solutos ( $K^+$  en este caso), del mismo modo que se induce la salida de carboxifluoresceína en vesículas de fosfatidilcolina (explicada a continuación), resultando en un comportamiento tipo “poro”.

#### 6.2.1.4 Liberación del contenido de vesículas unilamelares grandes (LUV) de POPC inducida por la $Lch_{AL1.1}$

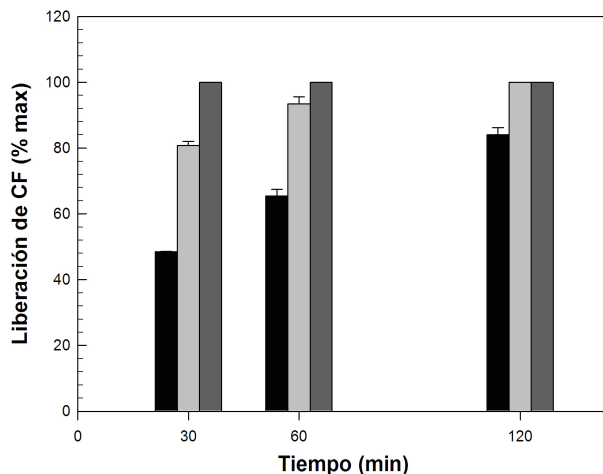
Esta parte del trabajo se planteó para conocer el mecanismo de interacción entre la  $Lch_{AL1.1}$  y las membranas fosfolipídicas modelo en estado fluido que conduce a la permeabilización de las mismas (Figura 6.6). El fosfolípido seleccionado fue POPC, elegido como especie representativa de fosfatidilcolina, para preparar vesículas de membrana en fase fluida.



**Figura 6.6.** Liberación de CF de LUV de POPC inducida por la  $Lch_{AL1.1}$ . La  $Lch_{AL1.1}$  se añadió a partir de una disolución preparada en DMSO (2 mM) a diferentes concentraciones finales ( $\mu M$ , números en las curvas). La concentración de POPC fue de 25  $\mu M$ , y la temperatura se mantuvo constante a 25°C. Los datos corresponden a un experimento representativo.

La salida de contenidos acuosos de vesículas fosfolipídicas al medio externo se monitorizó mediante la sonda fluorescente CF encapsulada en el interior de LUVs de POPC. La concentración de lípido de 25  $\mu M$  utilizada en estos experimentos hizo posible manejar concentraciones de  $Lch_{AL1.1}$  tanto por debajo como encima de su cmc. En la Figura 6.6 se muestran las curvas de liberación de CF encapsulada en vesículas unilamelares grandes (LUV) de

POPC en función del tiempo, obtenidas tras la adición de concentraciones crecientes de la  $Lch_{AL1.1}$  (manteniendo rangos de concentración por debajo y por encima de la cmc). Se observó de modo general que la salida de CF era un proceso lento y tenía un período de retardo inicial de 10-20 segundos para todas las concentraciones de la  $Lch_{AL1.1}$ . La duración del período de retardo fue independiente de la concentración de LP. La velocidad de liberación de CF se incrementó al aumentar la concentración de la  $Lch_{AL1.1}$ , pero se pudo observar que la liberación no fue completa dentro del intervalo de tiempo de 5 min que se muestra en esta Figura. Por lo tanto se realizó otro experimento con tiempos de incubación más largos (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Liberación de CF de LUV de POPC inducida por la  $Lch_{AL1.1}$  tras la incubación durante tiempos largos. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 6.6 prolongando la incubación hasta 30, 60 y 120 min. Las concentraciones de la  $Lch_{AL1.1}$  fueron 2 (negro), 4 (gris claro) y 6-25  $\mu\text{M}$  (gris oscuro). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar (barras de error).

En la Figura 6.7 se puede observar que la liberación de CF continua incrementándose tras períodos de incubación más largos (30, 60 y 120 min) para todas las concentraciones de la  $Lch_{AL1.1}$ , y se completó (incluso para la concentración de 4  $\mu\text{M}$ ) después de 2 horas. Este proceso lento apoya de modo importante que no hay solubilización de las membranas bajo esta condiciones. Resultados similares se obtuvieron utilizando otras concentraciones más altas y más bajas de LUVs de POPC (5 y 50  $\mu\text{M}$ ).

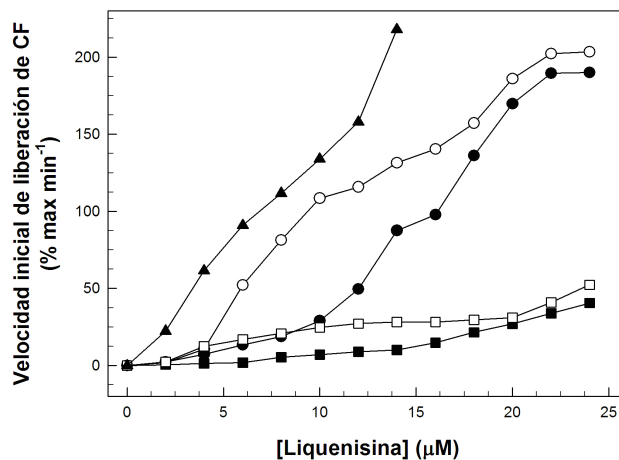
La cmc de la  $Lch_{AL1.1}$  (Coronel-León *et al.*, 2015) es del mismo orden de



magnitud que la publicada para otros BTs como ramnolípidos o lipopéptidos (Dufour *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que la Lch<sub>AL1.1</sub> (Figura 6.6) induce la liberación de solutos de bajo peso molecular, como la CF, desde los liposomas en un proceso lento. Estos resultados descartan la posibilidad de que la Lch<sub>AL1.1</sub> en estas proporciones tensioactivo/fosfolípido induzca la desintegración o solubilización de las membranas. Posiblemente, la incorporación de la Lch<sub>AL1.1</sub> dentro de dominios laterales de las membranas de LUV de POPC dio lugar a la formación de bicapas mixtas. Nuestra propuesta es que estos dominios podrían constituir defectos en la membrana lipídica, actuando como “poros” de tamaño selectivo que permiten la liberación de CF.

#### **6.2.1.5 Efecto de la composición de la membrana lipídica en la permeabilización inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub>**

Como se explicó anteriormente, la Lch<sub>AL1.1</sub> induce la salida completa de CF para todas las proporciones Lch<sub>AL1.1</sub>/POPC ensayadas, después de un período de incubación suficiente (aproximadamente 2 h). Así, para tener medidas cuantitativas de la velocidad de salida de CF para diferentes concentraciones de BT, se determinó la velocidad inicial de salida a partir de las tangentes a las curvas al comienzo de la liberación de CF, y se expresó como el % de liberación con respecto al máximo posible (determinado por desintegración de las vesículas con TX-100) por minuto. La dependencia de esa velocidad inicial de salida de CF en función de la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> se muestra en la Figura 6.8, para LUV de diferentes composiciones lipídicas. En todos los casos la velocidad inicial de salida aumentó con la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub> alcanzando un máximo en algunos casos (POPC y POPC/colesterol) o continuando en aumento aún a una concentración de 25  $\mu$ M.



**Figura 6.8.** Efecto de la composición de lípidos en la membrana sobre la velocidad inicial de salida de CF de LUVs inducida por la  $Lch_{AL1.1}$ . Los experimentos se realizaron como se explicó en la Figura 6.6 con LUVs de diferentes composiciones, tales como: POPC (círculos negros), POPC/colesterol 2:1 (círculos blancos), POPC/colesterol 1:1 (cuadrados blancos), POPC/POPE 1:1 (cuadrados negros), y POPC/DPPC 1:1 (triángulos negros). La concentración de fosfolípido fue de 25  $\mu$ M. Los datos corresponden a un experimento representativo.

Los resultados mostraron que la composición lipídica afecta en gran medida a la velocidad de liberación de CF. La incorporación de colesterol, POPE o DPPC en las membranas de POPC a 25°C dio lugar a una variedad de efectos. El efecto del colesterol fue particularmente interesante ya que fue dependiente de su concentración. En este sentido, una proporción alta (POPC/colesterol 1:1) hace que la velocidad de liberación de CF disminuya en comparación con el POPC puro, mientras que una relación más baja de POPC/colesterol (2:1), aumentaba la velocidad de salida de CF. Por otra parte la adición de POPE en proporciones 1:1, que se muestran en la Figura 6.8, provocaba la disminución de la velocidad de liberación de CF, lo que ocurrió también con otras proporciones estudiadas (datos no mostrados). Finalmente la inclusión de DPPC resulta en un incremento considerable de la velocidad inicial de liberación de CF al comparar con el POPC puro para todas las concentraciones de la  $Lch_{AL1.1}$  estudiadas.

Examinando la influencia de la composición lipídica de la bicapa en la salida de CF se puede conocer el mecanismo molecular subyacente. Los resultados mostraron que la composición lipídica afecta en gran medida a la velocidad de liberación de CF. Para todas las concentraciones de la  $Lch_{AL1.1}$  estudiadas, la inclusión de colesterol (1:1) y POPE en la membrana redujo

considerablemente la velocidad inicial de salida, mientras que la adición de DPPC aumentó la velocidad de liberación. La Lch<sub>AL1.1</sub> tiene un gran grupo como cabeza polar, que está formado por aminoácidos, y una pequeña porción hidrofóbica, formada por un ácido graso, y puede ser considerada como una molécula con geometría tipo cono invertido, confiriendo por tanto una curvatura positiva a las membranas en las que se incorpora (Cullis y de Kruijff, 1979). Probablemente esta explicación podría tener también alguna relación con el efecto del colesterol. Se ha descrito que la inclusión de 40-50% de colesterol en membranas de fosfatidilcolina evita casi completamente la permeabilización pasiva de CF e iones (Bhattacharya y Haldar, 2000), la salida de tóxicos medioambientales (Ortiz *et al.*, 2005) y la salida de contenidos inducida por tensioactivos (Apel-Paz *et al.*, 2005). Se sabe que en la bicapa el colesterol afecta al orden de las cadenas acílicas de los fosfolípidos, así como influye en las propiedades mecánicas de la membrana (Miao *et al.*, 2002; Henriksen *et al.*, 2006). El efecto protector del colesterol frente a la permeabilización inducida por Lch<sub>AL1.1</sub> podría ser el resultado del incremento en el movimiento de las cadenas acílicas de los fosfolípidos por este esteroide (Stockton y Smith, 1976; Miao *et al.*, 2002; Henriksen *et al.*, 2006), dando lugar a un empaquetamiento lipídico más compacto (Urbina *et al.*, 1995), haciendo por ello más difícil la inserción del biotensioactivo e impidiendo o disminuyendo así la formación de poros. El efecto del colesterol podría ser de particular interés si se tiene en cuenta que las membranas bacterianas no contienen colesterol, mientras que las membranas de células eucariotas contienen sobre un 50% (Miao *et al.*, 2002). Esto abre la posibilidad de aplicaciones de Lch<sub>AL1.1</sub> como un compuesto activo de membrana que podría distinguir entre células procariotas y eucariotas. No obstante, en nuestro trabajo hemos comprobado experimentalmente, por citometría de flujo (6.3.3.1), que tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas la Lch<sub>AL1.1</sub> no tiene capacidad de permeabilizar la membrana citoplasmática, lo cual se traduce en una débil actividad antimicrobiana de este compuesto. Esto indica, que además del colesterol otros componentes estructurales de las células procariotas participan en el control de la permeabilización, hecho ligado con la gran complejidad estructural de las envueltas bacterianas.

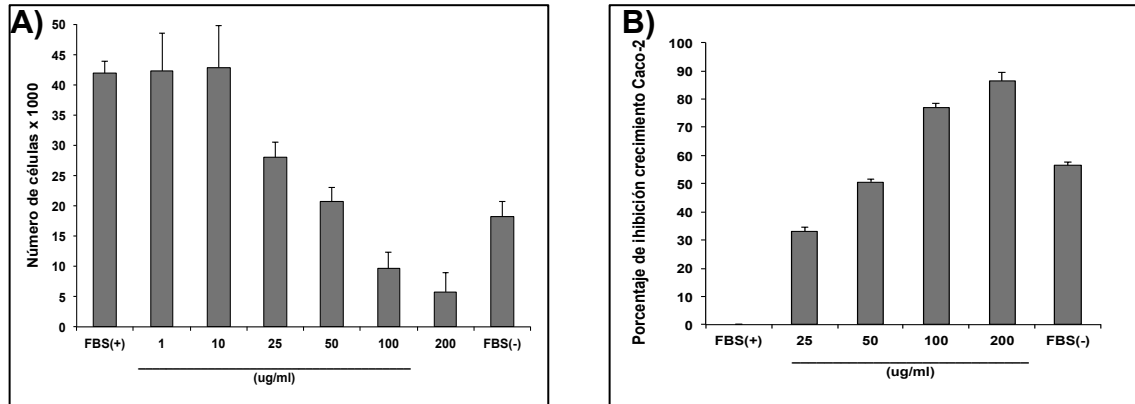
## 6.2.2 Efecto anti-proliferativo e inducción de apoptosis por la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre células no diferenciadas Caco-2 ATCC (HTB 37)

El cáncer es una de las mayores preocupaciones para la salud humana debido a la naturaleza impredecible de sus causas y por la dificultad de disponer de un tratamiento efectivo. Los tratamientos actuales, como la quimioterapia, son limitados en términos de seguridad y eficacia, debido a su alta toxicidad, además que pueden provocar la activación de resistencias en las células cancerígenas después de unos días de exposición. Esto ha motivado la búsqueda de nuevas moléculas anticancerígenas que sean eficaces y seguras (Dey *et al.*, 2015). Dentro de este contexto los LP han emergido como una nueva generación de posibles agentes anticancerígenos, debido a su alta eficacia y la facilidad para ser degradados (Gudiña y Rangarajan, 2013).

Estas razones motivaron el estudio del efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre las células epiteliales del intestino Caco-2 ATCC (HTB 37), procedentes de un adenocarcinoma de colon humano. Estas células se diferencian una vez han llegado a la confluencia tras 21-25 días en cultivo, y además, estas células constituyen un modelo *in vitro* extensamente utilizado en estudios relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio intestinal.

En primer lugar se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre la proliferación de las células Caco-2. Como control positivo se utilizó el crecimiento en presencia de suero fetal bovino (FBS), y como control negativo el crecimiento celular en ausencia de FBS. Los datos obtenidos de la Lch<sub>AL1.1</sub> se presentan la Figura 6.9. En la Figura 6.9A se observa una clara reducción del crecimiento celular, principalmente cuando las células son tratadas con concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> superiores a la cmc (15 µg/ml). Adicionalmente, en la Figura 6.9B, se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento celular, quedando claro que para concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> de 50 µg/ml se alcanza una reducción del crecimiento celular del 50%. Este valor se incrementa proporcionalmente al aumentar la concentración de la Lch<sub>AL1.1</sub>, y si comparamos con el control negativo FBS (-) se ve que la falta de este componente (FBS) provoca una reducción en el crecimiento celular menor

al efecto que se produce con las concentraciones más altas de la Lch<sub>AL1.1</sub> que se ensayaron. Concentraciones superiores a 50 µg/ml (100-200 µg/ml) produjeron que las células de Caco-2 se desprendiesen de la superficie donde se cultivaban, lo que sugiere un efecto citotóxico.

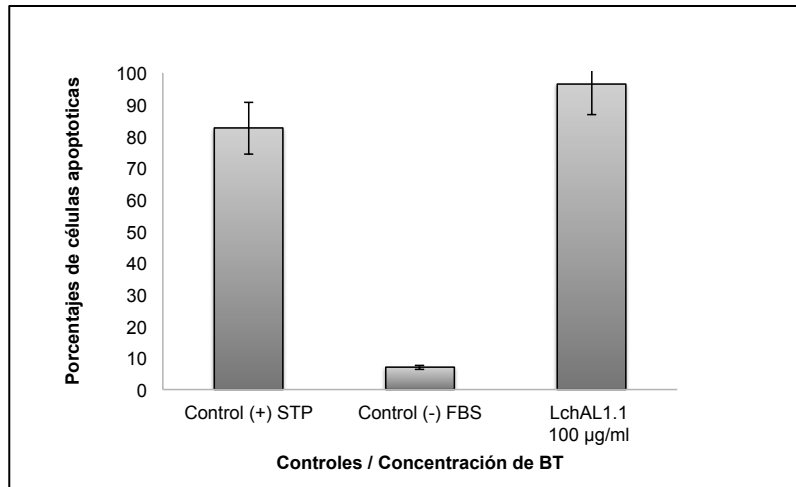


**Figura 6.9.** A) Número de células no diferenciadas de Caco-2 en presencia de diferentes concentraciones de la Lch<sub>AL1.1</sub> (1-200 µg/ml). B) Porcentaje de inhibición del crecimiento celular en función de las concentraciones de Lch<sub>AL1.1</sub> (25-200 µg/ml). Se incluyeron controles positivo FBS (+) y negativo FBS(-).

### 6.2.2.1 Inducción de la apoptosis por la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre las células Caco-2 (ATCC HTB 37)

La apoptosis o muerte celular programada se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula, y que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa, sin producir ningún tipo de reacción en los tejidos. La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia, y además, es necesaria para evitar la sobreproducción celular (Jacobson *et al.*, 1997). Con la finalidad de evaluar si la disminución de la viabilidad celular de Caco-2 por efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> se produce por apoptosis, se analizaron los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas. En este trabajo se estudió la fragmentación del DNA, mediante citometría de flujo. Para ello los cultivos de Caco-2 fueron incubados con 100 µg/ml de Lch<sub>AL1.1</sub> por 48 h. Se utilizó esta concentración ya que induce una inhibición del crecimiento celular mayor al 50%. Adicionalmente, se utilizaron dos controles, uno positivo, donde

las células se incubaron con estaurosporina como inductor de apoptosis (+STP, control positivo). El segundo control en presencia con suero fetal bovino (+FBS, control negativo).



**Figura 6.10.** Inducción de la apoptosis por la Lch<sub>AL1.1</sub> (100 µg/ml) en células no diferenciadas de Caco-2. Distribución representativa de células apoptóticas después del análisis de citometría de flujo. Control estaurosporina (+), Control con FBS (-) y Lch<sub>AL1.1</sub>.

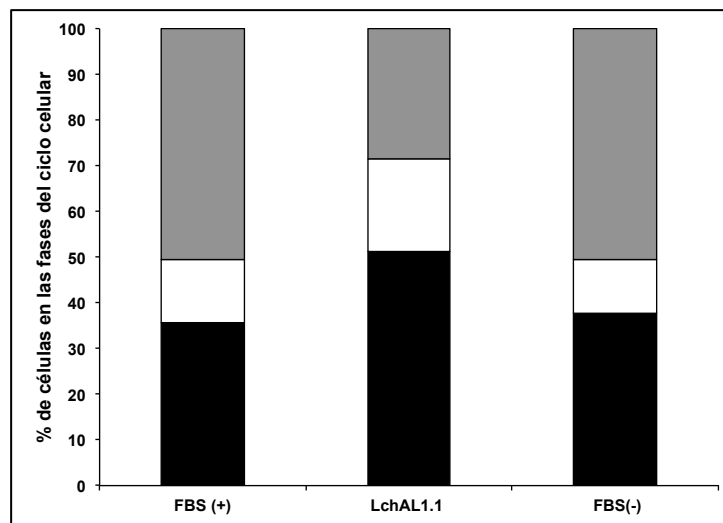
En la Figura 6.10 se puede observar que efectivamente la Lch<sub>AL1.1</sub> induce la apoptosis de las células Caco-2 dando como resultado un 96,5% de células apoptóticas. Como control negativo se utilizaron los cultivos en presencia de FBS obteniendo un 7,1% de células apoptóticas. Cabe destacar que el control positivo de estaurosporina, antibiótico que induce la apoptosis, solo alcanza un 82,6 % de apoptosis. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el descenso de viabilidad celular observada con la Lch<sub>AL1.1</sub> podría estar asociado principalmente a un proceso de apoptosis y no de citotoxicidad.

#### 6.2.2.2 Efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> en la regulación del ciclo celular

El ciclo celular pasa por una serie de etapas denominadas: G0/G1, S, G2 y M (las letra G significa intervalo o "gap", la S síntesis y la M mitosis). Esta secuencia se mantiene en prácticamente todas las células que proliferan y solo ocasionalmente alguna de las fases es omitida. La fase G1 es la primera por la que pasa una célula. Es la etapa más larga y más variable, y en ella se produce crecimiento celular hasta alcanzar el tamaño óptimo. En la fase S o de síntesis se duplica el ADN. Ésta es una acción compleja debido a la gran longitud de las hebras de ADN que forman un núcleo eucariota. Además, la

replicación del ADN debe cumplir dos condiciones: una sola replicación y cometer los menos fallos posibles. Cualquier error en la copia del ADN puede llevar a daños letales para las células hijas o incluso para la totalidad del organismo. La fase G2 es otra etapa de crecimiento, más breve que la G1, en la cual se acumulan los productos necesarios para la siguiente etapa, la fase M, en la que se producirá la división celular (Blomen y Boonstra, 2007).

Para analizar el efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> en el ciclo celular, la distribución de las células en cada fase se cuantificó por la determinación del contenido de ADN, mediante citometría de flujo, luego de que las células de Caco-2 se expusieron a la Lch<sub>AL1.1</sub> (100µg/ml) por 48 h. Efectivamente se pudo corroborar que la aplicación de Lch<sub>AL1.1</sub> afecta al ciclo celular de Caco-2, induciendo principalmente una acumulación de células en la fase S, con la consiguiente reducción en el porcentaje de células en la fase G0/G1 (Figura 6.11).



**Figura 6.11.** Efecto de la Lch<sub>AL1.1</sub> en el ciclo celular de Caco-2. Los cultivos de células no diferenciadas se incubaron con la Lch<sub>AL1.1</sub> (100 µg/ml) por 48 h y se analizaron por citometría de flujo: Las barras negras, blancas y gris representan el porcentaje de células en las fases S, G2/M y G0/G1, respectivamente. Los controles negativos de proliferación se realizaron en ausencia de FBS (-).

Estudios recientes demuestran que la acción anti-cancerígena de ciertos agentes quimioterapéuticos está involucrada en la inducción de la apoptosis y en la detención del ciclo celular, técnicas preferidas para gestionar el cáncer (Kim *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, hemos encontrado que la Lch<sub>AL1.1</sub>

muestra estas dos propiedades anti-cancerígenas. Así pues, la Lch<sub>AL1.1</sub> inhibe fuertemente la proliferación de células Caco-2, de una manera dependiente de la dosis. Por otra parte, los resultados de la regulación del ciclo celular obtenidos por citometría de flujo indican una reducción en el número de células en la fase G0/G1 del ciclo debido a la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub>, mientras que la población en la fase S se incrementa y acumula, lo que podría indicar que el ciclo celular se detiene en esta etapa. Este resultado es comparable a los resultados obtenidos por Storniolo *et al.*, (2014) quienes describen una acción similar utilizando trans-resveratrol (T-Rv) para la misma línea celular.

Obviamente, la acción de la Lch<sub>AL1.1</sub> necesita ser estudiada más en profundidad con el objetivo de determinar los *dianas* de Lch<sub>AL1.1</sub> dentro de la célula. Sin embargo, lo que sí está claro y es importante destacar es que el efecto de Lch<sub>AL1.1</sub> ocurre solamente a concentraciones por encima de la cmc (15 µg/ml). Este resultado sugiere que la reducción de viabilidad de las células inducida por la Lch<sub>AL1.1</sub> puede estar relacionada con la formación de agregados (micelas). Resultados similares fueron aportados por Burgos-Díaz *et al.*, (2013) quienes describieron una actividad apoptótica de la fracción A del BT producido por *Sphingobacterium detergens*, a partir de valores iguales o superiores a los de la cmc (0,2 g/L) para células Caco-2. Esta comparación demuestra que la acción apoptótica de la Lch<sub>AL1.1</sub> es mucho más efectiva que la del tensioactivo producido por *S. detergens* ya que se obtienen resultados similares empleando una concentración mucho menor (100 µg/ml). A pesar de que, efectivamente son necesarios estudios complementarios para conocer el efecto real de la Lch<sub>AL1.1</sub> sobre la línea celular Caco-2, su acción puede estar ligada a su capacidad de aumentar la permeabilidad de las membranas mediante la interrupción de las mismas. Esta acción se puede producir debido a cambios en la estructura de la membrana física o mediante la interrupción de la conformación de proteínas lo que ocasiona cambios en las funciones de las membranas (Zaragoza *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2003). Basamos esta hipótesis dado que anteriormente se demostró que la Lch<sub>AL1.1</sub> tiene la capacidad de formar “poros” en membranas experimentales y modelo, ocasionando la pérdida de la estabilidad de dichas membranas, a concentraciones por debajo de la cmc. En este caso la acción sobre las células



Caco-2 es a valores por encima de la cmc, lo cual supone una posible solubilización de las células de Caco-2.

Se ha descrito la acción de otros LP. Recientemente Dey *et al.*, (2015) indicaron que estos BT son capaces de inhibir diversas vías responsables del desarrollo del cáncer, como lo es la proliferación celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis. Dentro estos LP podemos destacar la acción de surfactina que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en la línea celular Lovo que son células de cáncer de colon (Kim *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la surfactina además de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis en células cancerígenas, también provoca la muerte celular de células MCF-7 causantes de cáncer de mama (Cao *et al.*, 2011). Hajare *et al.*, (2013) estudiaron el efecto de otro lipopéptido conocido como bacilomicina D, que causa la muerte celular dependiendo de la dosis para tres tipos de líneas celulares que son A549 (adenocarcinoma alveolar), A498 (carcinoma renal) y HCT-15 (adenocarcinoma de colon).

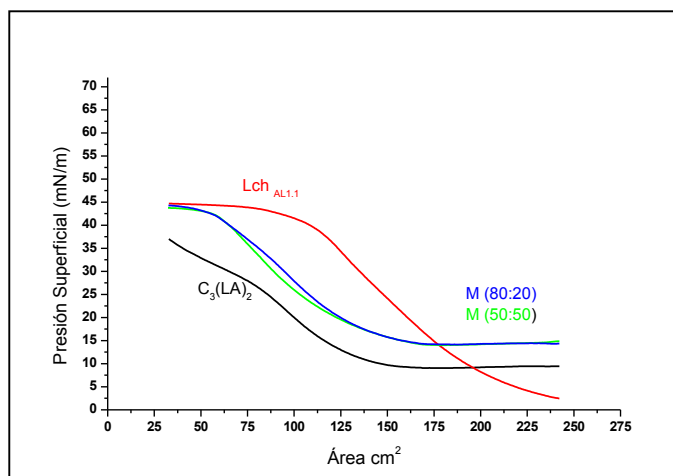
Finalmente, de acuerdo con la información recopilada, se puede concluir que la Lch<sub>AL1.1</sub> induce apoptosis en las células intestinales no diferenciadas de Caco-2, aunque se plantea la necesidad de realizar estudios complementarios para elucidar el mecanismo de inducción de la apoptosis en esta misma línea celular, de igual manera, extrapolar estos estudios algún otro modelo de línea celular cancerígena.

### 6.3 Nuevas aplicaciones: Interacción de liquenisina con tensioactivos geminales de arginina y lisina

Una alternativa que ha generado un gran interés es la posibilidad de utilizar agentes antimicrobianos en combinación, con la finalidad de ampliar su espectro antimicrobiano, prevenir la aparición de resistencias, reducir la toxicidad y proporcionar una actividad sinérgica (Galani *et al.*, 2014). En este sentido se evaluó la interacción de la Lch<sub>AL1.1</sub> con dos TS geminales con cadenas alquílicas de 12 átomos de carbono, uno derivado de la arginina (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>) y el otro de lisina (C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>). Productos que presentan importantes propiedades antimicrobianas (Perez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 2002; Colomer *et al.*, 2011).

#### 6.3.1 Isotermas de adsorción de Lch<sub>AL1.1</sub>-tensioactivos sintéticos.

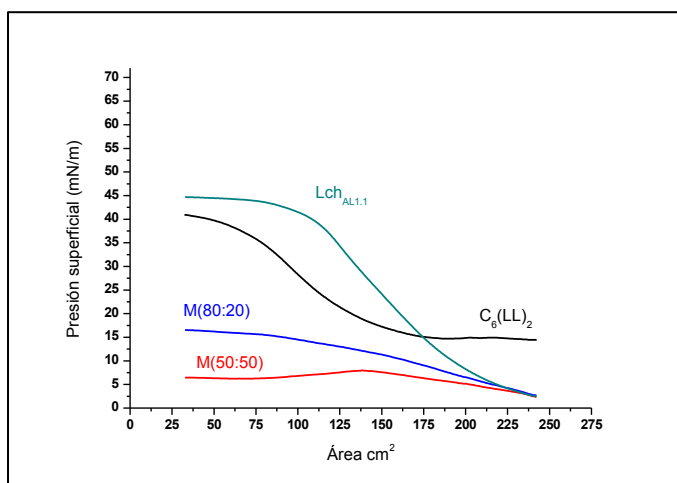
Con el fin de conocer las interacciones físico-químicas entre las moléculas de Lch<sub>AL1.1</sub> y los TS geminales (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>) se registraron las isotermas de compresión de las diferentes mezclas y se compararon con los productos puros. Las Figuras 6.12 y 6.13 muestran las isotermas presión superficial-área ( $\pi$ -A) de las monocapas de las mezclas de los TS geminal con la Lch<sub>AL1.1</sub> a pH 7,4. Las isotermas de los tensioactivos sintéticos y de la liquenisina presentan un perfil característico de compuestos parcialmente solubles. La isoterma del compuesto C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> (Figura 6.12) presenta una fase gaseosa (FG) amplia, la fase de líquido expandido (LE) empieza a valores de A de 75 cm<sup>2</sup> y se produce el colapso a valores de  $\pi$  cercanos a 26 mN/m. Por otro lado, la isoterma de la molécula de la Lch<sub>AL1.1</sub> presenta una FG muy corta, la fase de LE empieza a valores de A de 225 cm<sup>2</sup> y la fase de colapso aparece a valores de  $\pi$  cercanos a 45 mN/m. La subfase a pH=7,4 asegura que los compuestos en estudio estén ionizados.



**Figura 6.12.** Isotermas presión superficial-área de las monocapas de  $C_3(LA)_2$ ,  $Lch_{AL1.1}$  y las respectivas mezclas en la proporciones 80/20 y 50/50 a pH 7,4.

El compuesto  $C_3(LA)_2$  (tensioactivo geminal catiónico) está cargado positivamente ( $pK_a=9$ ), y la  $Lch_{AL1.1}$  posee una carga negativa. Los resultados muestran que las interacciones de las mezclas, independientemente de las proporciones (M80:20, M50:50, Figura 6.12), presentan un perfil similar. Las isotermas de las mezclas se encuentran entre las isotermas de los productos puros ( $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$ ), lo cual sugiere la formación de un “pseudotensioactivo” con 3 cadenas lipídicas. Esta fuerte interacción hidrófoba se explica al ver el valor inicial de  $\pi$ , que es cercano a 15 mN/m, y cuando alcanza la FC los valores de  $\pi$  son cercanos a los 45 mN/m similar al que se obtiene con la  $Lch_{AL1.1}$ .

La FC aparece a valores de  $A$  menores que para la isoterma de la  $Lch_{AL1.1}$ . Esto puede ser debido a que las interacciones electrostáticas son menores. La interacción de una molécula de la  $Lch_{AL1.1}$  con una de tensioactivo geminal da lugar a un pseudotensioactivo de 3 cadenas, una de las cargas catiónicas del tensioactivo geminal queda neutralizada por la negativa de la  $Lch_{AL1.1}$  por lo cual solo queda libre una carga positiva del compuesto geminal. Esto da lugar a una menor repulsión de las moléculas. El hecho de que las curvas no cambien al variar la proporción de tensioactivos en la mezcla, se puede atribuir a que los contra iones presentes en el  $C_3(LA)_2$  estabilizan a la molécula.



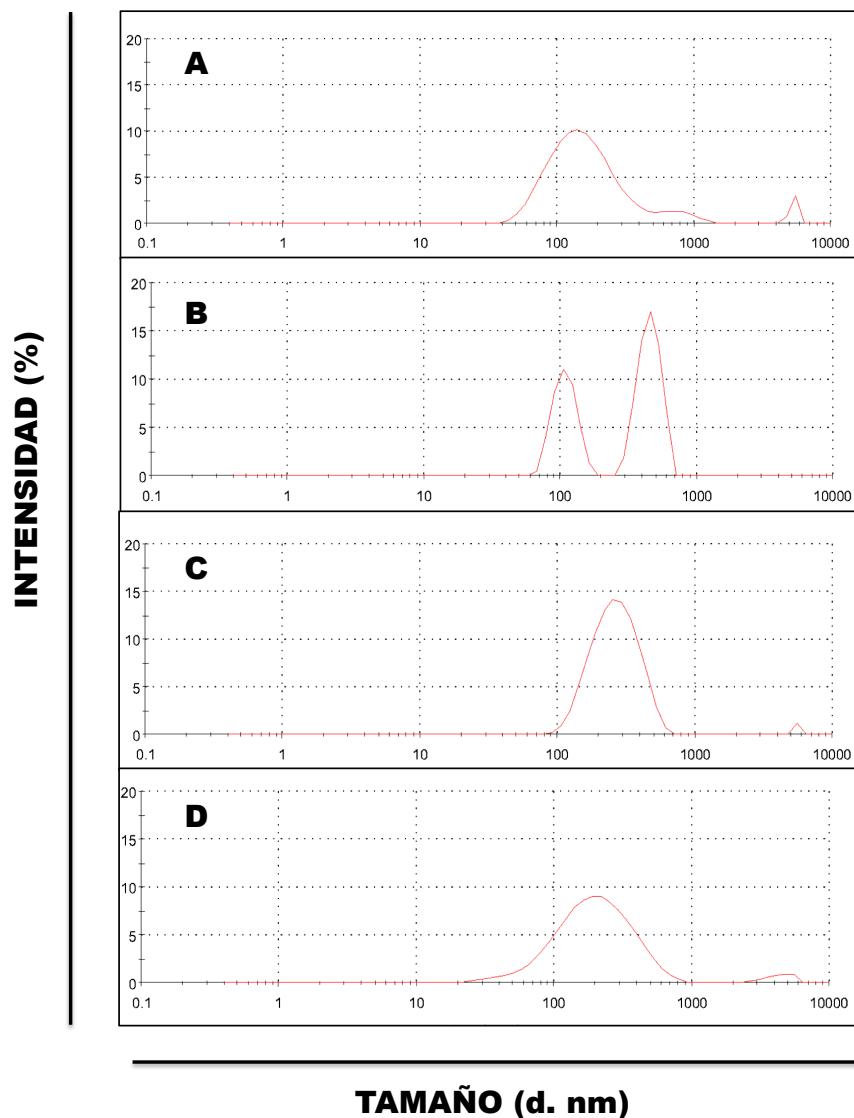
**Figura 6.13.** Isotermas presión superficial-área de las monocapas de  $C_6(LL)_2$ ,  $Lch_{AL1.1}$  y las respectivas mezclas en las proporciones 80/20 y 50/50 a pH 7,4.

La Figura 6.13 muestra el perfil de las monocapas obtenidas para el tensioactivo  $C_6(LL)_2$ , derivado de la lisina, así como para las mezclas de este tensioactivo con la  $Lch_{AL1.1}$ . El perfil de la monocapa de  $C_6(LL)_2$  es similar al de la monocapa de  $C_3(LA)_2$ . Sin embargo, las monocapas de la mezcla de este compuesto con la  $Lch_{AL1.1}$  son totalmente diferentes. Esto puede ser debido a que el valor del pKa del  $C_6(LL)_2$  es cercano al pH de la subfase, lo que se podría traducir en que solamente el 50 % de las moléculas estén ionizadas. En las mezclas de  $C_6(LL)_2/Lch_{AL1.1}$  no se observa con claridad los cambios de fases, lo cual indica que debido a la escasa interacción entre los compuestos, estas se solubilizan en la subfase. También se observa que los valores de la presión superficial alcanzados por la mezcla de  $C_6(LL)_2$  (15 mN/m) son inferiores a los obtenidos para la mezcla con  $C_3(LA)_2$  (45 mN/m).

### 6.3.2 Tamaño y zeta potencial

Los tensioactivos pueden formar diferentes tipos de agregados, entre los que se encuentran las vesículas. Las vesículas son agregados esféricos que contienen una o varias bicapas de tensioactivo. Debido a su estructura en su interior contienen dominios hidrófilos e hidrófobos y por lo tanto pueden solubilizar compuestos de diferente naturaleza. El tamaño o distribución de tamaños así como la densidad de carga superficial de las vesículas son parámetros importantes de cara a las posibles aplicaciones de las mismas.

Debido al interés que presentan este tipo de agregados, se ha determinado si las mezclas tensioactivo geminal de arginina/Lch<sub>AL1.1</sub>, que como se mencionó presentan una importante interacción, pueden formar vesículas. Se han preparado formulaciones de distintas composiciones (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/Lch<sub>AL1.1</sub>, 100:0, 80:20, 50:50, 0:100). Las formulaciones fueron preparadas a una concentración de 2 mM y pH=6.8. A continuación, para todas ellas se ha determinado el tamaño de los agregados así como la densidad de carga superficial mediante dispersión dinámica de luz (DDL o *DLS*, por sus siglas en inglés de "*Dynamic light Scattering*")



**Figura 6.14.** Distribución de la intensidad del tamaño de partículas de las dispersiones acuosas de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/ Lch<sub>AL1.1</sub> (2 mM) obtenidas por DLS a 25 °C. El tamaño está dado en escala logarítmica. **A)** C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/ Lch<sub>AL1.1</sub> (100:0), **B)** C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/ Lch<sub>AL1.1</sub> (0:100), **C)** C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/ Lch<sub>AL1.1</sub> (80:20) y **D)** C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/ Lch<sub>AL1.1</sub> (50:50).

La Figura 6.14 muestra la distribución de tamaños de las vesículas formadas. Para el  $C_3(LA)_2$  (Figura 6.14a) se puede observar una distribución de tamaños entre 30-800 nm, obteniendo un pico mayoritario a 194 nm. La solución de la  $Lch_{AL1.1}$  (Figura 6.14b) presenta una distribución bimodal con un pico a 100 nm y otro a 500 nm. Este comportamiento es similar al descrito por Arutchelvi *et al.*, (2014), para soluciones de surfactina, donde los agregados presentaban un tamaño promedio de 180 nm y 818 nm. Jauregi *et al.*, (2013) también encontraron la misma distribución bimodal para soluciones de surfactina a concentraciones cercanas a su cmc (10 mg/L), pero con valores de tamaño diferentes, un pico cercano a 68 nm y otro a 342 nm. Para otros lipopéptidos como micosubtilisina el tamaño de los agregados es aproximadamente 18 nm (Jauregi *et al.*, 2013).

Para las mezclas  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$ , se observa (Figura 6.14c,d) claramente que la incorporación de  $C_3(LA)_2$  en las dispersiones de la  $Lch_{AL1.1}$  da lugar a la pérdida de la distribución bimodal de la  $Lch_{AL1.1}$ , favoreciendo la formación de agregados con un tamaño promedio de aproximadamente 200 nm tanto para la mezcla 80/20 (Figura 6.14c) como para la mezcla 50/50 (Figura 6.14d). Esto confirma la fuerte interacción de los compuestos, como ya se explicó en el análisis de las isotermas. También se ha observado que el tamaño de los agregados aumenta con el tiempo. Este fenómeno también lo describió Arutchelvi *et al.*, (2014) para vesículas de surfactina.

El potencial zeta es una medida de la carga eléctrica en la superficie de los agregados y se determinó a partir de medidas de la movilidad electroforética (Lozano *et al.*, 2009). Como regla general, se considera que un sistema es electrostáticamente estable si el potencial zeta tiene un valor absoluto por encima de 20 mV. Cuando el potencial zeta es superior a este valor las soluciones coloidales son estables debido a las interacciones repulsivas entre agregados con la misma carga.

Las soluciones de la  $Lch_{AL1.1}$  presentan un potencial zeta de -37,6 mV. Este potencial negativo es debido a los grupos carboxilato de los residuos de Asp presentes en este compuesto. El  $C_3(LA)_2$  es un tensioactivo catiónico con 2 cargas positivas en los grupos guanidinos y por lo tanto presentan un

potencial zeta positivo de 49,7 mV. Como era de esperar, las dos mezclas de  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$  también presentan potencial zeta positivo. La muestra 50/50 posee el mismo número de moléculas de ambos compuestos, sin embargo el  $C_3(LA)_2$  posee 2 cargas positivas por molécula frente a la única carga negativa que presenta la  $Lch_{AL1.1}$ . Por lo tanto una molécula de la  $Lch_{AL1.1}$  puede neutralizar una carga del  $C_3(LA)_2$ . Lo más remarcable es que todas las soluciones presentan valores altos de potencial zeta, lo cual explica la estabilidad que muestran estas dispersiones. La repulsión entre los agregados es suficientemente fuerte para evitar la coagulación y la separación de fases. A pesar de que la carga es positiva en ambas mezclas, sus valores son ligeramente diferentes, es decir para la mezcla 80:20 el valor de zeta potencial es de 54 mV y para 50:50 es 66 mV.

### 6.3.3 Evaluación propiedades antimicrobianas

Posteriormente se planteó conocer las propiedades biológicas de las mezclas y establecer si hay una relación de sinergismo de forma similar a la que se produce en los tensioactivos cataniónicos (Salt *et al.*, 2009). Para lo cual, en un principio se determinaron las propiedades antimicrobianas de las mezclas  $C_6(LL)_2-Lch_{AL1.1}$  y  $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$  contra 12 microorganismos; cinco bacterias Gram negativas, seis Gram positivas y una levadura. Los resultados del estudio antimicrobiano se presentan en la Tabla 6.2 para los tensioactivos geminales derivados de lisina y sus formulaciones con la liquenisina ( $C_6(LL)_2-Lch_{AL1}$ ) y en la Tabla 6.3 para los tensioactivos geminales derivados de arginina y sus mezclas ( $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$ ). Es importante remarcar que la concentración máxima evaluada para la  $Lch_{AL1.1}$  fue de 250  $\mu$ M y no se encontró actividad antimicrobiana a esta concentración y por debajo con ninguno de los microorganismos ensayados.

Al analizar los valores de CMI obtenidos con los compuestos puros y las mezclas  $C_6(LL)_2-Lch_{AL1.1}$  (Tabla 6.2) es evidente que la actividad antimicrobiana del  $C_6(LL)_2$  mejora cuando está mezclado con la  $Lch_{AL1.1}$  con dos bacterias Gram positivas (*M. luteus* y *B. subtilis*) en ambas combinaciones ensayadas, a pesar de la baja interacción que existe entre  $C_6(LL)_2-Lch_{AL1.1}$ , tal como se describió en el estudio de las isothermas de adsorción.

**Tabla 6.2.** Valores de CMI para el geminal derivado de lisina (C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>) y sus respectivas mezclas con Lch<sub>AL1.1</sub> (80:20,50:50).

Microorganismo	C <sub>6</sub> (LL) <sub>2</sub> (µM)	Mezclas (µM) Geminal/Lipopéptido		
		80/20	50/50	Lipopéptido Lch <sub>AL1.1</sub> (µM)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	200	200	200	>250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	200	200	200	>250
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267	100	100	100	>250
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	100	100	100	>250
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	100	100	100	>250
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	100	100	100	>250
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	200	50	50	>250
<i>S. epidermis</i> ATCC 12228	50	50	50	>250
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	100	50	50	>250
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	100	100	100	>250
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	200	200	200	>250
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	200	200	>200	>250

Por otro lado, en la Tabla 6.3 se presentan los diferentes valores de CMI obtenidos con el C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y las mezclas con la Lch<sub>AL1.1</sub>. En este caso es muy notorio que la actividad antimicrobiana del C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y de Lch<sub>AL1.1</sub> se incrementan cuando se utilizan como una mezcla, principalmente en la proporción 80:20. El grupo que presenta una reducción significativa de las CMIs corresponde a las bacterias Gram negativas: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *Y. enterocolitica* ATCC 9610 donde los valores de CMI de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> se reducen de 125, 62,5 y 7,81 µM hasta los 6,25, 12,5 y 3,125 µM. En lo que se refiere a las bacterias Gram positivas; *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. epidermis* ATCC 12228, *M. luteus* ATCC 9341, MRSA y *L. monocytogenes* ATCC 15313 también evidencian una ligera reducción en los valores de CMI, un efecto similar ocurre con *C. albicans* ATCC 10231.

**Tabla 6.3.** Valores de CMI para el geminal derivado de arginina (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>) y sus respectivas mezclas con Lch<sub>AL1.1</sub> (80:20,50:50).

Microorganismo	C <sub>3</sub> LA <sub>2</sub> (µM)	Mezclas (µM) Geminal/Lipopéptido		
		80/20	50/50	Lipopéptido Lch <sub>AL1.1</sub> (µM)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	6,25	6,25	>250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	125	12,5	12,5	>250
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267	125	6,25	12,5	>250
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	62,5	12,5	50	>250
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	7,81	3,125	12,5	>250
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7,81	6,25	6,25	>250
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7,81	6,25	6,25	>250
<i>S. epidermis</i> ATCC 12228	7,81	6,25	6,25	>250
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	7,81	6,25	6,25	>250
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	7,81	6,25	25	>250
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	15,62	6,25	12,5	>250
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15,62	6,25	50	>250



Una vez obtenidos los valores de CMI de las mezclas C<sub>6</sub>(LL)-Lch<sub>AL1.1</sub> y C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-Lch<sub>AL1.1</sub>, es necesario confirmar si existe alguna relación de sinergismo. En este sentido se calculó la concentración inhibitoria fraccional (CIF) de acuerdo al método descrito por Saiman, (2007),

$$CIF = [(CMI_{AM}/CMI_A) + (CMI_{BM}/CMI_B)],$$

donde CMI<sub>AM</sub>= concentración del geminal en la mezcla, CMI<sub>A</sub>= concentración del geminal puro, CMI<sub>BM</sub>= concentración del lipopéptido en la mezcla y CMI<sub>B</sub>= concentración del lipopéptido puro. Al tener la Lch<sub>AL1.1</sub> una débil actividad antimicrobiana se ha considerado como valor de CMI la máxima concentración estudiada (250 μM). Dichos valores se presentan en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4.** Valores FIC obtenidos de las mezclas de compuestos C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub>-Lch<sub>AL1.1</sub> y C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-Lch<sub>AL1.1</sub> en la proporción 80:20.

Microorganismo	CIF	
	Geminal Lisina-Liquenisina	Geminal Arginina-Liquenisina
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,96	0,05
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,96	0,09
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267	0,88	0,05
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0,88	0,17
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	0,88	0,32
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,88	0,65
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,24	0,65
<i>S. epidermis</i> ATCC 12228	0,84	0,65
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0,44	0,65
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	0,88	0,65
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	0,96	0,33
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,96	0,33

De acuerdo con Saiman (2007), para la interpretación, consideramos que los valores de CIF ≤ 0,5 presentan sinergismo, mientras que los valores entre 0,5 y 1 indican que no existe sinergismo, para valores de 1 hasta 4 la acción se define como indiferente, y cuando los valores de CIF son superiores a 4 esto indican antagonismo (Saiman, 2007;Guo et al., 2010).

Al observar los valores presentados en la Tabla 6.4, es evidente que la acción de la mezcla C<sub>6</sub>(LL)-Lch<sub>AL1.1</sub> en términos generales no presenta sinergismo excepto para las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *M. luteus*, lo cual confirma que una escasa interacción no siempre indica una falta de sinergismo.

En cambio la mezcla  $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$  sí que actúan de forma sinérgica, presentando una importante mejora en la actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram negativas y *C. albicans*. Con las bacterias Gram positivas se evidencia una acción sinérgica con *L. monocytogenes*. La elevada interacción que presentan ambos compuestos, observada por las isotermas de adsorción y la capacidad de formar agregados, podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana de esta mezcla ( $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$ ), que podría derivar en importantes aplicaciones para el tratamiento de microorganismos causantes de infecciones.

Para profundizar en el mecanismo antimicrobiano de la mezcla  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$  (80:20) se seleccionaron dos microorganismos en los cuales se ha puesto de manifiesto un efecto sinérgico. Además ambos microorganismos están asociados a problemas de contaminación en la industria alimentaria. Por una parte *E. coli* O157:H7 productor de toxinas shiga y causante de infecciones gastrointestinales, tales como colitis hemorrágica, o Síndrome Urémico Hemolítico, que ponen en peligro la vida (Li et al., 2014). Y por otro lado, *L. monocytogenes* ATCC 15313 bacteria que afecta la seguridad en la industria alimentaria, ya que se encuentra en muchos productos alimenticios de origen animal pudiendo causar listeriosis que puede implicar meningitis, encefalitis, abortos y septicemia (de Araujo et al., 2011).

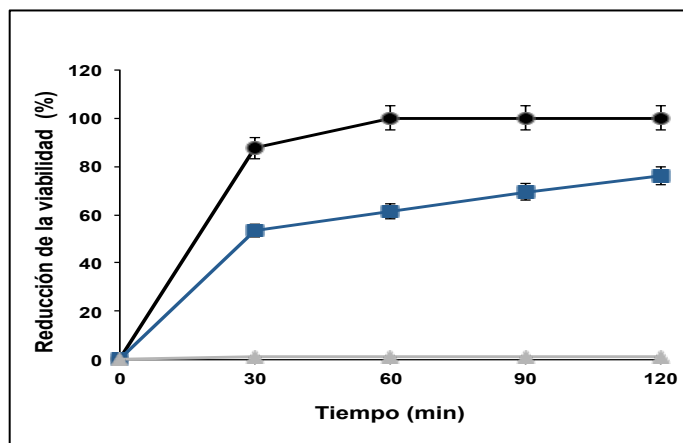
Se utilizó la mezcla  $C_3(LA)_2-Lch_{AL1.1}$  (80:20) a su correspondiente valor de CMI (6,25  $\mu$ M) y se realizaron las curvas de viabilidad por recuento en placa, además se estudió la viabilidad de la población por citometría de flujo, pérdida de iones potasio, y adicionalmente los daños estructurales fueron observados por microscopía electrónica. En todos los análisis se analizaron tanto el producto puro del  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  a su concentración equivalente en la mezcla 5 y 1,25  $\mu$ M respectivamente.

Para la citometría de flujo es importante mencionar que se utilizaron dos fluorocromos: bis-oxonol (BOX) que mide la despolarización de la membrana citoplasmática y el yoduro de propidio (IP) indicador del daño de la membrana celular o permeabilización. Cuando existe una despolarización de la membrana citoplasmática el BOX, que es un fluorocromo que posee carga negativa es

fácilmente absorbido por las células que tienen una carga ligeramente negativa o neutra (Joux y Lebaron, 2000). El IP que es un fluorocromo no permeable, cuando una célula está intacta este compuesto no entra, por lo que la absorción de estas moléculas por los microorganismos es una indicación de daño de la membrana citoplasmática indicando que está muerta (Novo *et al.*, 2000).

### 6.3.3.1 Efecto de la mezcla $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$ (80:20) sobre la viabilidad de cultivos de *E. coli* O157:H7

Se ha estudiado la capacidad antimicrobiana de la mezcla determinando la viabilidad bacteriana a diferentes tiempos, mediante recuento en placa. En la Figura 6.15, se muestra la reducción de viabilidad de *E. coli* O157:H7 ( $t=0$ :  $8,8 \times 10^7$  ufc/ml) luego del tratamiento con la mezcla (80:20) a su correspondiente CMI ( $6,25 \mu M$ ) y a diferentes tiempos de contacto. La reducción de la viabilidad luego de 30 minutos de tratamiento, alcanzó el 87,5% ( $1,1 \times 10^7$  ufc/ml). Para los tratamientos que se realizaron a 60, 90 y 120 minutos se encontró un reducción de la viabilidad bacteriana del 100%.



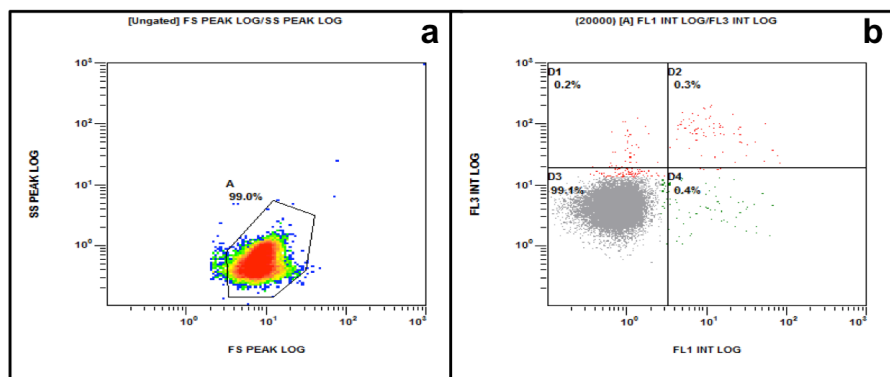
**Figura 6.15.** Efecto de distintos compuesto sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7 a la concentración de la CMI de la mezcla ( $6,25 \mu M$ ). Los cuadrados de color azul corresponde al compuesto de  $C_3(LA)_2$  (concentración equivalente en la mezcla). Los círculos de color negro corresponden a la mezcla. Los triángulos de color gris corresponden al lipopéptido  $Lch_{AL1.1}$ .

Simultáneamente se estudió el efecto del tensiactivo geminal de arginina  $C_3(LA)_2$  a la concentración equivalente en la mezcla, encontrándose que cuando el cultivo de *E. coli* O157:H7 ( $8,8 \times 10^7$  ufc/ml) se trató por 30 minutos la viabilidad se redujo en un 53,4% ( $4,1 \times 10^7$  ufc/ml). Un aumento en el tiempo de exposición produjo un descenso de la viabilidad, llegando a ser del 76,14%

después de 120 minutos (Figura 6.1). También se comprobó que la Lch<sub>AL1.1</sub> a la concentración equivalente en la mezcla en el tiempo estudiado no redujo la viabilidad de la población de *E. coli* O157:H7. Por lo tanto, cuando se comparó la acción de la mezcla y los productos puros tanto del geminal de arginina (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>) y el lipopéptido (Lch<sub>AL1.1</sub>) contra *E. coli* O157:H7, claramente la mezcla de los compuestos produjo una mayor pérdida de viabilidad en un tiempo menor de tratamiento, lo que pone de manifiesto un claro sinergismo en sus propiedades antimicrobianas.

### 6.3.3.2 Análisis por citometría de flujo de la población de *E. coli* O157:H7

Después del contacto con la mezcla C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/Lch<sub>AL1.1</sub> (80:20) y de haber teñido la población bacteriana, las células fueron analizadas considerando que el contacto del haz del láser con una célula produce dos tipos diferentes de dispersión: frontal y lateral. La dispersión frontal (*Forward Scatter, FS*) nos da información acerca del tamaño celular, mientras que la dispersión lateral (*Side Scatter, SS*) nos informa la granularidad celular. En la Figura 6.16a se presenta la población de *E. coli* O157:H7 no tratada y se indica que el 99% de las células tienen el mismo tamaño.



**Figura 6.16.** Análisis de citometría de flujo de la población control de *E. coli* O157:H7. a) Se muestra la dispersión frontal y lateral de toda la población. b) subpoblación de células intactas en gris (D3); subpoblación en rojo teñida con IP (D1,D2); y la subpoblación en verde teñida con bis-oxonol (D4).

En la Figura 6.16b se presenta el análisis de la población de *E. coli* O157:H7 antes del tratamiento con la mezcla, donde se obtienen los siguientes resultados: i) una población no teñida (gris) del 99,1% que corresponden a células intactas (D3), ii) una subpoblación de células coloreada de color verde de 0,4% (D4) que son aquellas que tienen despolarización de la membrana y

iii) finalmente aquellas marcadas de color rojo que significa una retención del IP, que corresponde a daños celulares provocados por permeabilización que son de 0,2 y 0,5% (D1-D2 respectivamente). Estos datos indican que los estudios se han realizado con una población homogénea y metabólicamente activa.

Se ha realizado un estudio con *E. coli* O157:H7 que se ha expuesto durante diferentes tiempos a la mezcla de tensioactivos, la respuesta de este microorganismo se ha estudiado por citometría de flujo. En la Tabla 6.5, se puede observar que tras 30 minutos de tratamiento de *E. coli* O157:H7 con la mezcla, tan solo el 8,1 % son células intactas (91,8% afectadas), lo cual indica que el tratamiento con el antimicrobiano produce un daño importante y rápido en la población de *E. coli* O157:H7. La población mayoritaria, del 64,8%, marcadas con BOX, es decir presentan una despolarización de la membrana que implica un bloqueo en la cadena respiratoria. Además también se evidencia una segunda población del 27 % marcadas con IP, lo cual indica que este fluorocromo ha ocupado el interior de la célula, por lo tanto estas células están además permeabilizadas, razón por lo que se consideran como células muertas. El efecto del antimicrobiano aumenta con el incremento en el tiempo de exposición. Luego de 90 minutos de tratamiento se encontró solamente un 0,6 % de células intactas (99,4% afectadas). La mayor parte de la población mostró un bloqueo en la cadena respiratoria, ya que el 83,4% de células fueron marcadas con BOX, mientras que las que retienen el IP fueron el 16%.

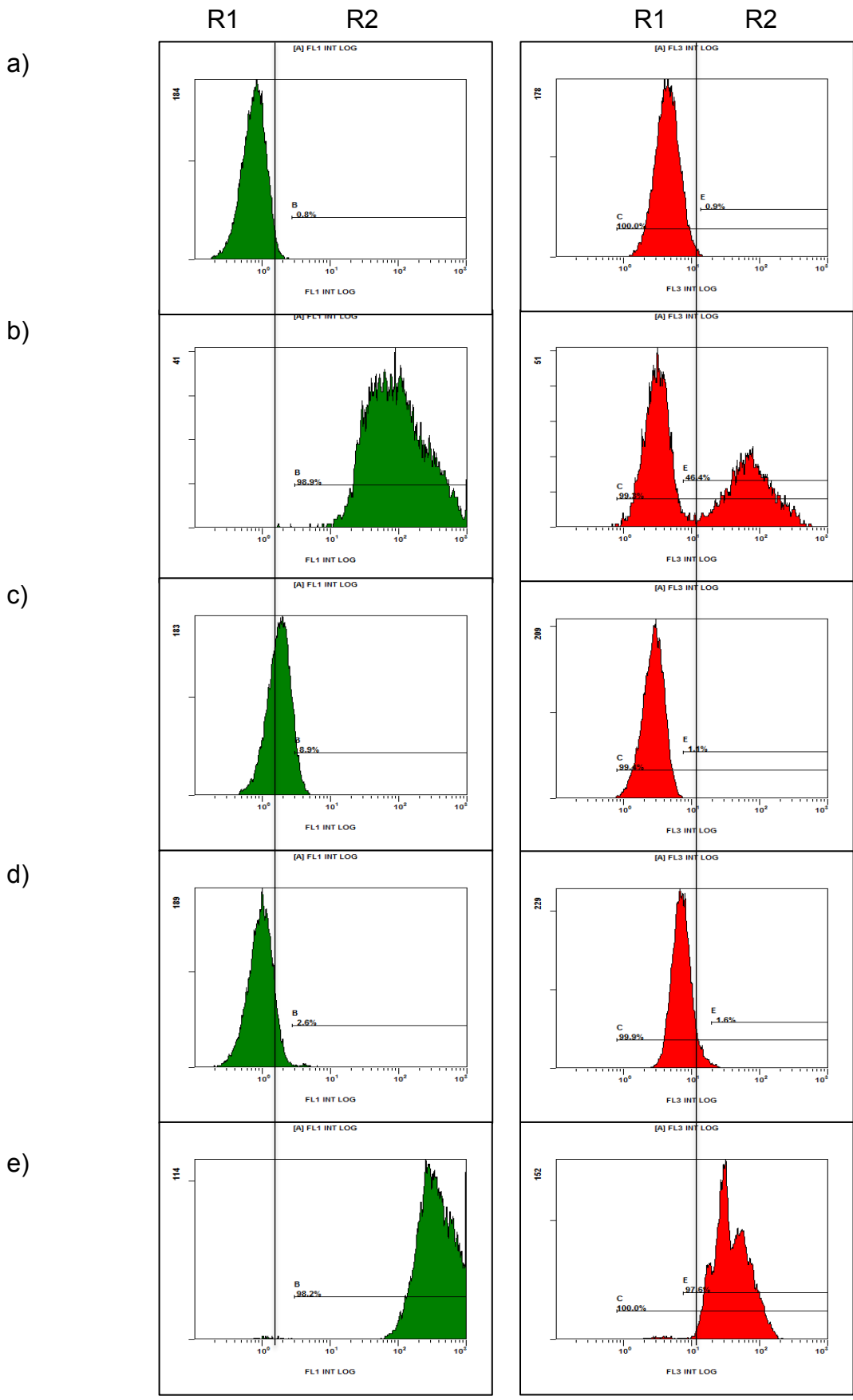
**Tabla 6.5.** Tabla comparativa de la acción de la mezcla sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7. Porcentaje de pérdida de viabilidad obtenidos por recuento en placa y el porcentaje de células afectadas, a 30,60,90 y 120 minutos de tratamiento al valor de la CMI. Control (-) células no tratadas. Control (+) células tratadas a 70°C.

Condiciones	Reducción de viabilidad (Recuento en placa) %	% Citometría de flujo		
		BOX	IP	Total células afectadas (%)
Control (-)	0,05	0,4	0,7	1,1
Tratamiento 30 min	87,5	64,8	27	91,8
Tratamiento 60 min	100	52,3	46,8	99,1
Tratamiento 90 min	100	83,4	16	99,4
Control (+)	100	1,8	97,7	99,5

Estos datos indican que el tratamiento con la mezcla provoca una importante despolarización de la membrana citoplasmática y también una

permeabilización, procesos responsables de la pérdida de viabilidad. También queda claro que la acción de la mezcla sobre las células de *E. coli* es dependiente del tiempo de tratamiento. Al comparar los resultados del estudio de viabilidad obtenidos por recuento y por citometría de flujo (Tabla 6.5) se observa que los valores hallados son similares, ya que indican un nivel semejante de células afectadas. Aunque a los 30 minutos de contacto existen algunas diferencias, ya que por recuento se obtiene que un 87,5% de células no viables, y por citometría un 91,8% de la población está afectada. En otras palabras esto quiere decir que no todas las células con despolarización de membrana son no viables. Sin embargo, de acuerdo a la información recopilada, se demuestra que la acción de la mezcla sobre *E. coli* O157:H7 produce la pérdida de la viabilidad bacteriana principalmente por despolarización y también por permeabilización de membranas.

Para comparar la acción de la mezcla respecto a la de los productos puros ( $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$ ) se realizó un análisis de los perfiles de fluorescencia a la concentración de la CMI (6,25  $\mu M$ ) y sus respectivas concentraciones en la mezcla, considerando el tratamiento por 60 minutos. El efecto de los compuestos sobre las envueltas celulares de *E. coli* se presenta en la Figura 6.17. Las columnas primera y segunda corresponden a los perfiles obtenidos por fluorescencia (BOX e IP). En el análisis se utilizaron dos controles. El control negativo corresponde a las células no tratadas que mantienen la membrana íntegra y se agrupan en la zona R1. La imagen de la Figura 6.17a corresponde a las células no tratadas. En el control positivo, las células fueron tratadas térmicamente (70°C, 120 min.), lo que produjo la pérdida total de viabilidad de la población y de acuerdo a los perfiles de fluorescencia se ubican en la zona R2. La imagen de la Figura 6.17e corresponde a las células tratadas con calor y no viables. El tratamiento con la mezcla (Figura 6.17b) provocó que el 98,9% de células que retuviesen BOX, mientras que la acción individual del  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  provocó una retención del 8,9 (Figura 6.17c) y el 2,6% (Figura 6.17d) respectivamente. Estos resultados apoyan que la acción de  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  se potencia de forma muy marcada cuando los tensioactivos se aplican como mezcla.



**Figura 6.17.** Análisis de citometría de flujo de la población de *E. coli* O157:H7 causada por la exposición a diferentes compuestos. Las intensidades relativa de la fluorescencia dentro de las regiones R1 fueron tomadas como células viables, y aquellas dentro de las regiones R2 fueron tomadas como células muertas (escala logarítmica). a) Células no tratadas control, b) Exposición con la mezcla  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$ , c) Exposición con el  $C_3(LA)_2$ , d) Exposición con  $Lch_{AL1.1}$  y e) Células tratadas a 70 °C. Columna de la izquierda representa el marcaje con Bis-oxanol (verde) y columna de la derecha representa el marcaje con IP (rojo). Todos los ensayos fueron realizado a 60 min de contacto y a la concentración de la CMI de la mezcla (6,25  $\mu$ M).

Respecto a la permeabilización celular, los resultados indican que se parte de una población donde solo existe un 0,9% de células permeabilizadas. La acción de la mezcla produce que esta población se incremente hasta un 46,8%. Si lo comparamos este resultado con el 1,1% (Figura 6.17c, columna derecha) y 1,6% (Figura 6.17d, columna derecha) de células permeabilizadas por acción individual de  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  respectivamente, se demuestra de nuevo el marcado sinergismo de la mezcla  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$ . Finalmente se compararon los resultados de viabilidad obtenidos por citometría de flujo y por recuento en placa (Tabla 6.6). Encontrando resultados similares en todos los casos, menos con el  $C_3(LA)_2$  ya que por citometría se encontró una pérdida de viabilidad del 8,9%, mientras que en el recuento fue de 69,3%. Estas diferencias pueden ser explicadas por la presencia de células que mantienen la integridad de la membrana pero pierden la capacidad de crecer en el medio. En la bibliografía este estado se define como células viables pero no cultivables (VNC) (Bouhdid *et al.*, 2010).

**Tabla 6.6.** Tabla comparativa de la acción de la mezcla  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$ ,  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7. Porcentaje de pérdida de viabilidad obtenidos por recuento en placa y el porcentaje de células afectadas analizadas por los perfiles de fluorescencia. A 60 minutos de tratamiento al valor de la CMI. Control (-) células no tratadas. Control (+) células tratadas a 70°C.

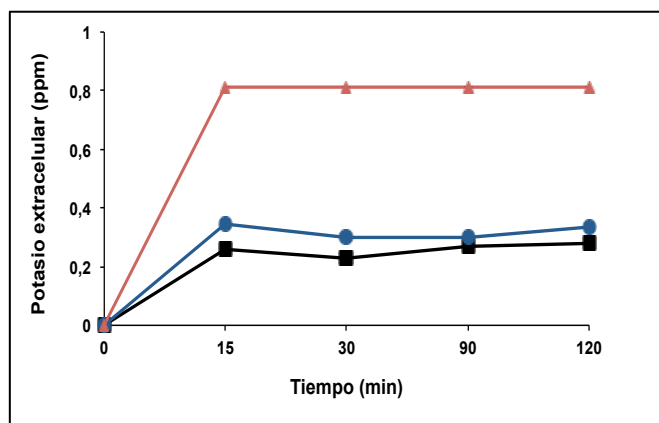
Condiciones	Reducción de viabilidad (Recuento en placa) %	% Citometría de flujo		
		BOX	IP	Total células afectadas (%)
Control (-)	0,05	0,8	0,9	1,7
Mezcla	100	52,3	46,8	99,1
$C_3(LA)_2$	69,3	7,8	1,1	8,9
$Lch_{AL1.1}$	1	1	1,6	2,6
Control (+)	100	1,8	97,7	99,5



### 6.3.3.3 Detección de la pérdida de potasio

Las observaciones realizadas por citometría de flujo indican la despolarización y permeabilización de las membranas de *E. coli* O157:H7 después del contacto con la mezcla. Estos efectos son consecuencia de alteraciones en la cadena respiratoria, en el transporte activo y pérdida de material intracelular, desencadenándose finalmente en la muerte celular. Otra forma de evaluar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la pérdida de material celular es medir la concentración de iones potasio presentes en el sobrenadante de los cultivos de *E. coli* O157:H7, después del tratamiento con los compuestos a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos con *E. coli* O157:H7 se muestran en la Figura 6.18.

En primer lugar se determinó el 100% de la pérdida del material intracelular para *E. coli* O157:H7 (Figura 6.18), para lo cual la suspensión celular fue sometida a un tratamiento térmico (70°C). Esta pérdida supuso una concentración de 0,81 ppm de  $K^+$  en el medio de cultivo.



**Figura 6.18.** Concentración del ión potasio en el sobrenadante de las suspensiones de *E. coli* O157:H7 preparadas en el tampón glicil-glicina. Tratadas con la mezcla (cuadrados negro). Tratadas con el  $C_3(LA)_2$  (círculos azul). Control de la pérdida de  $K^+$  (Triángulos rojo). La mezcla se preparó a la concentración de la CMI (6,25  $\mu M$ ), y el  $C_3(LA)_2$  a concentración equivalente de la mezcla. Tratamiento durante 120 minutos.

Como se puede ver en la Figura 6.18, tanto la mezcla como el  $C_3(LA)_2$ , presentan una cinética de la pérdida de  $K^+$  similar. Lo más destacable es que esta pérdida ocurre muy rápido, tanto así que a los 15 minutos se alcanza la cantidad máxima de pérdida de  $K^+$  para ambos compuestos, siendo 0,26 ppm para la mezcla y 0,34 ppm para el  $C_3(LA)_2$ . En ambos caso la concentración de  $K^+$  no se incrementa conforme transcurre el tiempo del tratamiento.

Gráficamente es muy notorio que la cantidad de  $K^+$  que se pierde por acción de ambos compuestos es mucho menor que el total posible (0,81 ppm). Si comparamos el resultado obtenido en este ensayo (respuesta similar) y el resultado por citometría de flujo, hay divergencia ya que en esta última prueba se encuentra una permeabilización muy superior con la mezcla.

En cualquier caso esta información nos permite corroborar que la mezcla provoca la permeabilización de las membranas de *E. coli* O157:H7 con la subsiguiente pérdida del material intracelular.

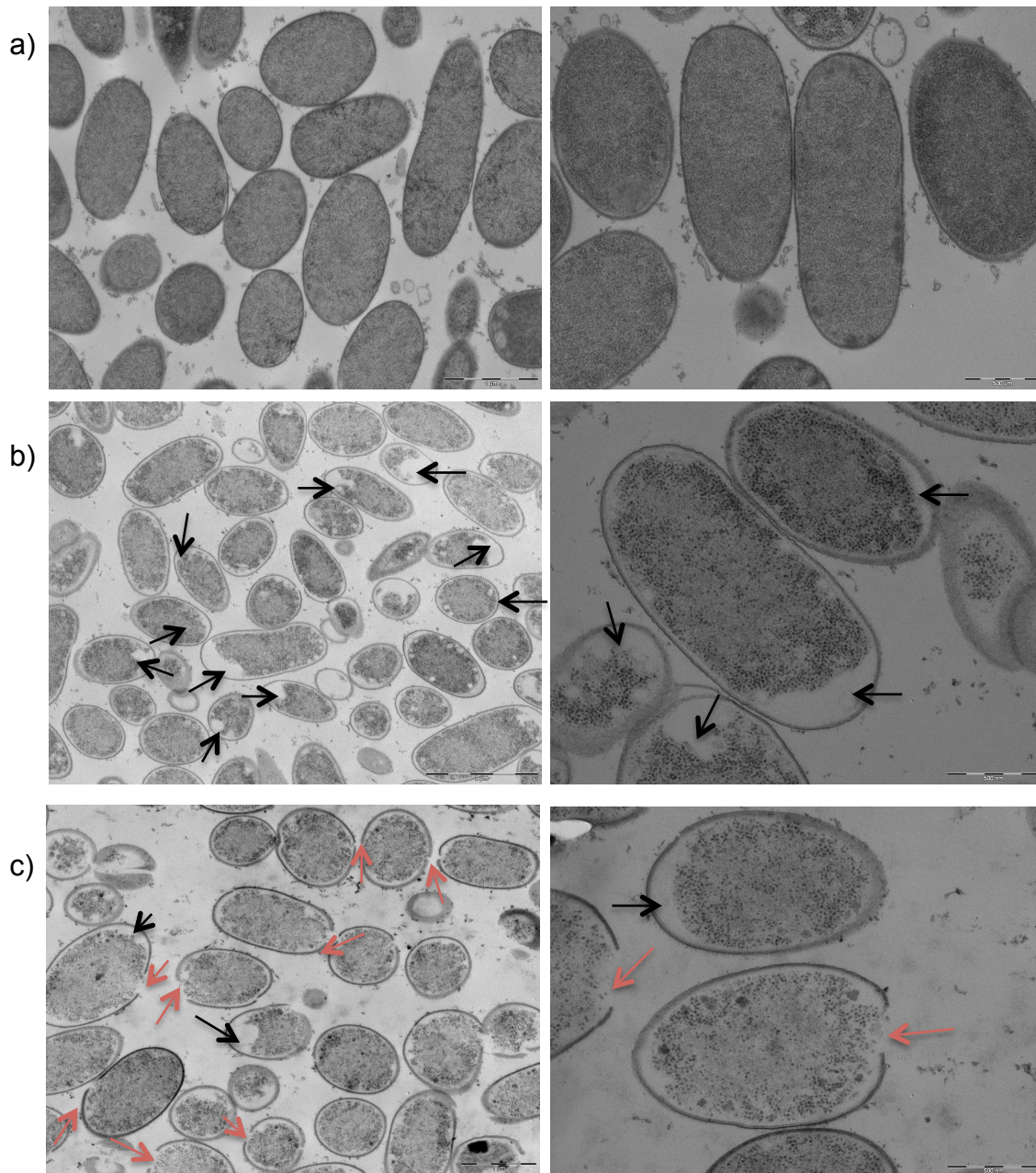
#### **6.3.3.4 Efecto de la mezcla sobre la ultraestructura de *E. coli* O157:H7**

Como se ha indicado para observar los daños celulares estructurales producidos por los compuestos estudiados se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 6.19a (Izquierda y derecha) se muestran las micrografías de las células no tratadas de *E. coli* O157:H7. Se puede destacar las membranas intactas, con un citoplasma granular y homogéneo.

En primer lugar se analizó el efecto del  $C_3(LA)_2$  purificado, resultado que se presenta en la Figura 6.19b. En este caso se observan alteraciones a nivel de la membrana citoplasmática, las flechas negras señalan aquellas zonas donde se evidencia una contracción del citoplasma. A pesar de que la membrana celular en algunos casos ha perdido la integridad parece que en la mayoría de las células permanece entera.

Por otro lado, cuando la suspensión de *E. coli* O157:H7 ( $10^7$  ufc/ml) fue tratada con la mezcla a la concentración de la CMI, los daños estructurales ocasionados se pueden observar en la Figura 6.19c. En la Figura izquierda se señalan con flechas negras algunas zonas blancas, que indican zonas con una condensación del citoplasma y recogimiento de la membrana citoplasmática. Además se puede observar que hay zonas señaladas con flechas rojas donde se ha producido una ruptura de la membrana citoplasmática y la pared, esta acción es diferente a la del producto solo del  $C_3(LA)_2$ , ya que con la mezcla el efecto es más drástico y pone de manifiesto una gran permeabilización de la membrana, tal como se puede observar en la Figura 6.19c derecha, donde los

daños a nivel de las envueltas son más evidentes (Flechas rojas), además esta imagen evidencia la pérdida del material citoplasmático (zonas claras).



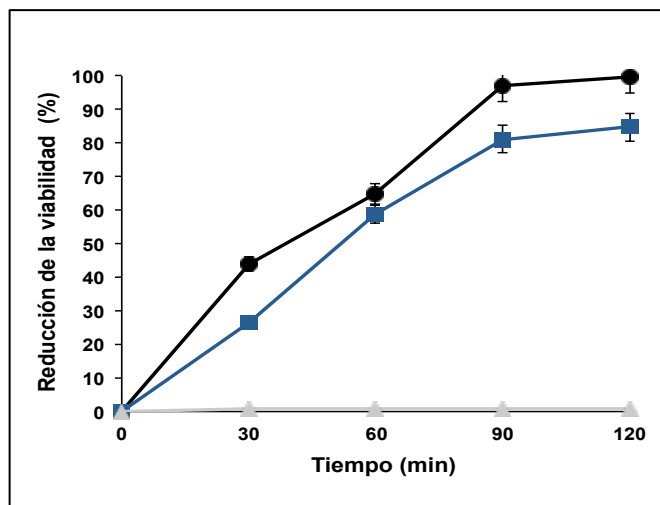
**Figura 6.19.** Micrografía electrónica de las células de *E. coli* O157:H7 no tratadas, tratadas con la mezcla a la concentración de 6,25  $\mu$ M y con el  $C_3(LA)_2$  a la concentración equivalente en la mezcla por 2 horas de tratamiento. a) Control izquierda (25X) y derecha (40X). b) Tratada con el  $C_3(LA)_2$ , izquierda 20X y derecha 50X y c) Tratada con la mezcla  $C_3(LA)_2/LCh_{AL1.1}$  (80:20), izquierda 15X y derecha 50X.

Estos daños visualizados son indicativos de muerte celular y confirman los resultados encontrados anteriormente, ya que por citometría de flujo y estudio de la pérdida de potasio, se indicaba la permeabilización de las

membranas de *E. coli* O157:H7, además en esta misma imagen (Flechas negras) se puede observar con mayor claridad la pérdida del contenido del citoplasma.

### 6.3.3.5 Efecto de la mezcla $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$ (80:20) sobre la viabilidad de cultivos de *L. monocytogenes*.

Se ha estudiado la supervivencia de *L. monocytogenes* a la mezcla  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$  (80:20). Se escogió este microorganismos como modelo de bacteria Gram positiva que crea problemas de contaminación en industria alimentaria. En la Figura 6.20 se presentan los resultados obtenidos de la reducción de viabilidad de *L. monocytogenes* ( $t=0$ :  $3,40 \times 10^7$  ufc/ml) luego del tratamiento con la mezcla (80:20) a su correspondiente CMI ( $6,25 \mu M$ ) y a diferentes tiempos de contacto. Un tratamiento de 30 minutos produjo un reducción de la viabilidad de la población de *L. monocytogenes* del 44,1%. Este descenso de viabilidad aumentó al incrementar el tiempo de contacto llegando a valores del 90% con 90 y 120 min de contacto.



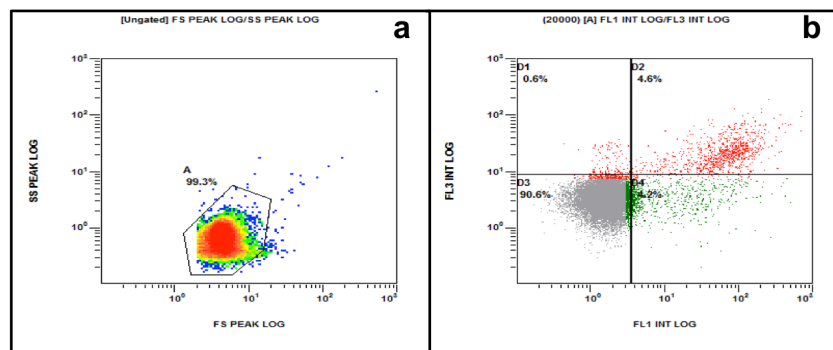
**Figura 6.20.** Efecto de distintos compuestos sobre la viabilidad de *L. monocytogenes* a la concentración de la CMI de la mezcla ( $6,25 \mu M$ ). Los cuadrados de color azul corresponde al compuesto de  $C_3(LA)_2$  (concentración equivalente en la mezcla). Los círculos de color negro corresponde a la mezcla. Los triángulos de color gris corresponde al lipopéptido  $Lch_{AL1.1}$ .

Cuando el tratamiento de la población de *L. monocytogenes* ( $t=0$ :  $5,85 \times 10^7$  ufc/ml) se realizó con el geminal de arginina  $C_3(LA)_2$  se encontró que el descenso de viabilidad fue un poco menor y también fue en aumento con el tiempo, siendo del 26,5% después de 30 minutos de contacto y llegando a ser del 81,2% después de 120 min. De igual manera, es importante mencionar

que la actividad antimicrobiana de la Lch<sub>AL1.1</sub> a la concentración de la CMI de la mezcla (1,25 µM), dentro de los tiempos estudiados, no afectó la viabilidad de la población de *L. monocytogenes* (Figura 6.20).

### 6.3.3.6 Análisis por citometría de flujo de la población de *L. monocytogenes*.

En la Figura 6.21a se presenta la respuesta de la población de *L. monocytogenes* ATCC 15313 no tratada y se indica que el 99,3% de las células tienen el mismo tamaño. La Figura 6.21b indica que la población de *L. monocytogenes* antes del tratamiento presenta el siguiente tipo de células: i) una población no teñida (gris) que corresponde al 90,6% de células intactas (D3), ii) una subpoblación de células coloreada de color verde de 4,2% (D4) que presentan despolarización de la membrana y iii) finalmente aquellas que presentan un color rojo que significa una retención del IP, que corresponde a daños celulares provocados por permeabilización de membranas que son de 0,6 y 4,6% (D1-D2 respectivamente). Por lo tanto, igual que en el caso anterior, se inicia el ensayo con una población homogénea y viable.



**Figura 6.21.** Análisis de citometría de flujo de la población control de *L. monocytogenes* ATCC 15313. a) Se muestra la dispersión frontal y lateral de toda la población. b) subpoblación de células intactas en gris (D3); subpoblación en rojo teñida con IP (D1,D2); y la subpoblación en verde teñida con bis-oxonol (D4).

Después de 30 min de contacto con la mezcla el 40,7% de la población presenta la membrana citoplasmática despolarizada (teñida con BOX) y este valor permanece estable con el tiempo (Tabla 6.7, 30-120 minutos). La permeabilización celular (tinción con IP) incrementa con el tiempo, detectándose a los 90 min un 28,4% de las células marcadas con IP, lo que significa un 64,4% de las células afectadas a nivel de envueltas. Si se comparan estos resultados con los obtenidos previamente con *E. coli* O157:H7

se observa que frente a esta bacteria Gram positiva el efecto inhibitorio de la mezcla es menor y más lento. Además al comparar los resultados obtenidos en la viabilidad por recuento en ambos microorganismos (Tabla 6.5 y 6.7) también se observa una tendencia similar.

El efecto de la mezcla contra *L. monocytogenes* se comparó con los resultados obtenidos por recuento en placa. En la Tabla 6.7 se puede observar que las células marcadas con BOX luego del tratamiento durante 30 y 60 minutos han perdido la viabilidad, situación que se confirma al comparar con los resultados obtenidos por contaje en placa. Aunque a 30 minutos existen algunas diferencias ya que por recuento se obtiene que el 44,1% son células no viables, y por citometría se indica que el 53,3% de la población está afectada, lo que demuestran en este caso que no todas las células con despolarización de membrana se consideran como no viables. También a 90 minutos existen divergencias, en el sentido de que por recuento se obtiene una pérdida de viabilidad del 90% mientras que por citometría se encuentra solamente un 64,4% de células no viables. Estas diferencias pueden ser explicadas por la presencia de células que mantienen la integridad de la membrana pero pierden la capacidad de crecer en el medio tal como se explicó anteriormente.

**Tabla 6.7.** Tabla comparativa de la acción de la mezcla sobre la viabilidad de *L. monocytogenes* ATCC 15313. Porcentaje de pérdida de viabilidad obtenidos por recuento en placa y el porcentaje de células afectadas, a 30,60,90 y 120 minutos de tratamiento al valor de la CMI. Control (-) células no tratadas. Control (+) células tratadas a 70°C.

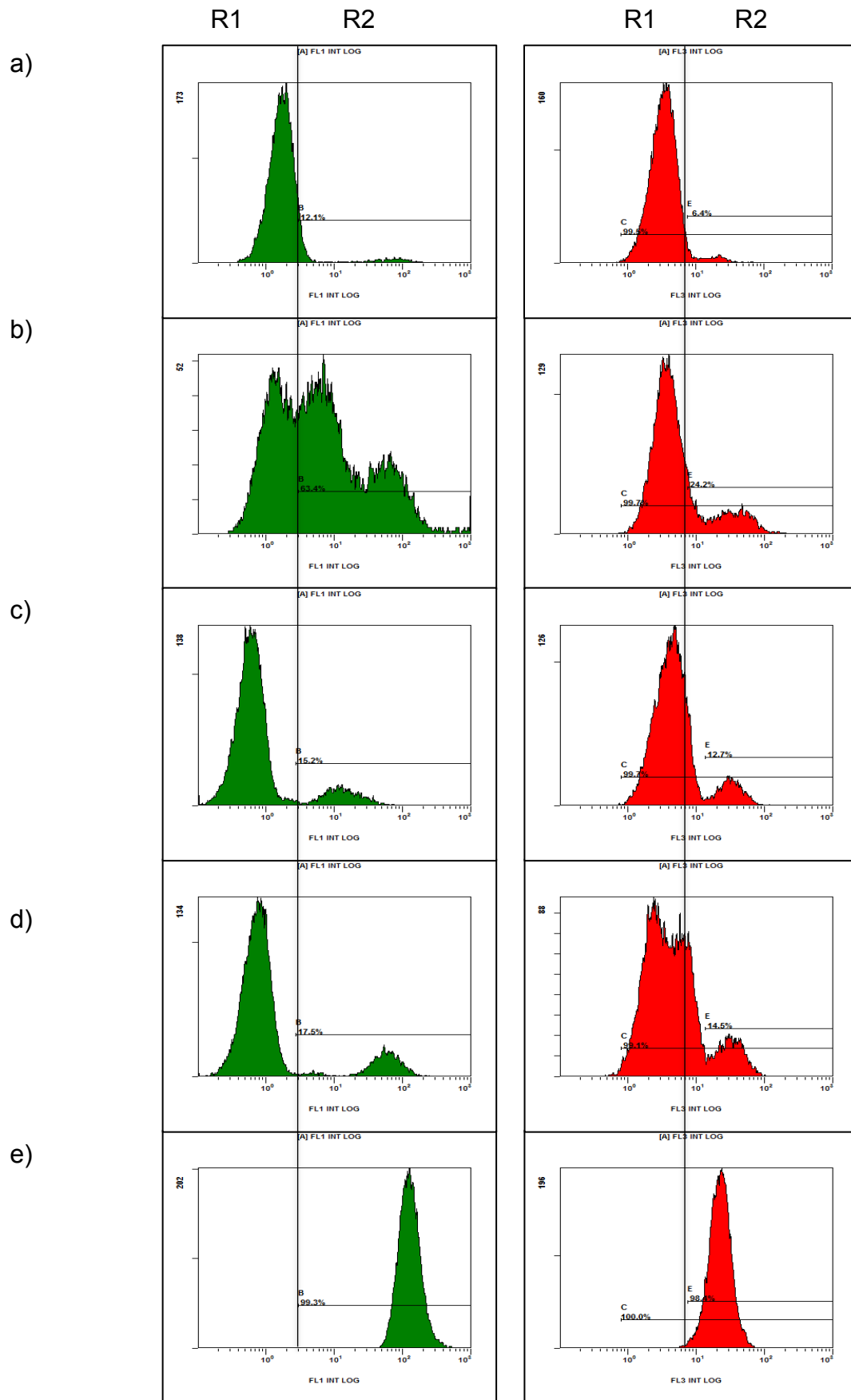
Condiciones	Reducción de viabilidad (Recuento en placa) %	% Citometría de flujo		
		BOX	IP	Total células afectadas (%)
Control (-)	0,1	12,1	6,4	18,5
Tratamiento 30 min	44,1	40,7	12,6	53,3
Tratamiento 60 min	64,7	38,4	26	64,4
Tratamiento 90 min	90	36	28,4	64,4
Control (+)	100	1,2	98,6	99,8

Se evaluó la respuesta de *L. monocytogenes* a la mezcla  $C_3(LA)_2/Lch_{AL1.1}$  y a los productos purificados ( $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$ ) a la concentración de la CMI de la mezcla (6,25  $\mu$ M) con un tiempo de tratamiento de 60 minutos. Los resultados se presenta en la Figura 6.22, al igual que con el

microorganismo anterior, las dos columnas muestran los perfiles de fluorescencia. Las Figuras 6.22a y 6.22e son los controles negativo y positivo, observándose respectivamente, la respuesta con las membranas íntegras y la respuesta en una población permeabilizada.

El tratamiento con la mezcla provoca que un 63,4% de células de *L. monocytogenes* retengan el BOX (Figura 6.22b), mientras que la acción del  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  provoca un 15,2 (Figura 6.22c) y un 17,5 % (Figura 6.22d) de células despolarizadas respectivamente. En ambos caso se confirma que la acción de  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  se potencia cuando se aplican como mezcla, lo que da lugar a corroborar el importante sinergismo que existe entre estos productos. También queda claro que el compuesto afecta principalmente a la cadena respiratoria celular.

Al analizar los perfiles de fluorescencia de las células marcadas con IP se observa que la mezcla produce un 24,2% de células permeabilizadas, valor más elevado que el 12,7 (Figura 6.22b) y 14,5% (Figura 6.22c) de las células permeabilizadas por acción del  $C_3(LA)_2$  y  $Lch_{AL1.1}$  respectivamente. La población no tratada presenta un 6,4% de células que retienen IP. Estos resultados muestran que la mezcla además de afectar la cadena respiratoria, también provoca la permeabilización de las células de *L. monocytogenes*, pero con una respuesta inferior que en *E. coli*.





**Figura 6.22.** Análisis de citometría de flujo de la población de *L. monocytogenes* ATCC 15313 causada por la exposición a diferentes compuestos. Las intensidades relativa de la fluorescencia dentro de las regiones R1 fueron tomadas como células viables, y aquellas dentro de las regiones R2 fueron tomadas como células muertas (escala logarítmica). a) Células no tratadas control, b) Exposición con la mezcla C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/Lch<sub>AL1.1</sub>, c) Exposición con el C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>, d) Exposición con Lch<sub>AL1.1</sub> y e) Células tratadas a 70 °C. Columna de la izquierda representa el marcaje con Bis-oxanol (verde) y columna de la derecha representa el marcaje con IP (rojo). Todos los ensayos fueron realizado a 60 min de contacto y a la concentración de la CMI de la mezcla (6,25 µM).

Finalmente en la Tabla 6.8 se puede apreciar una comparación de la acción de la mezcla y los productos que lo conforman, considerando el recuento en placa y la citometría de flujo. Para la acción de la mezcla se encuentran resultados similares de pérdida de viabilidad por ambas técnicas. No obstante, es con el geminal de arginina (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>) y el lipopéptido (Lch<sub>AL1.1</sub>) donde hay ciertas diferencias. El C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> provoca una afectación del 15,2% y la Lch<sub>AL1.1</sub> un 17,5%, es necesario referirnos al control para darnos cuenta que estos porcentajes de pérdida de viabilidad son similares a los encontrado en la población no tratada (18,5%). Por lo que se descarta, al menos con Lch<sub>AL1.1</sub>, que el porcentaje encontrado sea debido a su acción ya que por contaje en placa no se evidencia pérdida de viabilidad. No obstante, con el C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> ocurre lo contrario ya que por contaje en placa se encuentra un 60% de mortalidad mientras que por citometría el valor obtenido (15,2%) no se corresponde. Estas divergencia se podría explicar por la presencia de células viables pero no cultivables.

**Tabla 6.8.** Tabla comparativa de la acción de la mezcla C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>/Lch<sub>AL1.1</sub>, C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> y Lch<sub>AL1.1</sub> sobre la viabilidad de *L. monocytogenes*. Porcentaje de pérdida de viabilidad obtenidos por recuento en placa y el porcentaje de células afectadas analizadas por los perfiles de fluorescencia. A 60 minutos de tratamiento al valor de la CMI. Control (-) células no tratadas. Control (+) células tratadas a 70°C.

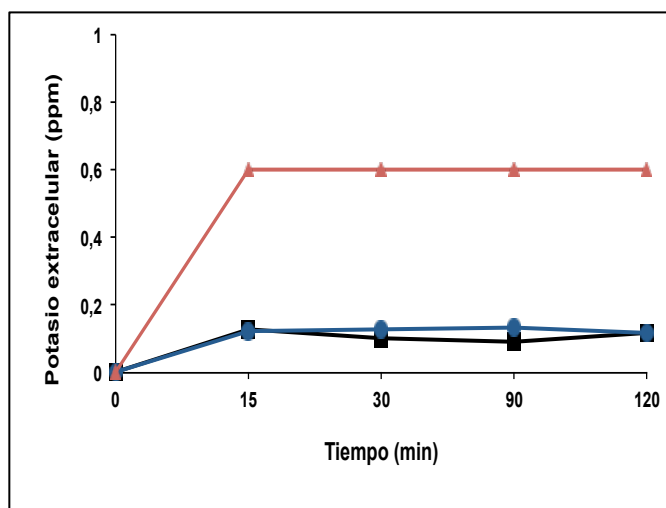
Condiciones	Reducción de viabilidad (Recuento en placa) %	% Citometría de flujo		
		BOX	IP	Total células afectadas (%)
Control (-)	0,1	12,1	6,4	18,5
Mezcla	64,7	39,2	24,2	63,4
C <sub>3</sub> (LA) <sub>2</sub>	60	2,5	12,7	15,2
Lch <sub>AL1.1</sub>	1	3	14,5	17,5
Control (+)	100	1,2	98,6	99,8

En general, estos resultados sugieren que la acción de la mezcla contra *L. monocytogenes* ocurre inicialmente por despolarización de las membranas, que posteriormente desencadena la permeabilización de las mismas

ocasionando la pérdida de viabilidad celular.

### 6.3.3.7 Detección de la pérdida de potasio

En el análisis previo de citometría de flujo, indicó que en la población de *L. monocytogenes* se afectaba por despolarización y permeabilización de las membranas después 60 min de contacto con la mezcla. Para evaluar la permeabilidad de la membrana citoplasmática mediante la pérdida de material celular se midió la concentración de potasio presente en el sobrenadante de cultivo de *L. monocytogenes* después de los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la Figura 6.23.



**Figura 6.23.** Concentración del ión potasio en el sobrenadante de las suspensiones de *L. monocytogenes* preparadas en el tampón glicil-glicina. Tratadas con la mezcla (cuadrados negro). Tratadas con el C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> (círculos azul). Control de la pérdida de K<sup>+</sup> (Triángulos rojo). Preparadas a la concentración de la CMI de la mezcla (6,25 μM), tratamiento durante 120 minutos.

En primer lugar se determinó la pérdida total de K<sup>+</sup> es de 0,60 ppm para *L. monocytogenes* mediante tratamiento térmico. Luego que la población se trató con la mezcla y el compuesto puro de C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> se encontró que la cinética de la pérdida de K<sup>+</sup> es un proceso rápido en ambos casos. En los primeros 15 minutos de tratamiento se obtienen las cantidades de K<sup>+</sup> de 0,1 y 0,12 ppm para la mezcla y el C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub> respectivamente, que corresponde a los valores máximos de pérdida. Con respecto al control (0,6 ppm de K<sup>+</sup>) la acción de la mezcla provoca un 16% de pérdida de K<sup>+</sup> por un 20% del C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>. Quedando

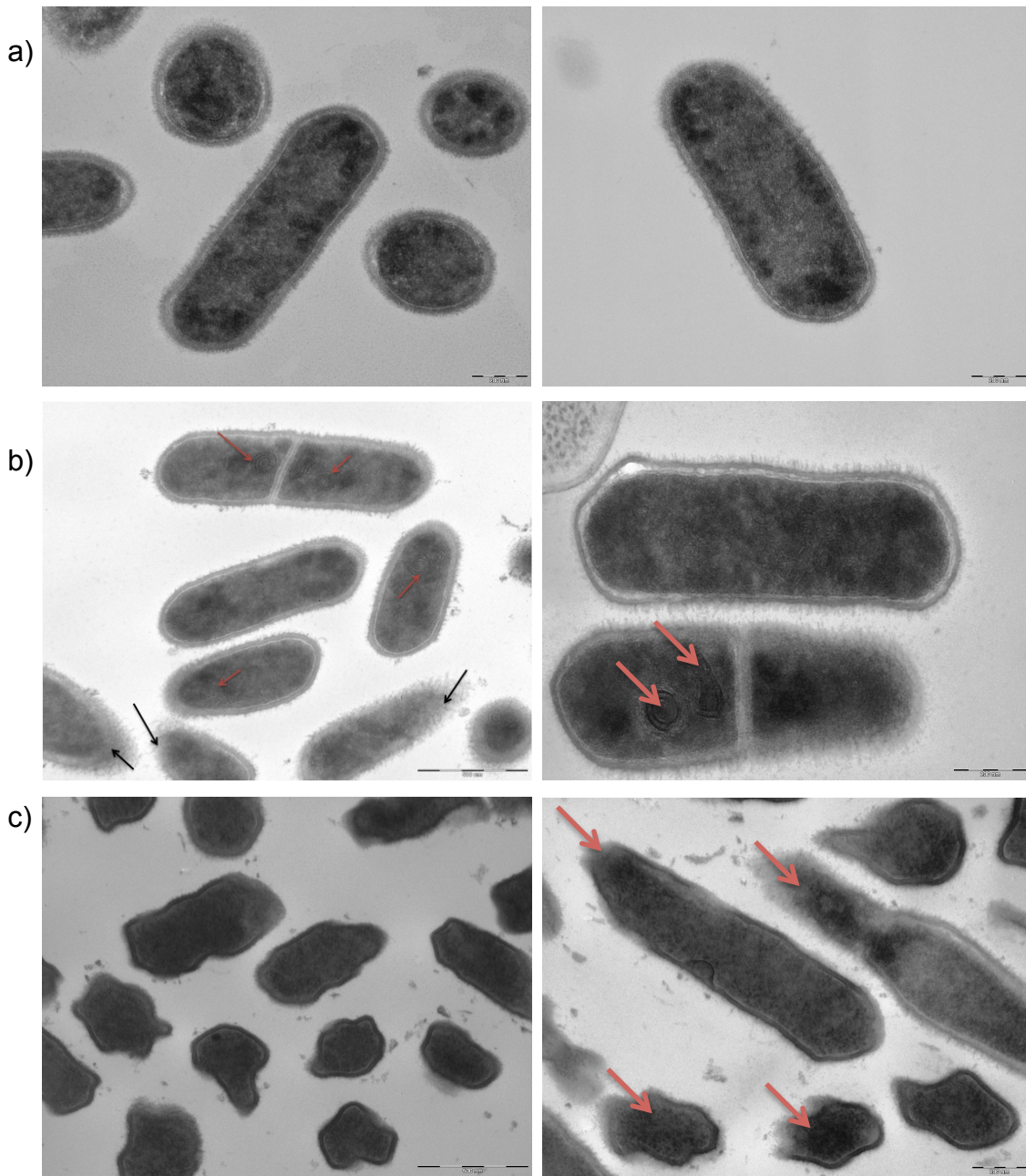
claro que para *L. monocytogenes* la permeabilización provocada por la mezcla es mucho menor que para *E. coli* O157:H7.

#### **6.3.3.8 Efecto de la mezcla sobre la ultraestructura de *L. monocytogenes***

En la Figura 6.24a (Izquierda y derecha) se muestran una micrografía de las células no tratadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313, se pueden notar las membranas intactas con un citoplasma homogéneo, además se observa claramente un péptidoglicano grueso y una fina cápsula que rodea la célula.

En principio se estudió la acción del  $C_3(LA)_2$  purificado (Figura 6.24b), en este caso no se evidenciaron daños llamativos, si comparamos con la población no tratada, se puede destacar que la integridad y forma de la célula no se ve afectada. Sin embargo se observa la formación de algunas invaginaciones señaladas con flechas rojas (Figura 6.24 b, imagen derecha), también se señalan zonas donde hay una deformación de la capsula, lo cual podría estar asociada con el tratamiento de las muestra durante la criofijación.

Por otro lado, cuando la suspensión de *L. monocytogenes* ATCC 15313 fue tratada con la mezcla, se observó una alteración en la morfología de todas las células, hecho que podría estar relacionado con una la pérdida parcial de la rigidez del peptidoglicano (Figura 6.24, imagen izquierda). Al ampliar la imagen (Imagen derecha) encontramos unas zonas que se han señalado con flechas rojas, donde se evidencia una pérdida de la estructura conformacional de la pared.



**Figura 6.24.** Micrografía electrónica de las células de *L. monocytogenes* ATCC 15313 no tratadas, tratadas con la mezcla a la concentración de 6,25  $\mu\text{M}$  y con el  $\text{C}_3(\text{LA})_2$  a la concentración equivalente en la mezcla por 2 horas de tratamiento. a) Control izquierda (75X) y derecha (75X). b) Tratada con el  $\text{C}_3(\text{LA})_2$ , izquierda 40X y derecha 100X y c) Tratada con la mezcla  $\text{C}_3(\text{LA})_2/\text{Lch}_{\text{AL}1.1}$  (80:20), izquierda 60X y derecha 75X.

En resumen, la mezcla produce un claro sinergismo sobre la acción antimicrobiana, incrementando y acelerando la pérdida de viabilidad en *L. monocytogenes* pero especialmente en *E. coli* O157:H7. Con respecto a la funcionalidad celular, en la población de *E. coli* O157:H7 se bloquea la cadena

respiratoria de las células facilitando luego la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, para finalmente estos daños concluir con la pérdida de la viabilidad celular. Para *L. monocytogenes* los resultados encontrados indican una acción similar, pero en este caso encontramos diferencias entre los resultados obtenidos por recuento en placa y citometría de flujo que pueden estar asociados a la presencia de células viables pero no cultivables (VNC). El estado VNC también puede ser considerado como una etapa fisiológica transitoria antes de la muerte celular (Coutard *et al.*, 2007). La mezcla causa daños a nivel estructural de la membrana y pared, en mayor proporción en las células de *E. coli* O157:H7 y en menor medida en la población de *L. monocytogenes*, hecho que se midió por la liberación del catión potasio, este enfoque se utiliza para estudiar el efecto de diversos compuestos antimicrobianos sobre la integridad de la membrana (Rodríguez *et al.*, 2004; Bouhdid *et al.*, 2010). El  $K^+$  es el catión intracelular más abundante en los organismos vivos, donde se incluyen las bacterias, además de ser esenciales para muchas funciones celulares. La pérdida de este componente es consecuencia de daño en la membrana y ruptura de la barrera permeable. Las micrografías electrónicas indican una serie de cambios morfológicos, que son indicativos de daños en las envueltas celulares, provocados principalmente por acción de la mezcla. En la población de *E. coli* se observa la formación de poros en las membranas que conducen a la pérdida del material citoplasmático. En cambio con *L. monocytogenes* más marcado es la pérdida de la forma de la célula. Es importante mencionar que la  $Lch_{AL1.1}$  no produce daños en las envueltas celulares (datos no mostrados). Mientras que el  $C_3(LA)_2$  puro sí que produce afectaciones similares a la mezcla pero en menor proporción. Daños similares fueron observados por la acción del  $C_3(CA)_2$  (geminal de arginina), el cual induce la pérdida de la integridad de la membrana de *E. coli* ATCC 10536, mientras que en *S. aureus* ATCC 91444 se nota la formación de mesosomas y zonas de precipitación del citoplasma (Castillo *et al.*, 2006).

La acción de la  $Lch_{AL1.1}$  como co-tensioactivo mejora la acción antimicrobiana del geminal de arginina ( $C_3(LA)_2$ ) de un modo sinérgico principalmente contra bacterias Gram negativas, lo cual abre la posibilidad de

utilizar este lipopéptido como parte de formulaciones de productos antimicrobianos. Con respecto a la acción del  $C_3(LA)_2$  previamente Pérez *et al.*, (2002) determinaron una gran actividad contra bacterias Gram positivas, debido que al ser un tensioactivo catiónico la presencia de lípidos con carga negativas puede incrementar la unión a la membrana citoplasmática y de esta manera alterarlas fácilmente (Haldar *et al.*, 2005). Mientras que en la mezcla, el mecanismo que puede explicar el efecto sinérgico demostrado, puede ser consecuencia de la formación de un pseudotensioactivo, que permite por un lado una fuerte interacción hidrofóbica con las membranas lipídicas y además una fuerte interacción electrostática dada por el grupo guanidino, único grupo cargado positivamente, presente en la mezcla. En este contexto, Magalhães y Nitschke, (2013) demostraron el efecto sinérgico entre los ramnolipidos y nisina un péptido antimicrobiano, mejorando su eficacia contra *L. monocytogenes*. La aplicación de compuestos activos en combinación, también se ha demostrado para el tratamiento de otros problemas de interés, como es el caso de la utilización del lipopéptido V9T14 que por sí solo no tiene la capacidad de eliminar el biofilm de *E. coli* CFT073, sin embargo, su combinación con varios antibióticos conduce a un aumento sinérgico en la eficacia de los antibióticos y en algunas combinaciones incluso provoca la erradicación total del biofilm (Rivardo *et al.*, 2011). Joshi-Navare y Prabhune, (2013) comprobaron la acción de sinergismo existente entre los soforolípidos y tetraciclina, en este caso, estos autores proponen que la acción del BT es encapsular el antibiótico, permitiendo el paso a través de la membrana, para luego liberarlo en el interior de la célula.

Nuestros resultados amplían el conocimiento sobre nuevas aplicaciones a partir de las interacciones entre compuestos bioactivos que puedan ser útiles frente a microorganismos patógenos. La adicción de la  $Lch_{AL1.1}$  al  $C_3(LA)_2$  sugiere una mejora en la acción contra bacterias Gram negativas, lo cual es muy interesante, sobre todo si consideramos que estas bacterias son responsables de una gran proporción de las enfermedades bacterianas resistentes a antibióticos.



## **V. CONCLUSIONES**





Las conclusiones del presente trabajo son:

1. El lipopéptido producido por *B. licheniformis* AL 1.1 se ha caracterizado como liquenisina, siendo un BT muy efectivo y eficiente ya que su cmc es de 15 mg/L y disminuye la tensión superficial del agua a 30 mN/m.
2. El diseño del medio de cultivo mediante MSR, utilizando melazas como sustrato incrementa la producción de la liquenisina a 3,2 g/L lo que representa un incremento de 15 veces con respecto al medio inicial. Las variables que más influyen en la producción son la concentración de melazas y sales de fosfato.
3. La liquenisina presenta una débil actividad antimicrobiana, sin embargo es eficaz en un 50-70 % y eficiente con valores de ED<sub>50</sub> entre 2,79 y 188 µg/ml para evitar y eliminar la formación de biofilm de cepas patógenas.
4. La liquenisina produce hemólisis por un proceso coloide osmótico, produciendo poros de un diámetro de 32 Å. En liposomas de fosfatidilcolina induce la liberación de solutos de bajo peso molecular por posible formación de bicapas mixtas que pueden actuar como poros.
5. La liquenisina a concentraciones de 100 µg/ml induce la apoptosis en el 96,5 % de las células Caco-2 procedentes de cáncer de colon
6. La liquenisina como co-tensioactivo forma agregados de 200 nm por fuerte interacción hidrofóbica con el geminal de arginina (C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>), presentando un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana.
7. La mezcla C<sub>3</sub>(LA)<sub>2</sub>-liquenisina induce la despolarización y permeabilización de la membrana citoplasmática de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, desencadenando una pérdida de viabilidad.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M., Bastida, J.,** 2002. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. J. Chem. Technol. Biotechnol. 77, 777–784.
- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., García, F., Manresa, A.,** 2001. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir 17, 1367–1371.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H.,** 2008. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Appl. Biochem. Biotechnol. 150, 289–303.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A,** 2007. Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. 340–347.
- Abu-Ruwaida, a S., Banat, I.M., Haditirto, Salem, a, Kadri, M.,** 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation. Acta Biotechnol. 11, 315–324.
- Ajazuddin, Alexander, A., Khichariya, A., Gupta, S., Patel, R.J., Giri, T.K., Tripathi, D.K.,** 2013. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. J. Control. Release 171, 122–132.
- Al-Araji, L., Raja Noor Zaliha, R.N.Z.R., Basri, M., Salleh, A.B.,** 2007. Minireview Microbial Surfactant. Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol. 15, 99–105.
- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, a. E., Al-Bemani, a. S., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S., Al-Sulaimani, H.S.,** 2013. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. Int. Biodeterior. Biodegradation 81, 141–146.
- Apel-Paz, M., Doncel, G.F., Vanderlick, T.K.,** 2005. Impact of membrane cholesterol content on the resistance of vesicles to surfactant attack. Langmuir 21, 9843–9849.
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A.,** 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1713, 51–56.

- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G.,** 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 488–494.
- Arutchelvi, J., Doble, M.,** 2011. Mannosylerythritol Lipids: Microbial Production and Their Applications, in: *Biosurfactants*. 20, 145–177.
- Arutchelvi, J., Sangeetha, J., Philip, J., Doble, M.,** 2014. Self-assembly of surfactin in aqueous solution: role of divalent counterions. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 116, 396–402.
- Banat, I.M., Surekha K. Satpute, Swaranjit S. Cameotra, R.P. and, Nyayanit, N. V.,** 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants ' production. *Front. Microbiol.* 5, 1–18.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R.,** 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427-444.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S.,** 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495–508.
- Banat, T.J., A, P.S., M, P., R., I., M.,** 2010. Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids, in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. 28, 3705–3723.
- Batrakov, S.G., Rodionova, T.A., Esipov, S.E., Polyakov, N.B., Sheichenko, V.I., Shekhovtsova, N. V., Lukin, S.M., Panikov, N.S., Nikolaev, Y.A.,** 2003. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1634, 107–115.
- Benincasa, M.,** 2007. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Curr. Microbiol.* 54, 445–449.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., Manresa, A.,** 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 1–8.

- Benvegna, T., Sassi, J.F.**, 2010. Oligomannuronates from seaweeds as renewable sources for the development of green surfactants, in: Topics in Current Chemistry. pp. 143–164.
- Bhattacharya, S., Haldar, S.**, 2000. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1467, 39–53.
- Bielawski, J.**, 1990. Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1035, 214–217.
- Biria, D., Maghsoudi, E., Roostaazad, R., Dadafarin, H., Sahebghadam Lotfi, A., Amoozegar, M. A.**, 2009. Purification and characterization of a novel biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* MS3. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 871–878.
- Blomen, V.A., Boonstra, J.**, 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 3084–3104.
- Bognolo, G.**, 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, in: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 152, 41–52.
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K.**, 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57, 1210–1223.
- Bonmatin, J.-M., Lapr evote, O., Peypoux, F.**, 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6, 541–556.
- Bordoloi, N.K., Konwar, B.K.**, 2008. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 63, 73–82.
- Boschkova, K., Kronberg, B., St algren, J.J.R., Persson, K., Ratoi Salagean, M.**, 2002. Lubrication in aqueous solutions using cationic surfactants - A study of static and dynamic forces. *Langmuir.* 18, 1680–1687.
- B ttcher, C.J.F., Van gent, C.M., Pries, C.**, 1961. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta.* 24, 203–204.



- Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, S.M.L., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L., Kunkel, D.,** 2011. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J. Mycol. Med.* 21, 182–7.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, a, Espuny, M.J., Manresa, A.,** 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1139–49.
- Bridier, a., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., Briandet, R.,** 2014. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178.
- Burgos-Díaz, C.,** 2012. Biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp . nov .: Producción , caracterización y propiedades *Sphingobacterium detergens* sp . nov. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona. <http://hdl.handle.net/10803/96091>
- Burgos-Díaz, C., Martín-Venegas, R., Martínez, V., Storniolo, C.E., Teruel, J.A., Aranda, F.J., Ortiz, A., Manresa, Á., Ferrer, R., Marqués, A.M.,** 2013. In vitro study of the cytotoxicity and antiproliferative effects of surfactants produced by *Sphingobacterium detergens*. *Int. J. Pharm.* 453, 433–40.
- Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M.J., Aranda, F.J., Teruel, J. a, Manresa, A., Ortiz, A., Marqués, A M.,** 2011. Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *J. Colloid Interface Sci.* 361, 195–204.
- Burgos-Díaz, C., Pons, R., Teruel, J. A., Aranda, F.J., Ortiz, A., Manresa, A., Marqués, A M.,** 2013. The production and physicochemical properties of a biosurfactant mixture obtained from *Sphingobacterium detergens*. *J. Colloid Interface Sci.* 394, 368–79.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S.,** 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 262–266.
- Campos, J.M., Montenegro Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M.,** 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.* 29, 1097–1108.
- Cao, X.H., Zhao, S.S., Liu, D.Y., Wang, Z., Niu, L.L., Hou, L.H., Wang, C.L.,** 2011. ROS-Ca<sup>2+</sup> is associated with mitochondria permeability transition

- pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 190, 16–27.
- Carrillo, C., Teruel, J. a., Aranda, F.J., Ortiz, A.,** 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1611, 91–97.
- Castillo, J. a, Clapés, P., Infante, M.R., Comas, J., Manresa, A.,** 2006. Comparative study of the antimicrobial activity of bis(Nalpha-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 691–698.
- Chang, Y.N., Huang, J.C., Lee, C.C., Shih, I.L., Tzeng, Y.M.,** 2002. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 889–894.
- Chen, J., Huang, P.T., Zhang, K.Y., Ding, F.R.,** 2012. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter sp.* from petroleum-contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 112, 660–71.
- Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y.,** 2006. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 501–506.
- Chevalier, Y., Zemb, T.,** 1999. The structure of micelles and microemulsions. *Reports Prog. Phys.* 53, 279-371.
- Chisti, Y., Moo Young, M.,** 1996. Bioprocess intensification through bioreactor engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* 74, 575–583.
- Christie, W.W.,** 2003. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, Pergamon Press. 417 pag.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P.,** 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 211, 279–87.
- Colomer, A., Pinazo, A., Manresa, M. A., Vinardell, M.P., Mitjans, M., Infante, M.R., Pérez, L.,** 2011. Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities. *J. Med. Chem.* 54, 989–1002.

- Colomer, A., Perez, L., Pons, R.,** 2013. Mixed Monolayer of DPPC and Lysine-Based Cationic Surfactants: An Investigation into the Antimicrobial Activity. *Langmuir*. 29, 7912–7921.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N.,** 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., Marqués, A.M.,** 2015. Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Ann. Microbiol. Marzo*.
- Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R.R., Pommepuy, M., Hervio-Heath, D.,** 2007. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? *ISME J.* 1, 111–120.
- Cullis, P.R., de Kruijff, B.,** 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 559, 399–420.
- Das, K., Mukherjee, A.K.,** 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochem.* 42, 1191–1199.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R.,** 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1675–1684.
- Daverey, A., Pakshirajan, K.,** 2010. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2090–2101.
- De Araujo, L.V., Abreu, F., Lins, U., Anna, L.M.D.M.S., Nitschke, M., Freire, D.M.G.,** 2011. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food Res. Int.* 44, 481–488.
- De O. Souza, M.C., Roberto, I.C., Milagres, A.M.F.,** 1999. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 768–772.
- Debnath, B.K., Saha, U.K., Sahoo, N.,** 2015. A comprehensive review on the application of emulsions as an alternative fuel for diesel engines. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 196–211.

- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Babu, S.V., Senthilkumar, S.R., Sangiliyandi, G.,** 2008. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99, 8170–8174.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T.,** 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - Implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 283, 358–365.
- Desai, J.D., Banat, I.M.,** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64.
- Deshpande, M., Daniels, L.,** 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour. Technol.* 54, 143–150.
- Dey, G., Bharti, R., Sen, R., Mandal, M.,** 2015. Microbial amphiphiles : a class of promising new-generation anticancer agents. *Drug Discov. Today.* 20, 136–146.
- Douglas, L.J.,** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11, 30-36.
- Dubey, K., Juwarkar, A.,** 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 61–69.
- Dubey, K., Juwarkar, A.,** 2004. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian J. Biotechnol.* 3, 74–81.
- Dubey, K. V., Juwarkar, A.A., Singh, S.K.,** 2005. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 21, 860–867.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Dufour, S., Deleu, M., Nott, K., Wathelet, B., Thonart, P., Paquot, M.,** 2005. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1726, 87–95.

- Dunne, W.M.**, 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166.
- Dusane, D.H., Nancharaiah, Y.V., Zinjarde, S.S., Venugopalan, V.P.**, 2010. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 81, 242–248.
- Duvnjak, Z., Cooper, D.G., Kosaric, N.**, 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 165–175.
- Eeman, M., Berquand, A., Dufrière, Y.F., Paquot, M., Dufour, S., Deleu, M.**, 2006. Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: Nanoscale interfacial organization. *Langmuir* 22, 11337–11345.
- Emine Yalçın, Çavuşoğlu, K.**, 2010. Structural Analysis and Antioxidant Activity of a Biosurfactant Obtained from *Bacillus subtilis* RW-I. *Turkish J. Biochem.* 35 , 243–347.
- Espuny, M.J., Egado, S., Rodón, I., Manresa, A., Mercadé, M.E.**, 1996. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp 51T7. *Biotechnol. Lett.* 18, 521–526.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A., Cocco, L.**, 1993. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 19–25.
- Fang, H., Zhao, C., Song, X.Y.**, 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresour. Technol.* 101, 4111–4119.
- Fanun, M.**, 2012. Microemulsions as delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 306-313.
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D.**, 2009. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: Concept, opportunities and the case of olive mill waste waters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 895–900.
- Fox, S.L., Bala, G.A.**, 2000. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresour. Technol.* 75, 235–240.

- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C., Mercade, E.,** 2010. Membrane vesicles: A common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microb. Ecol.* 59, 476–486.
- Fu, S.L., Wallner, S.R., Bowne, W.B., Hagler, M.D., Zenilman, M.E., Gross, R., Bluth, M.H.,** 2008. Sophorolipids and Their Derivatives Are Lethal Against Human Pancreatic Cancer Cells. *J. Surg. Res.* 148, 77–82.
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T., Sakai, H., Kitamoto, D.,** 2007. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 801–810.
- Galani, I., Orlandou, K., Moraitou, H., Petrikos, G., Souli, M.,** 2014. Colistin/daptomycin: An unconventional antimicrobial combination synergistic in vitro against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 370–374.
- Gautam, K.K., Tyagi, V.K.,** 2006. Microbial Surfactants: A Review. *J. Oleo Sci.* 55, 155-166.
- Geys, R., Soetaert, W., Van Bogaert, I.,** 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30, 66–72.
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S.,** 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol. Res. Int.*
- Gogotov, I.N., Miroshnikov, A. I.,** 2009. The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45, 588–592.
- González, S., López-Roldán, R., Cortina, J.L.,** 2012. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environ. Pollut.* 161, 83-92.
- Grangemarda, I., Bonmatinb, J., Bernillon, J., Biochimie, L. De, Bioorganique, S., Bernard, U.C.,** 1999. Lichenysins G , a Novel Family of Lipopeptide Biosurfactants from Production , Isolation and Structural Evaluation by NMR and MassSpectrometry 52, 363–373.
- Gudiña, E., Rangarajan, V.,** 2013. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol* 34, 667–675.

- Gudiña, E.J., Teixeira, J. a, Rodrigues, L.R.,** 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. Colloids Surf. B. Biointerfaces 76, 298–304.
- Gun Phae, C., Shoda, M., Kubota, H.,** 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and it's products on phytopathogenic microorganisms. J. Ferment. Bioeng. 69, 1–7.
- Gunther IV, N.W., Nuñez, A., Fett, W., Solaiman, D.K.Y.,** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2288–2293.
- Guo, N., Wu, X., Yu, L., Liu, J., Meng, R., Jin, J., Lu, H., Wang, X., Yan, S., Deng, X.,** 2010. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58, 193–201.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A.,** 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88, 379–87.
- Haba, E., Pinazo, a, Pons, R., Pérez, L., Manresa, A.,** 2014. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. Biochim. Biophys. Acta 1838, 776–783.
- Hajare, S.N., Subramanian, M., Gautam, S., Sharma, A.,** 2013. Induction of apoptosis in human cancer cells by a *Bacillus* lipopeptide bacillomycin D. Biochimie 95, 1722–1731.
- Haldar, J., Kondaiah, P., Bhattacharya, S.,** 2005. Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple head groups leads to impressive antibacterial activity. J. Med. Chem. 48, 3823–3831.
- Haniyavarn, J.T., Oongsawang, N.R., Ameyama, T.K., Aruki, M.H., Manaka, T.I., Orikiawa, M.M., Anaya, S.K.,** 2003. Production and Characterization of Biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2 . 2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 1239–1244.
- Häußler, S., Nimtzt, M., Domke, T., Wray, V., Steinmetz, I.,** 1998. Purification and Characterization of a Cytotoxic Exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. Infect. Immun. 66, 1588–1593.

- Henriksen, J., Rowat, A.C., Brief, E., Hsueh, Y.W., Thewalt, J.L., Zuckermann, M.J., Ipsen, J.H.,** 2006. Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys. J.* 90, 1639–1649.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G., Vater, J.,** 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol. Genet. Genomics* 272, 363–378.
- Horowitz, S., Gilbert, J.N., Griffin, W.M.,** 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus* 6, 243–248.
- Hwang, Y.H., Park, B.K., Lim, J.H., Kim, M.S., Park, S.C., Hwang, M.H., Yun, H.I.,** 2007. Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 166–171.
- Imura, T., Ohta, N., Inoue, K., Yagi, N., Negishi, H., Yanagishita, H., Kitamoto, D.,** 2006. Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembled structures. *Chem. - A Eur. J.* 12, 2434–2440.
- Inoh, Y., Kitamoto, D., Hirashima, N., Nakanishi, M.,** 2001. Biosurfactants of MEL-A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 57–61.
- Ivankovic, T., Hrenovic, J., Gudelj, I.,** 2009. Toxicity of commercial surfactants to phosphate-accumulating bacterium. *Acta Chim. Slov.* 56, 1003–1009.
- Jacobson, M., Weil, M., Raff, M.,** 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88, 347–354.
- Jahid, I.K., Ha, S. Do.,** 2012. A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. *Food Sci. Biotechnol.* 21, 299-316.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Krasowska, A.,** 2012. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiol.* 12, 1-22.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., Krasowska, A.,** 2010. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* 101, 6118–23.



- Jauregi, P., Coutte, F., Catiau, L., Lecouturier, D., Jacques, P.,** 2013. Micelle size characterization of lipopeptides produced by *B. subtilis* and their recovery by the two-step ultrafiltration process. *Sep. Purif. Technol.* 104, 175–182.
- Jenny, K., Käppeli, O., Fiechter, A.,** 1991. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 36, 5–13.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J.,** 2008a. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 99, 195–9.
- Joshi, S., Yadav, S., Desai, A.J.,** 2008b. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. *Biochem. Eng. J.* 41, 122–127.
- Joshi, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J.,** 2007. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 313–319.
- Joshi-Navare, K., Prabhune, A.,** 2013. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *Biomed Res. Int.* 2013, 1-8.
- Joux, F., Lebaron, P.,** 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* 2, 1523-1535.
- Kanlayavattanakul, M., Lourith, N.,** 2010. Lipopeptides in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 32, 1-8.
- Karant, N.G.K., Deo, P.G., Veenanadig, N.K.,** 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr. Sci.* 77, 116-126.
- Kathiresan, S., Sarada, R., Bhattacharya, S., Ravishankar, G.A.,** 2007. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 456–463.
- Kearns, D.B., Losick, R.,** 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49, 581–590.
- Kenneth W. Davies.,** 1993. Design of experiments for predictive microbial modeling. *J. Ind. Microbiol.* 12, 295–300.

- Khurana, S., Kapoor, M., Gupta, S., Kuhad, R.C.,** 2007. Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface methodology. *Indian J. Microbiol.* 47, 144–152.
- Kim, B., Kim, J.,** 2013. Optimization of culture conditions for the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* JK-1 using response surface methodology. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 56, 279–287.
- Kim, S.Y., Kim, J.Y., Kim, S.H., Bae, H.J., Yi, H., Yoon, S.H., Koo, B.S., Kwon, M., Cho, J.Y., Lee, C.E., Hong, S.,** 2007. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Lett.* 581, 865–871.
- Kiran, G.S., Sabu, A., Selvin, J.,** 2010. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *J. Biotechnol.* 148, 221–225.
- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T., Konishi, M., Imura, T.,** 2009. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 315–328.
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D.,** 2008. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J. Oleo Sci.* 57, 359–369.
- Konstantinidou-Doltsinis, S., Markellou, E., Kasselaki, A.M., Siranidou, E., Kalamarakis, A., Tzembelikou, K., Schmitt, A., Koumakis, C., Malathrakis, N.,** 2007. Control of powdery mildew of grape in Greece using Sporodex L and Milsana. *J. Plant Dis. Prot.* 114, 256–262.
- Konz, D., Doekel, S., Marahiel, M.A.,** 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J. Bacteriol.* 181, 133–140.
- Kosaric, N.,** 1992. Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chem.* 64, 1731-1737.
- Kracht, M., Rokos, H., Ozel, M., Kowall, M., Pauli, G., Vater, J.,** 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo).* 52, 613–619.
- Kumar, C.G., Mamidyala, S.K., Das, B., Sridhar, B., Sarala Devi, G., Karuna, M.S.,** 2010. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with

purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. J. Microbiol. Biotechnol. 20, 1061–1068.

- Lawrence, A.C.S.**, 1958. Solubility in soap solutions. 10. Phase equilibrium, structural and diffusion phenomena involving the ternary liquid crystalline phase, Discuss. Faraday Soc. 25, 51–58.
- Li, X.-Y., Mao, Z.-C., Wang, Y.-H., Wu, Y.-X., He, Y.-Q., Long, C.-L.**, 2012. ESI LC-MS and MS/MS characterization of antifungal cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* XF-1. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 22, 83–93.
- Li, Y., Afrasiabi, R., Fathi, F., Wang, N., Xiang, C., Love, R., She, Z., Kraatz, H.B.**, 2014. Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. Biosens. Bioelectron. 58, 193–199.
- Li, Y.-M., Haddad, N.I. a., Yang, S.-Z., Mu, B.-Z.**, 2008. Variants of Lipopeptides Produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in Different Medium Components Evaluated by a Rapid Method ESI-MS. Int. J. Pept. Res. Ther. 14, 229–235.
- Lin, C.Y., Chen, L.W.**, 2006. Emulsification characteristics of three- and two-phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. Fuel Process. Technol. 87, 309–317.
- Lin, C.Y., Wang, K.H.**, 2004. Effects of an oxygenated additive on the emulsification characteristics of two- and three-phase diesel emulsions. Fuel. 83, 507–515.
- Lin, S.-C.**, 1996. Biosurfactants: Recent advances. J. Chem. Technol. Biotechnol. 66, 109–120.
- Lin, S.C., Minton, M.A., Sharma, M.M., Georgiou, G.**, 1994. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Environ. Microbiol. 60, 31–38.
- Liu, X., Haddad, N.I.A., Yang, S., Mu, B.**, 2007. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. Protein Pept. Lett. 14, 766–773.
- Liu, X., Yang, S., Mu, B.**, 2008. Isolation and characterization of a C 12 - lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO. 121 864–875.
- Llarch, À., Logan, N.A., Castellví, J., Prieto, M.J., Guinea, J.**, 1997. Isolation and Characterization of Thermophilic *Bacillus* spp. from Geothermal

- Environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microb. Ecol.* 34, 58–65.
- Lourith, N., Kanlayavattanukul, M.,** 2009. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31, 255–261.
- Lozano, N., Pinazo, A., La Mesa, C., Perez, L., Andreozzi, P., Pons, R.,** 2009. Catanionic vesicles formed with arginine-based surfactants and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium salt. *J. Phys. Chem. B* 113, 6321–6327.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Teixeira, J.A.C., De Campos-Takaki, G.M.,** 2011. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Curr. Microbiol.* 62, 1527–1534.
- Magalhães, L., Nitschke, M.,** 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29, 138–142.
- Maget-Dana, R., Ptak, M.,** 1995. Interactions of surfactin with membrane models. *Biophys. J.* 68, 1937–1943.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S.,** 1997. Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two *Bacillus* Strains at Thermophilic Conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 887–889.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S.,** 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 428–434.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M.,** 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*.1, 1-19.
- Maneerat, S.,** 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 27, 675–683.
- Marchant, R., Banat, I.M.,** 2012. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.* 30, 558–565.
- Marchant, R., Banat, I.M.,** 2012b. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol.* 34, 1597-1605.
- Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., Manresa, A., Espuny, M.J.,** 2009. The physicochemical properties and

chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. Chem. Phys. Lipids 158, 110–117.

**Marrakchi, S., Maibach, H.I.**, 2006. Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: Regional and age-related differences. Skin Pharmacol. Physiol. 19, 177–180.

**Martinez, V., Corsini, E., Mitjans, M., Pinazo, A., Vinardell, M.P.**, 2006. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. Toxicol. Lett. 164, 259–267.

**McBain J.W.**, 1913. General discussion on colloids and their viscosity. Trans. Far. Soc. 9: 99-101.

**McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D., Weiss, J.**, 2006. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. Food Biophys. 1, 94-114.

**Meylheuc, T., Renault, M., Bellon-Fontaine, M.N.**, 2006. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 109, 71–78.

**Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J.H., Bloom, M., Zuckermann, M.J., Mouritsen, O.G.**, 2002. From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. Biophys. J. 82, 1429–1444.

**Monteiro, A.S., Bonfim, M.R.Q., Domingues, V.S., Corrêa, A., Siqueira, E.P., Zani, C.L., Santos, V.L.**, 2010. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. Bioresour. Technol. 101, 5186–5193.

**Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, D.**, 2007. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317(T). J. Biosci. Bioeng. 104, 78–81.

**Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, H., Kitamoto, D.**, 2008. Efficient production of di- and tri-acylated mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants by *Pseudozyma parantarctica* JCM 11752(T). J. Oleo Sci. 57, 557–565.

- Moyne, A.L., Shelby, R., Cleveland, T.E., Tuzun, S.,** 2001. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. J. Appl. Microbiol. 90, 622–629.
- Mukherjee, S., Das, P., Sen, R.,** 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol. 24, 509–15.
- Mulligan, C.N.,** 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133, 183-198.
- Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K.-I., Nakayama, J., Sonomoto, K.,** 2006. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. J. Biosci. Bioeng. 102, 139–149.
- Nerurkar, A.S.,** 2010. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. Adv. Exp. Med. Biol. 672, 304–315.
- Nicoli, S., Eeman, M., Deleu, M., Bresciani, E., Padula, C., Santi, P.,** 2010. Effect of lipopeptides and iontophoresis on aciclovir skin delivery. J. Pharm. Pharmacol. 62, 702–708.
- Nitschke, M., Araújo, L. V., Costa, S.G.V.A.O., Pires, R.C., Zeraik, A.E., Fernandes, A.C.L.B., Freire, D.M.G., Contiero, J.,** 2009. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. Lett. Appl. Microbiol. 49, 241–247.
- Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G.,** 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. Brazilian J. Microbiol. 81–85.
- Nitschke, M., Pastore, G.M.,** 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresour. Technol. 97, 336–341.
- Novo, D.J., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., Shapiro, H.M.,** 2000. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 827–834.
- O'Toole, G. A.,** 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. J. Vis. Exp. 47, 10–11.
- Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S., Baek, Y.,** 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-

glucose medium by using response surface methodology. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3809–3814.

- Okoliegbe, I.N., Agarry, O.O.,** 2012. Application of microbial surfactant (A review). Scho. J. Biotech. 1, 15–23.
- Onbasli, D., Aslim, B.,** 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas spp.* J. Environ. Biol. 30, 161–163.
- Ongena, M., Jacques, P.,** 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115-125.
- Ortiz, A., Teruel, J. a., Aranda, F.J.,** 2005. Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1720, 137–142.
- Ortiz, A., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, Á., Aranda, F.J.,** 2009. Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. Chem. Phys. Lipids 158, 46–53.
- Ozaki, H., Shio, I.,** 1975. Purification and properties of elastolytic enzyme from *Flavobacterium immotum*. J. Biochem. 77, 171–180.
- Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T.,** 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 2531–2539.
- Park, S.Y., Kim, J.H., Lee, Y.J., Lee, S.J., Kim, Y.,** 2013. Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression. Int. J. Oncol. 42, 287–296.
- Parks, D.R., Bryan, V.M., Oi, V.T., Herzenberg, L.A.,** 1979. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 1962–1966.
- Pasquali, R.C., Bregni, C., Serrao, R.,** 2006. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. Rev. Mex. Ciencias Farm. 37, 38–53.
- Pecci, Y., Rivardo, F., Martinotti, M.G., Allegrone, G.,** 2010. LC / ESI-MS / MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain 2010, 772–778.
- Pérez, L., García, M.T., Ribosa, I., Vinardell, M.P., Manresa, A., Infante, M.R.,** 2002. Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1279–1285.

- Perez, L., Torres, J.L., Manresa, A., Solans, C., Infante, M.R.,** 1996. Synthesis, aggregation, and biological properties of a new class of gemini cationic amphiphilic compounds from arginine, bis(Arg). *Langmuir*. 12, 5296–5301.
- Perfumo, A., Smyth, T., Marchant, R., Banat, I.M.,** 2010. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol.* 1, 1–6.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J.,** 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553–563.
- Pinazo, A., Angelet, M., Pons, R., Lozano, M., Infante, M.R., Pérez, L.,** 2009. Lysine-bisglycidol conjugates as novel lysine cationic surfactants. *Langmuir* 25, 7803–7814.
- Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S.F., Pizzuto, L., Rinaldi, A.C.,** 2009. Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. *Cent. Eur. J. Biol.* 4, 258–273.
- Rahman, P.K.S.M., Gakpe, E.,** 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology* 7, 360–370.
- Rashedi, H., Mazaheri Assadi, M., Bonakdarpour, B., Jamshidi, E.,** 2005. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2, 59–62.
- Raza, Z.A., Khan, M.S., Khalid, Z.M.,** 2007. Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 42, 73–80.
- Rebello, S., Asok, A.K., Mundayoor, S., Jisha, M.S.,** 2014. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environ. Chem. Lett.* 12, 275–287.
- Reddy, A.S., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Jean, J.-S., Fan, C.-W., Chen, H.-R., Wang, J.-C., Nimje, V.R.,** 2009. Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 6693–6699.
- Rivardo, F., Martinotti, M.G., Turner, R.J., Ceri, H.,** 2011. Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 324–331.



- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M.G.**, 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus spp.* prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 541–553.
- Robert, M., Mercadé, E., Andrés, C., Espuny, M.J., Manresa, M. A., Guinea, J.**, 1991. Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Grasas y Aceites.* 42, 1–7.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R.**, 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57, 609–618.
- Rodrigues, L., Teixeira, J.**, 2008. Biosurfactants production from cheese whey 661, 81–104.
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R., van der Mei, H.C.**, 2006. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem.* 41, 1–10.
- Rodrigues, L.R.**, 2015. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *J. Colloid Interface Sci.* 449, 304-316.
- Rodrigues, L.R., Banat, I.M., Van Der Mei, H.C., Teixeira, J.A., Oliveira, R.**, 2006. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J. Appl. Microbiol.* 100, 470–480.
- Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., Manresa, A.**, 2004. Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N $\alpha$ - lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 903–912.
- Rodríguez-Carmona, E., Bastida, J., Manresa, A.**, 2011. Utilization of Agro-industrial Residues for Poly(3-hydroxyalkanoate) Production by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCIMB 40045): Optimization of Culture Medium. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 111–122.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E.**, 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3, 229-236.
- Roseiro, J.C., Esgalhado, M.E., Amaral Collaço, M.T., Emery, A.N.**, 1992. Medium development for xanthan production. *Process Biochem.* 27, 161-175.

- Rosen, M.J., 2004.** Surfactants and Interfacial Phenomena, 3rd ed. Edited by John Wiley and Sons, Inc., New York. pp. 1-10.
- Saiman, L., 2007.** Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: “the motion for.” Paediatr. Respir. Rev. 8, 249–255.
- Saimmai, A., Sobhon, V., Maneerat, S., 2011.** Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Appl. Biochem. Biotechnol. 165, 315–35.
- Salt, M., Lozano, N., Pinazo, A., Mesa, C. La, Perez, L., Andreozzi, P., Pons, R., 2009.** Catanionic Vesicles Formed with Arginine-Based Surfactants and 1,2-Dipalmitoyl- 6321–6327.
- Sánchez-Martínez, M., 2010.** Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolipidos biotensioactivos. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Murcia. <http://hdl.handle.net/10803/10733>
- Sánchez, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, Á., Ortiz, A., 2010.** Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Colloid Interface Sci. 341, 240–247.
- Sandersen, S.B., 2012.** Enhanced Oil Recovery with Surfactant Flooding. Technical University of Denmark.
- Saravanan, V., Vijayakumar, S., 2014.** Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agro-industrial wastes as a carbon source. Malays. J. Microbiol. 10, 57–62.
- Sarka, E., Bubnik, Z., Hinkova, a., Gebler, J., Kadlec, P., 2012.** Molasses as a by-Product of Sugar Crystallization and a Perspective Raw Material. Procedia Eng. 42, 1219–1228.
- Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M., 2007.** Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. Curr. Microbiol. 54, 68–73.
- Sen, R., Swaminathan, T., 2004.** Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. Biochem. Eng. J. 21, 141–148.

- Song, C.-S., Ye, R.-Q., Mu, B.-Z.**, 2007. Molecular behavior of a microbial lipopeptide monolayer at the air–water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 302, 82–87.
- Shakerifard, P., Gancel, F., Jacques, P., Faille, C.**, 2009. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling* 25, 533–541.
- Shi, X., Zhu, X.**, 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 407–413.
- Sivapathasekaran, C., Das, P., Mukherjee, S., Saravanakumar, J., Mandal, M., Sen, R.**, 2010. Marine Bacterium Derived Lipopeptides: Characterization and Cytotoxic Activity Against Cancer Cell Lines. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16, 215–222.
- Slivinski, C.T., Mallmann, E., de Araújo, J.M., Mitchell, D.A., Krieger, N.**, 2012. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochem.* 47, 1848–1855.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Zerkowski, J.A., Foglia, T.A.**, 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 29, 1341–1347.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemae, N., Garcia Celma, M.**, 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102–110.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D.**, 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31, 572–585.
- Stefaniu, C., Brezesinski, G., Möhwald, H.**, 2014. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 208, 197–213.
- Stein, T.**, 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857.
- Stockton, G.W., Smith, I.C.**, 1976. A deuterium nuclear magnetic resonance study of the condensing effect of cholesterol on egg phosphatidylcholine bilayer membranes. I. Perdeuterated fatty acid probes. *Chem. Phys. Lipids* 17, 251–263.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W.,** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Storniolo, C.E., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventos, R.M., Moreno, J.J.,** 2014. Piceid presents antiproliferative effects in intestinal epithelial Caco-2 cells, effects unrelated to resveratrol release. *Food Funct.* 5, 2137–2144.
- Thaniyavarn, J., Roongsawang, N., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S.,** 2003. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1239–1244.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M.,** 2007. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 917–925.
- Thompson, D.N., Fox, S.L., Bala, G.A.,** 2000. Biosurfactants from potato process effluents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86, 917–930.
- Ueno, Y., Hirashima, N., Inoh, Y., Furuno, T., Nakanishi, M.,** 2007a. Characterization of biosurfactant-containing liposomes and their efficiency for gene transfection. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 169–172.
- Ueno, Y., Inoh, Y., Furuno, T., Hirashima, N., Kitamoto, D., Nakanishi, M.,** 2007b. NBD-conjugated biosurfactant (MEL-A) shows a new pathway for transfection. *J. Control. Release* 123, 247–253.
- Urbina, J.A., Pekerar, S., Le, H.B., Patterson, J., Montez, B., Oldfield, E.,** 1995. Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using <sup>2</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1238, 163–176.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P.,** 2006. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 24, 604–620.
- Van Houdt, R., Michiels, C.W.,** 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1117–31.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W.,** 1986. Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot. (Tokyo)*. XXXIX, 888–901.

- Vilela, W.F.D., Fonseca, S.G., Fantinatti-Garborggini, F., Oliveira, V.M., Nitschke, M.,** 2014. Production and Properties of a Surface-Active Lipopeptide Produced by a New Marine *Brevibacterium luteolum* Strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 2245–2256.
- William W. Christie.,** 2013. Microbial lipopeptides structure, occurrence and biology. *AOCS LIPID Libr.* 1–6.
- Xie, Y., Ye, R., Liu, H.,** 2006. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 279, 175–178.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L.,** 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1706–1713.
- Yang, S.-Z., Wei, D.-Z., Mu, B.-Z.,** 2006. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *J. Biochem. Biophys. Methods* 68, 69–74.
- Yang, S.-Z., Wei, D.-Z., Mu, B.-Z.,** 2007. Determination of the structure of the fatty acid chain in a cyclic lipopeptide using GC-MS. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70, 519–523.
- Zaragoza, A., Aranda, F.J., Espuny, M.J., Teruel, J.A., Marqués, A., Manresa, A., Ortiz, A.,** 2010. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus sp.*: Evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir.* 26, 8567–8572.
- Zeraik, A.E., Nitschke, M.,** 2010. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity. *Curr. Microbiol.* 61, 554–559.
- Zezi do Valle Gomes, M., Nitschke, M.,** 2012. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control.* 25, 441–447.
- Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Wang, J., Fan, S.,** 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 401–419.

---

**Zhao, Y., Yang, S.Z., Mu, B.Z.**, 2012. Quantitative analyses of the isoforms of surfactin produced by *Bacillus subtilis* HSO 121 using GC-MS. *Anal. Sci.* 28, 789–793.

**Zhu, Z., Zhang, F., Wei, Z., Ran, W., Shen, Q.**, 2013. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *J. Environ. Manage.* 127, 96–102.



## **V. ANEXOS**





## ANEXO 1.

### A.1 Pruebas de significación de los modelos de regresión.

El procedimiento del análisis consiste en el fraccionamiento de la Suma Total de los cuadrados ( $S_{yy}$ ) en la Suma de los Cuadrados de Regresión ( $SSR$ ) debido al modelo y la Suma de Cuadrado de los Errores o Residuales ( $SSE$ ) debido al error, es decir

$$S_{yy}=SSR + SSE$$

El análisis para la significación del modelo de regresión se realiza, pues, como un procedimiento de análisis de varianza o ANOVA mediante el cálculo del cociente entre la Suma de los Cuadrados de Regresión ( $SSR$ ) asociada a sus grados de libertad y la Suma de los Cuadrados de los Errores ( $SSE$ ) asociada a sus grados de libertad y comparando posteriormente el resultado ( $F_o$ ) con la F-estadística correspondiente a los grados de libertad apropiados a un nivel de significación determinado.

$$F_o = \frac{SSR/f_{SSR}}{SSE/f_{SSE}} = \frac{SSR/k}{SSE/(n-1-k)} = \frac{MSR}{MSE}$$

la división de SSE entre los grados de libertad de los errores ( $f_{SSE}=n-1-k$ ) da la Media del cuadrado de los Errores, MSE. De la misma manera el término  $SSR/f_{SSR}$  ( $f_{SSR} = k$ ) se llama la Media del Cuadrado de Regresión, MSR; siendo  $k$ = número de variables en el modelo y  $n$  el número de experimentos realizados.

La hipótesis nula es rechazada si  $F_o$  es mayor que el valor correspondiente a la  $F_{crit}$  de la distribución  $F$  para un nivel de significación dado con  $k$  y  $(n-1-k)$  grados de libertad. En otras palabras, para un nivel de significación  $\alpha$ , la hipótesis de que el modelo de regresión no es significativo puede ser rechazada al nivel  $\alpha$  si  $F_o > F_{crit} = F_{\alpha, k, n-1-k}$ .

Los programas de ajuste de ordenador, suelen calcular adicionalmente el valor del nivel de significación  $\alpha$  para  $F_0$  o también llamado valor de probabilidad del error ( $P$ ) y se proporcionan junto con el valor correspondiente a  $F_0 = MSR/MSE$ , de esta manera, se puede usar alternativamente el valor de  $P$  para analizar la hipótesis y, así, rechazar la hipótesis nula  $H_0$  si el valor de  $P$  para el estadístico  $F_0$  es menor que el valor que se ha escogido de  $\alpha$  (normalmente se utiliza un  $\alpha=0,05$ ). De esta manera, no tenemos que mirar los valores de  $F_{crit}$  en las Tablas y compararla con la  $F_0$ .

El valor del nivel de significación  $\alpha$  para  $F_0$ , o valor de  $P$  para  $F_0$ , explica la probabilidad de que la hipótesis nula sea verdadera, es decir, que el modelo no es significativo. Así, valores de  $P$  para  $F_0$  menores de  $\alpha = 0,05$  indican significación del modelo, es decir se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ .

Por otro lado, si en el sistema existen réplicas, es decir, respuestas basadas en la misma configuración de variables independientes, se lleva a cabo un análisis que proporciona la significación del error de las réplicas en comparación con el error dependiente del modelo. En otras palabras, el procedimiento de análisis divide la Suma de Cuadrados del Error o Residuales (SSE) en dos componentes:

- a. La contribución del error puro, que se basa en las medidas de las réplicas, es la llamada Suma de los Cuadrados del Error Puro ( $SSPE$ ) y
- b. Una fracción que es debida a la falta de ajuste basada en la configuración del modelo, es la llamada Suma de los Cuadrados de la Falta de Ajuste ( $SSLOF$ ).

$$SSE=SSPE+SSLOF$$

Parecido al análisis de significación  $F$  del modelo de regresión, el análisis estadístico para la falta de ajuste se da mediante el cociente de la Suma de los Cuadrados de la Falta de Ajuste ( $SSLOF$ ), asociada a sus grados de libertad ( $m-p$ ) y la Suma de los Cuadrados del Error o Residuales ( $SSE$ ) asociada a sus grados de libertad ( $n-m$ ):

$$F_0 = \frac{SSLOF (m - p)}{SSPE (n - m)} = \frac{MSLOF}{MSPE}$$

la división de  $SSLOF$  entre los grados de libertad del error debido a la falta de ajuste ( $f_{sse}=n-1-i$ ) da la media del cuadrado para la falta de ajuste,  $MSLOF$ . De igual forma el término  $SSPE(n-m)$  se llama la Media del Cuadrado del Error o Residuales,  $MSPE$ ; siendo  $n$  el número de experimentos totales realizados,  $p$  el número de variables en el modelo incluyendo el término independiente y  $m$  el número de experimentos basados en diferentes valores de las variables, es decir, el número de experimentos excepto las réplicas realizadas del punto central.

Si  $F_0$  es mayor que el valor de  $F_{crit}$  para un nivel de significación  $\alpha$  dado como  $m-2$  y  $n-m$  grados de libertad, es decir,  $F_0 > F_{\alpha, m-p, n-m}$  la hipótesis nula, es decir “ la falta de ajuste no es significativa”, se rechaza lo cual significa que la falta de ajuste es significativa, el error debido a la falta de ajuste es significativo, es decir puede haber contribuciones en la relación variable independiente-respuesta no contemplada mediante el modelo, lo cual indica que el tentativo modelo de regresión debería ser abandonado e intentar encontrar un modelo de ecuación más apropiado.

De la misma manera que en el análisis de significación para el modelo de regresión, los programas de ajuste de ordenador, suelen calcular adicionalmente el valor del nivel de significación  $\alpha$  para  $F_0$  de la falta de ajuste o también llamado valor de la probabilidad del error de la falta de ajuste ( $P$ ) y se proporciona junto con el valor correspondiente a  $F_0 = MSLOF/MSPE$ , de esta manera, se puede usar alternativamente el valor  $P$  para  $F_0$  para analizar la hipótesis y, así, rechazar o no la hipótesis nula  $H_0$ . En este caso, si el valor  $P$  para el estadístico  $F_0$  correspondiente a la falta de ajuste es menor que el valor que se ha escogido de  $\alpha$  (normalmente se utiliza un  $\alpha=0,05$ ) se rechaza la hipótesis nula y esto indica que la falta de ajuste es significativa y por lo tanto que el modelo de regresión propuesto no reproduce los resultados experimentales.

De esta manera, en el caso de la falta de ajuste interesará encontrar valores de P para la  $F_0$  correspondiente a la falta de ajuste mayores que el valor  $\alpha=0,05$ , ya que en este caso la falta de ajuste no es significativa y por lo tanto el modelo de regresión reproduce significativamente los resultados experimentales. Es importante destacar que, cuando menor sea un el valor de  $F_0 = MSLOF/MSPE$  más alto es el nivel de confianza para la significación del modelo.

### **A.1.1 Prueba de significación de los coeficientes individuales de regresión**

Al igual que en el análisis anterior lo primero que debemos tener claro es la hipótesis nula ( $H_0$ ) para los coeficientes individuales es rechazada si el coeficiente respectivo contribuye significativamente al modelo, y si esta  $H_0$  no puede ser rechazada, la variable correspondiente puede ser eliminada de la ecuación del modelo.

Para evaluar la hipótesis nula se utilizó el siguiente análisis estadístico t.

$$t_0 = \frac{\beta_j}{\sqrt{MSE * C_{jj}}}$$

un análisis similar al  $F$  de significación del modelo de regresión se utilizó para confirmar la significación de los componentes individuales del modelo, comparando la  $t_0$  calculada con el valor crítico de  $t_{crit}$  para un nivel de significación  $\alpha$  dado y los grados de libertad del error,  $n-1-k$ .

Si el valor calculado para  $t_0$  es mayor que el  $t_{crit}$  rechazamos la hipótesis nula en el nivel de significación dado. Por ejemplo, con  $\alpha = 0,05$ , decimos que hay solamente un 5% de probabilidad de error que el correspondiente coeficiente no sea significativo. Esta significación se basa en la presencia de todas las variables independientes en el modelo, pero puede cambiar drásticamente con diferentes configuraciones de las variables independientes.

Como en el caso de  $F_0$ , en los programas de ajuste de ordenador, junto con el valor de  $t_0$  se proporciona también el valor del nivel de significación  $\alpha$  para  $t_0$  o valor de probabilidad ( $P$ ), es decir la probabilidad de la que la hipótesis nula sea verdadera, es decir, que el coeficiente individual de regresión no es significativo. Así pues, cuanto más pequeños sean los valores de los niveles de significación  $\alpha$  para  $t_0$  o  $P$  mayor significación del coeficiente de regresión. En otras palabras si  $P \leq 0,05$ , el coeficiente de regresión considerado es significativo y por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

El resultados de los análisis de los coeficientes individuales de los modelos se presentan a continuación en la Tabla A.1 y A.2.

**Tabla A.1.** Análisis de Varianza para la significación de los coeficientes individuales de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) por *Bacillus licheniformis* AL 1.1. con 9 términos y 23 experimentos.

Coficiente	Valor	Error estándar	$t_0$	Valor de Probabilidad (P) o $\alpha$ para $t_0$	IC inferior (-95%)	IC superior (95%)	VIF
$\beta_0$	8,328	0,05195	160,29	8,17E-18	8,215	8,44	
$\beta_1$	1,398	0,04222	33,11	6,11E-09	1,307	1,489	1,000
$\beta_2$	2,037	0,04222	48,24	4,77E-12	1,946	2,128	1,000
$\beta_3$	-0,133	0,04222	-3,15	0,00767	-0,224	-0,0418	1,000
$\beta_{11}$	-2,15	0,03919	-54,87	9,01E-12	-2,235	-2,066	1,000
$\beta_{12}$	2,643	0,05514	47,93	5,18E-11	2,524	2,762	1,000
$\beta_{13}$	0,431	0,05514	7,809	2,91E-02	0,311	0,55	1,000
$\beta_{22}$	-0,466	0,03919	-11,88	2,35E-04	-0,55	-0,381	1,000
$\beta_{23}$	-0,481	0,05514	-8,716	8,64E-02	-0,6	-0,361	1,000
$\beta_{33}$	-0,597	0,03919	-15,23	1,15E-04	-0,682	-0,512	1,000

Como se puede observar en la Tabla A.1 de regresión de los coeficientes individuales para la respuesta de producción de biomasa ( $Y_1$ ), todos los valores de  $P$  para  $t_0$  son menores a el valor de  $\alpha = 0,05$  lo que indica que todos los coeficientes ejercen un efecto significativo para la respuesta.

Por otra parte, los resultados mostrados en la Tabla A.2 de regresión de los coeficientes individuales para la respuesta de producción de Lch<sub>AL1.1</sub> ( $Y_2$ ), los valores de  $P$  para  $t_0$  son en siete de los 9 términos menores a  $\alpha = 0,05$ , lo que quiere decir que estos coeficientes tienen efecto significativo sobre la

respuesta. Mientras que los dos términos restantes  $\beta_2$  y  $\beta_{23}$  que tienen valores de P para  $t_0$ , de 0,394 y 0,233, respectivamente, de acuerdo al modelo de regresión descrito en la Ecuación 4, nos indica que pertenece a la variable independiente  $x_2$  (concentración de nitratos  $X_2$ ) y el término de interacción  $x_2x_3$  (concentración de nitratos y concentración de fosfatos) fueron no significativos y por lo tanto que la relación entre la respuesta producción de  $Lch_{AL1.1}$  y la concentración de nitratos y la interacción concentración de nitratos – concentración de fosfatos es no significativa, por tal razón debería rehacerse el modelo sin estos términos, examinar el modelo y decidir si se deben incluir o no.

**Tabla A.2.** Análisis de Varianza para la significación de los coeficientes individuales de regresión para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *Bacillus licheniformis* AL 1.1. con 9 términos y 23 experimentos.

Coefficiente	Valor	Error estándar	$t_0$	Valor de Probabilidad (P) o $\alpha$ para $t_0$	IC inferior (-95%)	IC superior (95%)	VIF
$\beta_0$	3,142	0,06122	51,33	2,13E-11	3,01	3,275	
$\beta_1$	0,136	0,04975	2,725	0,01734	0,0281	0,243	1,000
$\beta_2$	0,0438	0,04975	-0,881	0,394	-0,151	0,06366	1,000
$\beta_3$	0,331	0,04975	6,66	1,56E+00	0,224	0,439	1,000
$\beta_{11}$	-0,786	0,04618	-17,03	2,86E-05	-0,886	-0,687	1,000
$\beta_{12}$	-0,166	0,06498	-2,559	0,0238	-0,307	-0,02588	1,000
$\beta_{13}$	-0,176	0,06498	-2,713	0,01776	-0,317	-0,03588	1,000
$\beta_{22}$	-0,455	0,04618	-9,857	2,13E-03	-0,555	-0,355	1,000
$\beta_{23}$	0,0812	0,06498	1,25	0,233	-0,05912	0,222	1,000
$\beta_{33}$	-0,507	0,04618	-10,97	6,09E-03	-0,606	-0,407	1,000

### A.1.2 Comparación de modelos obtenidos

Para poder comprobar si el nuevo modelo obtenido para la respuesta de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ), además de ser más simple, era adecuado para predecir la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , se realizó una comparación, de los estadísticos considerados esenciales, entre el modelo de regresión completo y el modelo de regresión final. En cuanto a la respuesta producción de biomasa, esta comparación no se realizó debido a que los resultados de los estadísticos de interés de los modelos eran idénticos como se puede observar en la Tabla A.3.

**Tabla A.3.** Estadísticos esenciales del Análisis de varianza para la selección del modelo para la producción de biomasa ( $Y_1$ ).

	<b>Modelos</b>	
	<b>Modelo polinómico completo</b>	<b>Modelo polinómico final</b>
<b>Estadísticos en el modelo</b>	intercepto, $x_1, x_2, x_3, x_1^2, x_1x_2, x_1x_3, x_2^2, x_2x_3, x_3^2$	intercepto, $x_1^2, x_2, x_1x_2, x_1, x_3^2, x_2^2, x_2x_3, x_1x_3, x_3$
$F_0$ del modelo de regresión	1025,8	1025,8
$P > F_0$ del modelo de regresión	4,81E-17	4,81E-17
$F_0$ de la falta de ajuste	1,39	1,39
$P > F_0$ de la falta de ajuste	0,323	0,323

**Tabla A.4.** Estadísticos esenciales del Análisis de varianza para la selección del modelo para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ).

	<b>Modelos</b>	
	<b>Modelo polinómico completo</b>	<b>Modelo polinómico final</b>
<b>Estadísticos en el modelo</b>	intercepto, $x_1, x_2, x_3, x_1^2, x_1x_2, x_1x_3, x_2^2, x_2x_3, x_3^2$	intercepto, $x_1^2, x_3^2, x_2^2, x_3, x_1, x_1x_3, x_1x_2$
$F_0$ del modelo de regresión	63,34	79,3
$P > F_0$ del modelo de regresión	2,85E-09	1,04E-10
$F_0$ de la falta de ajuste	1,027	0,8645
$P > F_0$ de la falta de ajuste	0,462	0,555

De acuerdo a lo que se puede observar en la Tabla A.4, el modelo final para la respuesta de producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ), presenta un valor elevado de  $F_0$  con respecto al modelo inicial, esto en otras palabras quiere decir que el valor de  $P$  es menor que el obtenido con el modelo inicial, lo que indica que la probabilidad para predecir que el modelo no sea adecuado ha disminuido. Por otra parte la probabilidad de que la variación en las respuesta fuera debido a la falta de ajuste también presenta una disminución, ya que en el modelo inicial el 54 % de la variación se debía a la falta de ajuste, y lo que sucede con el modelo final es que se obtiene que tan sólo el 45% de estas variaciones están relacionadas con la falta de ajuste del modelo.



Esta información nos permite tener la seguridad que el modelo de regresión ajustado final resulta más adecuado para describir la producción de  $Lch_{AL1.1}$ . Los modelos ajustados fueron sometidos a una análisis de significación de los coeficientes individuales y como se pueden corroborar en las Tablas A.5 y A.6, en este caso todos los coeficientes tienen un efecto significativo sobre las respuestas de producción de biomasa ( $Y_1$ ) y producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ).

**Tabla A.5.** Análisis de Varianza para la significación de los coeficientes individuales de regresión para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) por *Bacillus licheniformis*, con 9 términos y 23 experimentos.

Coefficiente	Valor	Error estándar	$t_0$	Valor de Probabilidad (P) o $\alpha$ para $t_0$	IC inferior (-95%)	IC superior (95%)	VIF
$\beta_0$	8,328	0,05195	160,29	8,17E-18	8,215	8,44	
$\beta_{11}$	-2,15	0,03919	33,11	9,01E-12	-2,235	-2,066	1,000
$\beta_2$	2,037	0,04222	48,24	4,77E-12	1,946	2,128	1,000
$\beta_{12}$	2,643	0,05514	-3,15	5,18E-11	2,524	2,762	1,000
$\beta_1$	1,398	0,04222	-54,87	6,11E-09	1,307	1,489	1,000
$\beta_{33}$	-0,597	0,03919	47,93	1,15E-04	-0,682	-0,512	1,000
$\beta_{22}$	-0,466	0,03919	7,809	2,35E-04	-0,55	-0,381	1,000
$\beta_{23}$	-0,481	0,05514	-11,88	8,64E-02	-0,6	-0,361	1,000
$\beta_{13}$	0,431	0,05514	-8,716	2,91E-02	0,311	0,55	1,000
$\beta_3$	-0,133	0,04222	-15,23	0,00767	-0,224	-0,0418	1,000

**Tabla A.6.** Análisis de Varianza para la significación de los coeficientes individuales de regresión para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ) por *Bacillus licheniformis*, con 7 términos y 23 experimentos.

Coefficiente	Valor	Error estándar	$t_0$	Valor de Probabilidad (P) o $\alpha$ para $t_0$	IC inferior (-95%)	IC superior (95%)	VIF
$\beta_0$	3,142	0,06191	51,33	3,36E-13	3,01	3,274	
$\beta_{11}$	-0,786	0,0467	2,725	3,75E-06	-0,886	-0,687	1,000
$\beta_{33}$	-0,507	0,0467	-0,881	1,70E-03	-0,606	-0,407	1,000
$\beta_{22}$	-0,455	0,0467	6,66	6,99E-03	-0,555	-0,356	1,000
$\beta_3$	0,331	0,05031	-17,03	8,64E-01	0,224	0,439	1,000
$\beta_1$	0,136	0,05031	-2,559	0,01663	0,02835	0,243	1,000
$\beta_{13}$	-0,176	0,06571	-2,713	0,01705	-0,316	-0,0362	1,000
$\beta_{12}$	-0,166	0,06571	-9,857	0,02309	-0,306	-0,0262	1,000

### A.1.3 Diagnóstico del modelo de regresión y análisis de adecuación del modelo.

Una vez obtenidos los modelos polinomiales de regresión ajustados para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) y para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ), y confirmando que estos modelos de regresión son significativos, fue necesario examinar los modelos ajustados para asegurar que proporcionen una aproximación adecuada al sistema real, en otras palabras, saber si los modelos describían los datos reales adecuadamente y de esta manera verificar que ninguna de las suposiciones de los mínimos cuadrados de regresión son violadas. Para esto se utilizaron diversos parámetros estadísticos para evaluar la adecuación del modelo. En el siguiente apartado se recogen los parámetros estadísticos más característicos, utilizados para comprobar la adecuación del modelo.

**Tabla A.7.** Estadísticos más relevantes en el estudio de adecuación del modelo para la producción de biomasa ( $Y_1$ ).

	<b>Modelos</b>	
	<b>Modelo polinómico completo</b>	<b>Modelo polinómico final</b>
<b>Estadísticos en el modelo</b>	intercepto, $x_1, x_2, x_3, x_1^2, x_1x_2, x_1x_3, x_2^2, x_2x_3, x_3^2$	intercepto, $x_1^2, x_2, x_1x_2, x_1, x_3^2, x_2^2, x_2x_3, x_1x_3, x_3$
IRI	0,9993	0,9993
$R^2$	0,9986	0,9986
$R^2$ ajustado	0,9976	0,9976
Error Estándar	0,156	0,156
PRESS	1,4	1,4
$R^2$ de Predicción	0,9938	0,9938
Coefficiente de Variación	2,429	2,429
Índice de precisión	119,566	119,566
Nº Puntos	23	23

**Tabla A.8.** Estadísticos más relevantes en el estudio de adecuación del modelo para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  ( $Y_2$ ).

	Modelos	
	Modelo polinómico completo	Modelo polinómico final
<b>Estadísticos en el modelo</b>	intercepto, $x_1, x_2, x_3, x_1^2, x_1x_2, x_1x_3, x_2^2, x_2x_3, x_3^2$	intercepto, $x_1^2, x_3^2, x_2^2, x_3, x_1, x_1x_3, x_1x_2$
IRI	0,9888	0,9868
$R^2$	0,9777	0,9737
$R^2$ ajustado	0,9623	0,9614
Error Estándar	0,184	0,186
PRESS	1,71	1,33
$R^2$ de Predicción	0,9132	0,9327
Coefficiente de Variación	8,73	8,828
Índice de precisión	20,302	22,694
Nº Puntos	23	23

En los siguientes párrafos se explica la importancia de los estadísticos resumidos en las Tablas A.7 y A.8.

1.  $|R|$ : La raíz cuadrada de  $R^2$  es el Coeficiente de Correlación Múltiple entre la respuesta,  $Y$ , y las variable independientes en el modelo. En la regresión Lineal Múltiple,  $|R|$  iguala el coeficiente de correlación entre las respuestas observadas y las respuestas predichas y va de 1 a 0. Los valores de  $|R|$  para la producción de biomasa y  $Lch_{AL1.1}$  es de  $|R|=0,9993$  y  $|R|=0,9868$  respectivamente.
2.  $R^2$ . El coeficiente de Determinación en la Regresión Lineal Simple es llamado Coeficiente de Determinación Múltiple en la Regresión Lineal Múltiple y es definido como el cociente entre la Suma de los Cuadrados de la Regresión (SSR) y la Suma de Cuadrados Total ( $S_{yy}$ ), o, lo que es equivalente, 1 menos el cociente entre la Suma de los Cuadrados del Error (SSE) y la Suma de los Cuadrados Total ( $S_{YY}$ ):

$$R^2 = \frac{SSR}{S_{yy}} = 1 - \frac{SSE}{S_{yy}}$$

Esta ecuación explica por qué  $R^2$  puede estar únicamente entre 0 y 1. Así pues,  $R^2$  es la fracción total de variabilidad en los datos ( $S_{YY}$ ) explicada por el modelo de regresión (SSR), por lo tanto,  $R^2$  describe la cantidad de variación en los valores de la respuesta observada que es explicada mediante las variables independientes. A veces ( $R^2 \cdot 100$ ) se llama porcentaje de la variabilidad total explicada por el modelo.  $R^2$  puede también ser descrito como un indicador de la proporción de la variabilidad alrededor de la media de las respuestas observadas.

Aplicando la ecuación para el cálculo de  $R^2$  se obtiene que para el modelo ajustado para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) un valor de  $R^2 = 0,9993$ . En cambio para el modelo ajustado para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  el valor de  $R^2 = 0,9868$ . Estos valores lo que nos quieren decir es que en la producción de biomasa ( $Y_1$ ), el modelo ajustado explica las variaciones en 99,93%. Por otra parte para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  el 98,68% de las variaciones son explicadas por el modelo ajustado. Es importante mencionar que mientras más altos los valores de coeficientes de correlación ( $R^2$ ) indican un buen ajuste en los datos experimentales y los valores predichos para ambas respuestas estudiadas. Como información adicional es necesario tener en cuenta que un valor de  $R^2$  alto indica que el modelo ajusta mejor los datos, pero que no siempre un valor de  $R^2$  cercano a la unidad garantiza un mejor modelo, ya que si se añade una variable independiente el valor de  $R^2$  aumentará debido al incremento en SSR, sin tener en cuenta si esta variable es o no significativa para el modelo. En un modelo polinomial siempre es posible aumentar el  $R^2$ , pero esto significa que este modelo tenga una significación real ya que es probable que un modelo con  $R^2$  cercano a 1 puede no actuar de manera correcta al predecir nuevos datos. Esto se llama “sobreajustar” el modelo, es por ello que generalmente es aconsejable utilizar el  $R^2$  ajustado.

3.  $R^2$  ajustado: teniendo en cuenta los grados de libertad en el modelo, se puede definir el llamado Coeficiente de Determinación Ajustado o  $R^2$  ajustado. Generalmente el  $R^2$  siempre aumenta o permanece constante

cuando se añade un nuevo término al modelo, el  $R^2$  ajustado puede realmente disminuir, indicándonos si un coeficiente realmente mejora el modelo o puede llevar a un “sobreajuste”.

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{MSE}{\frac{S_{yy}}{n-1}} = 1 - \frac{\frac{SSE}{n-p}}{\frac{S_{yy}}{n-1}} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)} (1 - R^2)$$

de esta ecuación se pueden distinguir los siguientes términos; n indica el número de experimentos,  $p=k+1$  es el número de parámetros en el modelo incluyendo el término independiente ( $k$ =número de variables independientes). En general el coeficiente  $R^2_{ajustado}$  no incrementará siempre a medida que se adicione variables en el modelo, es más si existen términos innecesarios en el modelo este valor de  $R^2_{ajustado}$  disminuye. Cuando se evalúa un modelo de regresión,  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$  deberían compararse. Por lo que se debe considerar que si  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$  difieren dramáticamente se pone en evidencia la existencia de términos no significativos en el modelo y por lo tanto que el modelo puede estar sobre ajustado. Tomando como referencia lo explicado en los párrafos anteriores, se calcula los valores de  $R^2_{ajustado}$ , utilizando la ecuación antes descrita. Es así que se obtiene para la producción de biomasa ( $Y_1$ ), de  $R^2_{ajustado} = 0,9986$ . De igual manera se realiza el cálculo para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  cuyo valor de  $R^2_{ajustado} = 0,9737$ . Se procede a comparar el valor de  $R^2$  y  $R^2_{ajustado}$  en el modelo ajustado para la producción de biomasa ( $Y_1$ ), y en este caso difieren en 0,0007 y en el modelo ajustado para la producción de  $Lch_{AL1.1}$  la diferencia es de 0,0131, por lo tanto estos modelos no están sobreajustados.

4. *Error Estándar*. El error Estándar estima la desviación estándar del término de error en el modelo y es igual a la raíz cuadrada de la media de la Suma de Cuadrados del Error (MES):

$$Error\ estándar = \sqrt{MSE}$$

en general, cuanto menor sea el error estándar, el modelo ajustará mejor los datos. Los valores de error estándar para el modelo de regresión ajustado para la producción de biomasa ( $Y_1$ ) es = 0,156, y para el modelo ajustado de producción de Lch<sub>AL1.1</sub> ( $Y_2$ ) es = 0,186, como se observa en ambas respuestas el valor es pequeño, esto indica que los modelos ajustan bien los datos.

5. *PRESS* Y  $R^2$ : La predicción de la Suma de los Cuadrados de los Errores es el estadístico llamado *PRESS*, que se obtiene de la siguiente ecuación:

$$PRESS = \sum_k e_k^2 = \sum_k \left( \frac{e_k}{1 - h_{kk}} \right)^2 = \sum_k (residualesPRESS)^2$$

En general, cuanto más pequeño sea el *PRESS*, el modelo predice mejor los datos. *PRESS* es calculado a partir de la suma de cuadrados de los residuales que se basan en el modelo de regresión con un punto de los datos eliminado. Esto puede ser utilizado para calcular una aproximación de  $R^2$  que indica el poder predictivo del modelo.  $R^2_{predicción}$  refleja como de bien el modelo predecirá datos futuros. Análogo a  $R^2$ , el  $R^2$  de predicción es definido mediante:

$$R^2_{predicción} = 1 - \frac{PRESS}{S_{yy}}$$

el tener a  $R^2$ ,  $R^2_{ajustado}$ ,  $R^2_{predicción}$  juntos son muy convincentes para tener una estrecha impresión del ajuste global del modelo y el poder predictivo. Para la función respuesta producción de biomasa ( $Y_1$ ), se presenta en la Tabla 4.13, y como se observa tanto el valor *PRESS* como el  $R^2_{predicción}$  no presenta ninguna variación, esto no quiere decir que el modelo de regresión ajustado no presente ventajas sobre el modelo de regresión inicial, ya que como se explicó anteriormente, el

modelo de regresión ajustado presenta los términos ordenados en función de su efecto sobre la producción de biomasa.

En el caso de la función respuesta producción de Lch<sub>AL1.1</sub> (Y<sub>2</sub>), los valores de PRESS disminuye y la R<sup>2</sup><sub>predicción</sub> aumentaba del modelo de regresión ajustado con respecto al modelo polinomial completo (PRESS= 0,133<0,171 y R<sup>2</sup><sub>predicción</sub> 0,9327>0,9132, esto quiere decir que el modelo ajustado poseía un poder de predicción mejor y más apropiado que el modelo completo.

6. CV: La variabilidad inexplicable de los datos, dada por el error estándar de la regresión o la raíz cuadrada de la MSE puede ser comparada a la respuesta media. Este cociente multiplicado por 100 se llama Coeficiente de Variación (CV):

$$CV = \frac{\sqrt{MSE}}{\bar{y}} * 100$$

El valor de CV para la producción de biomasa (Y<sub>1</sub>) es de 2,249%, y para la respuesta de producción (Y<sub>2</sub>) el valor de CV = 8,828, estos valores indican que los ajustes de los modelos finales era buenos.

7. *Índice de Precisión*: El índice de precisión se obtiene calculando el cociente entre el rango de respuestas predichas y la media del error estándar derivada de SSPE:

$$\text{Índice de precisión} = \frac{y_{est,max} - y_{est,min}}{\sqrt{\frac{pSSPE}{n}}}$$

Cuanto mayor sea el índice de precisión más satisfactoriamente puede esperarse que el modelo pueda predecir nuevos valores. Un índice de precisión bajo con valores cercanos a 1 indica que la variabilidad predicha en las respuestas es sólo del orden de la magnitud del error de

---

las réplicas. Los valores de precisión para la producción de biomasa es de 119,55 y de 22,64 para la producción de  $Lch_{AL1.1}$ , estos valores son lejanos a 1 y se esto indica que los modelos puedan predecir nuevos valores de forma adecuada.



