



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
BIOSURFACTANTES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

**ELIZABET MORENO REYES**



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Maricarmen Quirasco Baruch

**VOCAL:** Profesor: Mariana Ramírez Gilly

**SECRETARIO:** Profesor: Lorena De Anda Aguilar

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Roeb García Arrazola

**2do. SUPLENTE:** Profesor: Genaro Jiménez Reyes

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 313**

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**FACULTAD DE QUÍMICA – CONJUNTO “E”**

## **ASESOR DEL TEMA**

**I.A. Mariana Ramírez Gilly**

## **SUSTENTANTE**

**Elizabet Moreno Reyes**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>4</b>
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos .....	4
<b>Marco teórico .....</b>	<b>5</b>
Función fisiológica .....	5
Clasificación de biosurfactantes .....	5
Propiedades de los biosurfactantes .....	8
Microorganismos productores de biosurfactantes .....	9
Factores que influyen en la producción de biosurfactantes .....	12
Tratamiento posterior a la producción de biosurfactantes .....	13
Caracterización e identificación de biosurfactantes.....	16
Uso de biosurfactantes en sistemas alimenticios .....	18
<b>Metodología.....</b>	<b>20</b>
Selección de especies.....	20
Producción .....	20
Separación.....	21
Caracterización .....	22
Identificación .....	23
Aplicación.....	23
Análisis estadístico .....	25
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>26</b>
Producción y separación .....	26
Caracterización .....	29
Identificación .....	37
Aplicación.....	41
<b>Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura química de algunos biosurfactantes: (a) ramnolípidos, (b) trehalolípidos, (c) soforolípidos, (d) surfactina, (e) viscosina, (f) gramicidina, (g) polimixina y (h) emulsana. .... 6
- Figura 2.** Diagrama de la estrategia experimental empleada..... 20
- Figura 3.** Valores de tensión superficial a diferentes concentraciones de los biosurfactantes producidos por (A) *Lactobacillus* sp. y (B) *Bacillus* sp. Cada punto representa el valor promedio de mediciones realizadas por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar..... 31
- Figura 4.** Pruebas del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de aceite de maíz comercial con los surfactantes. .... 33
- Figura 5.** Efecto de la temperatura (A), cloruro de sodio (B) y pH (C) en la actividad superficial de los biosurfactantes producidos por *Lactobacillus casei* en una concentración de 12 mg/g. La actividad superficial se expresó como el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua ( $72.98 \pm 0.11$  mN/m). En todos los casos no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. (n=3)..... 34
- Figura 6.** Efecto de la temperatura (A), cloruro de sodio (B) y pH (C) en la actividad superficial de los biosurfactantes producidos por *B. subtilis* en una concentración de 30 mg/kg. (n=3) La actividad superficial se expresó como el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua ( $72.98 \pm 0.11$  mN/m). Aquellos valores con letras distintas (a-d) en una sola gráfica presentan diferencia significativa entre sí ( $p < 0.05$ ). .... 36
- Figura 7.** (A) Espectro FTIR y (B) espectro  $^1\text{H}$  RMN de los biosurfactantes producidos por *L. casei*. .... 38
- Figura 8.** (A) Espectro FTIR y (B) espectro  $^1\text{H}$  RMN de los biosurfactantes producidos por *B. subtilis*. .... 40
- Figura 9.** Vista superior de las espumas líquidas preparadas con proteínas de lactosuero y un surfactante..... 42
- Figura 10.** Estabilidad de las espumas líquidas con proteína de lactosuero medida por el volumen drenado durante dos horas y 30 minutos. .... 43
- Figura 11.** Vista superior de las espumas líquidas de surfactantes sin proteínas de lactosuero. .... 44
- Figura 12.** Turbidez de emulsiones en función del tiempo, cuya fase oleosa y surfactantes se encuentran en una concentración del 0.5 g/100 g (A) y 1.5 g/100 g (B)..... 46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento celular y tensión superficial a lo largo de la fermentación de <i>Lactobacillus casei</i> . ....	26
<b>Tabla 3.</b> Valores de tensión superficial del buffer PBS con y sin el extracto de biosurfactantes de <i>L. casei</i> . ....	27
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento celular y tensión superficial a lo largo de la fermentación de <i>B. subtilis</i> . ....	27
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento obtenido del extracto de biosurfactantes. ....	29
<b>Tabla 6.</b> Tensión superficial del agua adicionada con biourfactantes. ....	30
<b>Tabla 7.</b> Índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de aceite de maíz comercial con los biosurfactantes producidos por <i>L. casei</i> , <i>B. subtilis</i> y surfactantes comerciales. ....	32
<b>Tabla 8.</b> Rendimiento obtenido de la preparación de las espumas líquidas con proteínas de lactosuero y un surfactante. (n=1) ....	41
<b>Tabla 9.</b> Rendimiento obtenido de la preparación de las espumas líquidas de surfactantes sin proteínas de lactosuero. (n=3) ....	42

## RESUMEN

Con el objetivo de obtener y estudiar surfactantes de origen microbiano, se llevaron a cabo fermentaciones de dos especies de bacterias, *Lactobacillus casei* y *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. En el primer caso, a partir de la biomasa resuspendida en agua se extrajeron los biosurfactantes unidos a la membrana celular mediante agitación suave. En el segundo caso, se separaron del medio de cultivo por precipitación ácida. Los biosurfactantes de *L. casei* redujeron la tensión superficial del agua de  $72.98 \pm 0.11$  mN/m a  $42.41 \pm 0.32$  mN/m. A pesar de no mostrar capacidad emulsificante a una concentración de 0.1 g/100 g, no se encontró diferencia significativa entre la tensión superficial del control y los biosurfactantes en medios acuosos (12 mg/g) a concentraciones de NaCl de 0.5, 1, 4 y 8 g/100 g, valores de pH de 2, 4, 6 y 8, ni a temperaturas de 65 °C/30 min, 121 °C/15 minutos y 135°C/4 segundos. La reducción máxima de la tensión superficial del agua que se observó con los biosurfactantes de *B. subtilis* fue  $29.18 \pm 0.16$  mN/m y tampoco mostró capacidad emulsificante a una concentración de 0.1 g/100 g. Ante las condiciones de salinidad, pH y combinaciones de temperatura-tiempo evaluadas, sólo a condiciones ácidas (pH menor a 5) se encontraron efectos negativos sobre la actividad superficial de los biosurfactantes de *B. subtilis* al reducir la tensión superficial del agua un 19.85% a pH 2, en el caso más desfavorable. En términos de eficiencia, la concentración micelar crítica de los biosurfactantes obtenidos de *B. subtilis* fue 28.40 mg/kg y de los procedentes de *L. casei* fue 10.01 mg/g. Para obtener información acerca de la estructura química se emplearon técnicas instrumentales como la espectroscopia de infrarrojo y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno. Se presume que los biosurfactantes de *L. casei* son glucopéptidos y que los de *B. subtilis* son lipopéptidos. En cuanto a su uso en espumas líquidas, sólo los biosurfactantes de *L. casei* formaron espumas con un rendimiento de 35.6%, utilizando una concentración 10% superior a la CMC. Al preparar emulsiones de aceite en agua con los biosurfactantes, estos no otorgaron una estabilidad superior a las emulsiones control.

## INTRODUCCIÓN

Los surfactantes se caracterizan por ser moléculas anfifílicas, esta característica les permite situarse entre dos fases líquidas inmiscibles como el agua y el aceite. En este punto, reducen la tensión superficial e interfacial favoreciendo la formación de emulsiones. En la actualidad, existe una gran variedad de surfactantes en el mercado cuyo origen puede ser microbiano, vegetal o sintético (Dasgupta y Ranjan, 2018). Debido al riesgo asociado al uso de surfactantes artificiales sobre la salud humana y el incremento de la demanda de productos químicos que sean efectivos y compatibles con el ambiente, se ha optado por la biosíntesis para satisfacer dicha demanda (Kosaric y Vardar-Sukan, 2014). Los biosurfactantes se definen como biomoléculas superficialmente activas producidas por microorganismos y considerando dichas tendencias e interés en estas moléculas, se planteó como objetivo producirlas, estudiar su funcionalidad y conocer su estructura química.

Para utilizar biosurfactantes en sistemas alimenticios para consumo humano, un estudio exhaustivo es necesario, además de la aprobación por parte de las agencias gubernamentales correspondientes. Para ello, las especies más adecuadas son aquellas con niveles de bioseguridad más bajos. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* y *Lactobacillus casei* son bacterias que cumplen con este requisito. A nivel laboratorio, una vez que los biosurfactantes se obtienen por vía fermentativa, es importante estudiarlos para identificar sus posibles aplicaciones.

En 1968, Arima et al. aislaron un compuesto extracelular con actividad superficial del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* IAM 1213. Este compuesto fue nombrado surfactina y posteriormente se descubrió que se trataba de un lipopéptido (Soberón-Chávez, 2011). También se descubrió que *B. subtilis* produce otros lipopéptidos, los cuales se han categorizado en tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas (Kalia y Kumar, 2017).

Por otra parte, se sabe que los miembros del género *Lactobacillus* son productores potenciales de biosurfactantes, aunque éstos no han sido completamente caracterizados. Diversos grupos de investigación han logrado obtener glucolípidos, lipopéptidos, sustancias parecidas a proteínas, fosfolípidos, ácidos grasos y lipopolisacáridos por vía fermentativa con *Lactobacillus* spp. Gran parte de los biosurfactantes que se han reportado del género

*Lactobacillus*, se encuentran asociados a la membrana celular, y otros son excretados por las células (Satpute et al., 2016).

Se han aislado e identificado especies de *Bacillus* a partir de productos a base de petróleo para la producción de biosurfactantes, ya que son capaces de crecer en estos medios a causa de los surfactantes que producen. No obstante, como una opción accesible en términos de tiempo y disponibilidad en el mercado, se encuentran las colecciones de microorganismos. En el caso de *L. casei*, se han logrado obtener biosurfactantes con el propósito de estudiar sus propiedades antibacterianas sin proveer información adicional sobre su actividad superficial aparte de la reducción de la tensión superficial del agua (Sharma y Saharan, 2014; Golek et al., 2009). Por tales motivos, además de su bajo nivel de bioseguridad, se eligió a *Bacillus subtilis* y a *Lactobacillus casei* para producir y estudiar la funcionalidad de sus biosurfactantes.

## **HIPÓTESIS**

- ◆ *Lactobacillus casei* y *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* producirán compuestos con la capacidad de reducir la tensión superficial del agua. Dichos compuestos en disolución acuosa mantendrán su funcionalidad ante variaciones de pH, temperatura y concentraciones de sal.
- ◆ Asimismo, los compuestos que se obtengan servirán para preparar emulsiones con mayor estabilidad respecto al tiempo que aquellas preparadas sin surfactantes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Obtener biosurfactantes por vía fermentativa a partir de *Lactobacillus casei* y *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, identificar su estructura, y caracterizar y evaluar su funcionalidad.

### **Objetivos específicos**

- ◆ Producir biosurfactantes por fermentación y separarlos del medio de cultivo o de la biomasa según corresponda.
- ◆ Caracterizar los biosurfactantes producidos mediante la determinación del índice de emulsificación (E<sub>24</sub>), la concentración micelar crítica y evaluar su estabilidad ante diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de cloruro de sodio.
- ◆ Identificar su estructura química empleando técnicas instrumentales como la espectroscopia de infrarrojo y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.
- ◆ Evaluar su efectividad aplicándolos en un sistema inmiscible y comparar con otros surfactantes comerciales.

## **MARCO TEÓRICO**

Los surfactantes son moléculas anfifílicas que poseen una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica (no iónica o cargada positiva o negativamente) y que presentan actividad superficial. Para considerar a una molécula como surfactante, también debe formar micelas a una determinada concentración finita (Mittal y Jaiswal, 2015). Aquellas moléculas que cumplen con las características anteriores y que además sean producidas por microorganismos, se les llama biosurfactantes.

### **Función fisiológica**

Los biosurfactantes son secretados de la célula o son destinados a formar parte de la membrana celular durante su crecimiento en medios con sustratos inmiscibles con agua. La función fisiológica principal de los biosurfactantes, es permitir que los microorganismos crezcan en sustratos inmiscibles con agua mediante la reducción de la tensión superficial, facilitando así el acceso al sustrato para su utilización como nutrimento. Sin embargo, el mecanismo no se ha podido entender a detalle (Fakruddin, 2012). Otras funciones incluyen su actividad antimicrobiana contra otros microorganismos y su participación en la adherencia celular que les provee mayor estabilidad ante condiciones ambientales hostiles (Fakruddin, 2012).

### **Clasificación de biosurfactantes**

Los surfactantes sintéticos se clasifican de acuerdo a su polaridad, mientras que los biosurfactantes se categorizan generalmente atendiendo a su origen microbiano y composición química. Con base en su composición química se encuentran los siguientes tipos:

#### **◆ Glucolípidos**

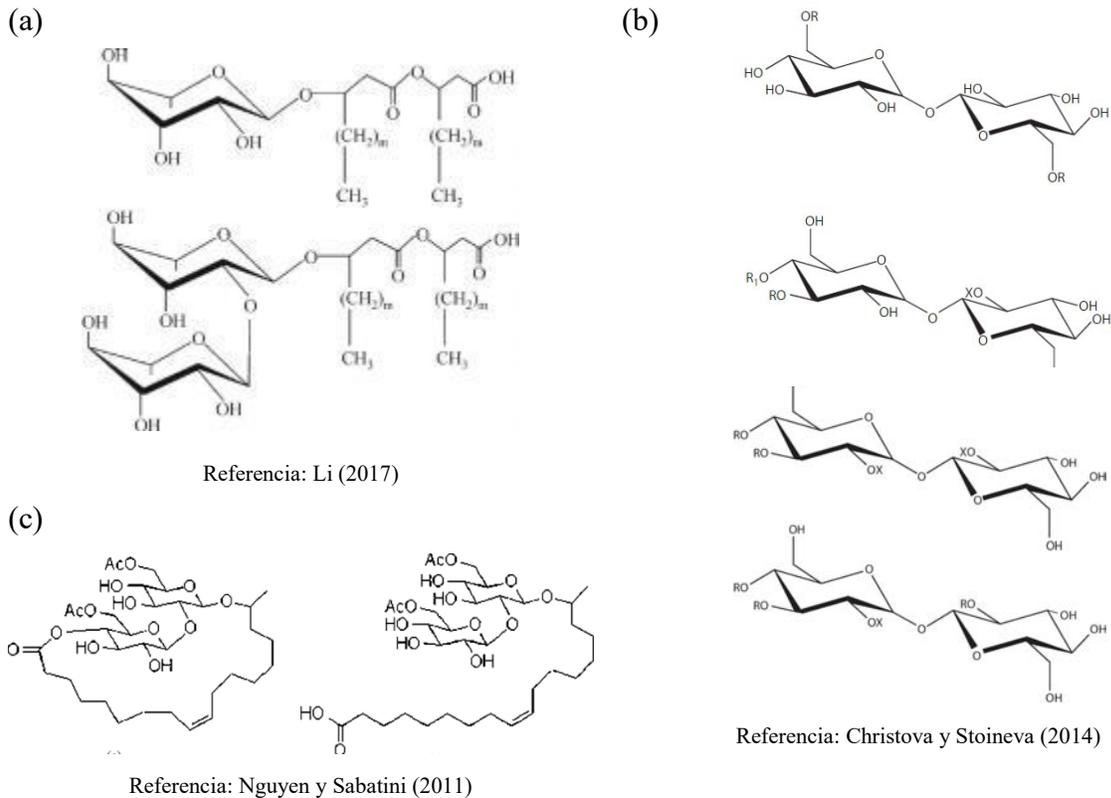
Son carbohidratos unidos a ácidos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxialifáticos mediante un enlace éster (Vijayakumar y Saravanan, 2015). La mayoría de los biosurfactantes son glucolípidos. Los biosurfactantes más conocidos de este tipo son los ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos.

◆ Lipopéptidos y lipoproteínas

Consisten en un lípido unido a una cadena polipeptídica que puede ser lineal o cíclica; los ácidos grasos que contienen, consisten de 13 a 16 átomos de carbono y pueden estar ramificados (Vijayakumar y Saravanan, 2015). Algunos ejemplos son la surfactina, la viscosina, la gramicidina y la polimixina.

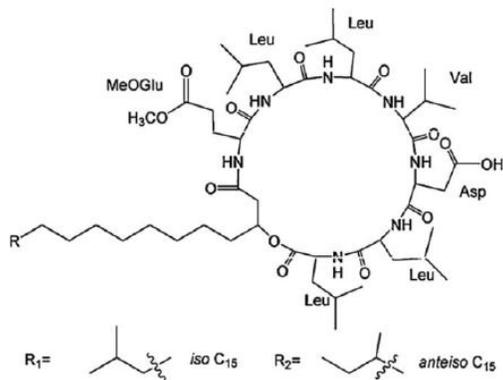
◆ Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros

Estos constituyen componentes de la estructura celular (Vijayakumar y Saravanan, 2015). Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo en un extremo de la cadena. Los fosfolípidos se componen de dos ácidos grasos y un grupo fosfato unidos a una molécula de glicerol o esfingosina. Los lípidos neutros, se caracterizan por no poseer carga y pueden ser triglicéridos o ésteres de esteroides.



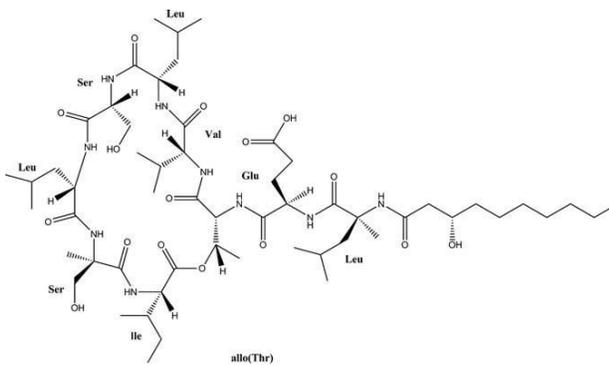
**Figura 1.** Estructura química de algunos biosurfactantes: (a) ramnolípidos, (b) trehalolípidos, (c) soforolípidos, (d) surfactina, (e) viscosina, (f) gramicidina, (g) polimixina y (h) emulsana.

(d)



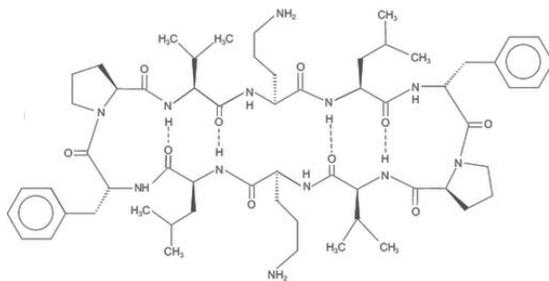
Referencia: Liu et al. (2015)

(e)



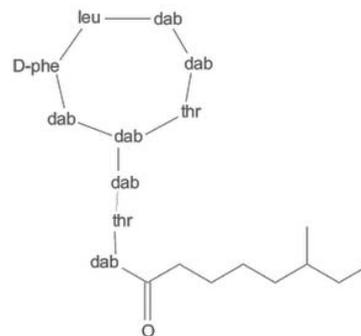
Referencia: Khattari et al. (2015)

(f)



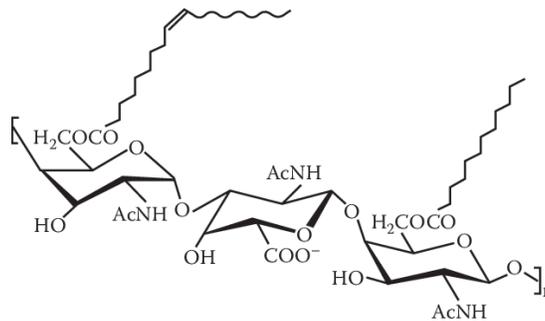
Referencia: Jiménez-Islas et al. (2010)

(g)



Referencia: Jiménez-Islas et al. (2010)

(h)



Referencia: Somasundaran et al. (2014)

**Figura 1.** Estructura química de algunos biosurfactantes: (a) ramnolípidos, (b) trehalolípidos, (c) soforolípidos, (d) surfactina, (e) viscosina, (f) gramicidina, (g) polimixina y (h) emulsana. (Continuación)

#### ◆ Biosurfactantes poliméricos

Poseen una mayor masa molecular comparada con los tipos anteriores y consisten en una estructura base formada por polisacáridos a la que se unen covalentemente cadenas de ácidos grasos. Algunos de los más estudiados son la emulsana, la alasana y la liposana (Vijayakumar y Saravanan, 2015).

#### **Propiedades de los biosurfactantes**

La producción de surfactantes por biosíntesis ha ido adquiriendo mayor importancia debido a que constituye una manera de satisfacer la demanda de productos químicos biodegradables que representen un riesgo menor de toxicidad hacia el ser humano y otros seres vivos del medio ambiente. Asimismo, los biosurfactantes pueden resultar más efectivos que otros surfactantes comerciales para reducir la tensión superficial en condiciones extremas, siendo entonces más atractivos para su uso en emulsiones.

#### ◆ Biodegradabilidad

La biodegradabilidad de materiales y sustancias es de gran importancia para el lanzamiento de productos y su posterior desecho. Curiosamente, se ha encontrado que los biosurfactantes pueden ser degradados con mayor facilidad que los surfactantes sintetizados químicamente. En un estudio se comparó la biodegradabilidad de Tritón X-100 y ramnolípidos bajo condiciones aerobias y reductoras por fermentación, de los dos, el surfactante de origen sintético (Tritón X-100) sólo fue degradado de manera parcial bajo condiciones aerobias (Mohan et al., 2006). También, al evaluar la degradación del dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés, SDS), la emisión de CO<sub>2</sub> en medio líquido inoculado con *Pseudomonas* resultó ser dos órdenes menor en magnitud a diferencia de la emisión de CO<sub>2</sub> medida de la degradación de surfactantes de origen bacteriano (Lima et al., 2011).

#### ◆ Baja toxicidad

Aunque el número de estudios publicados sobre la toxicidad de biosurfactantes es limitado, se piensa que poseen un nivel de toxicidad bajo o incluso nulo. Poremba et al. (1991), encontraron que el surfactante químico de carácter aniónico, Corexit, posee un LC<sub>50</sub> (concentración a la cual, muere el 50% de los organismos expuestos a la sustancia bajo estudio después de un tiempo determinado) en *Photobacterium phosphoreum* diez veces

menor que el LC<sub>50</sub> de ramnolípidos. No obstante, para emplear biosurfactantes en alimentos destinados al consumo humano debe evaluarse la toxicidad de los mismos en otros organismos o líneas celulares. Por ejemplo, se ha obtenido evidencia de que los soforolípidos poseen una citotoxicidad baja en fibroblastos humanos, líneas celulares de queratinocitos HPK II y queratinocitos epidérmicos humanos (Ahmad et al., 2011).

#### ◆ Tolerancia a la temperatura y al pH

Dado que diversos procesos en la industria de alimentos requieren de altas temperaturas y/o medios ácidos, se prefieren ingredientes y aditivos que mantienen su funcionalidad a dichas condiciones. Diversos biosurfactantes de origen microbiano han exhibido actividad superficial a condiciones extremas de temperatura y pH, por lo que han adquirido mayor interés. Por ejemplo, Horowitz et al. (1990) reportaron que el biosurfactante BL86 obtenido de *Bacillus licheniformis* mostró actividad en un intervalo de pH de 4 a 13 y de temperatura de 25 a 120 °C. Asimismo, los soforolípidos producidos por *Candida bombicola* ATCC 22214 resultaron termoestables hasta una temperatura de 100 °C y mantuvieron su funcionalidad a valores de pH entre 2 y 12 (Elshafie et al., 2015).

#### ◆ Biocompatibilidad y digestibilidad

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material ajeno al organismo de desempeñar una función específica sin causar una respuesta desfavorable en el organismo hospedero. La digestibilidad, que generalmente se expresa en porcentaje, mide el grado con que los macronutrientes son digeridos y absorbidos por el tracto intestinal. Estas propiedades de los biosurfactantes permiten su uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Kosaric, 2001).

### **Microorganismos productores de biosurfactantes**

Existen varios tipos de biosurfactantes y estos se han logrado producir a partir de distintos microorganismos. Entre ellos se encuentran bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Muchas especies han sido aisladas de tierras y efluentes líquidos contaminados con propósitos relacionados con biorremediación (Nitschke y Costa, 2007). Curiosamente, estos compuestos poseen propiedades funcionales adicionales que son relevantes para la industria

de alimentos, entre ellas se encuentran propiedades emulsificantes, espumantes, humectantes, solubilizantes, antiadhesivas y antimicrobianas (Nitschke y Costa, 2007).

#### ◆ Bacterias

Distintas especies de bacterias han sido utilizadas para producir biosurfactantes por fermentación. *Pseudomonas* es quizá el género predominante en cuanto a la producción de biosurfactantes, seguido por *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, géneros de bacterias ácido lácticas, *Corynebacterium*, entre otros (Shekhar y Sundaramanickam, 2015). De estos microorganismos se han aislado biosurfactantes de amplia diversidad como glucopéptidos, lipopéptidos, fosfolípidos, polisacáridos, lípidos neutros y complejos proteína-lípidos-carbohidratos (Shekhar y Sundaramanickam, 2015).

#### ◆ Hongos

Es sabido que géneros de levaduras como *Torulopsis*, *Pseudozyma* y *Kurtzmanomyces* producen biosurfactantes categorizados como soforolípidos y lípidos manosil-eritritoles; se ha encontrado también que *Debaromyces polymorphus* produce complejos conformados por carbohidratos, proteínas y lípidos (Shekhar y Sundaramanickam, 2015). Por su parte, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* empleadas comercialmente para producir lactasa y bebidas alcohólicas, respectivamente, también producen biosurfactantes manoprotéicos (Shekhar y Sundaramanickam, 2015). Por último, *Candida* sp. comprende a las especies fúngicas más reportadas de las que se han obtenido biosurfactantes de diferentes tipos como soforolípidos, complejos carbohidrato-proteína-lípido, ácidos grasos y lípidos manosil-eritritoles (Shekhar y Sundaramanickam, 2015). Otros géneros incluyen *Penicillium* y *Yarrowia* que producen monocétidos, policétidos y complejos glucoprotéicos (Shekhar y Sundaramanickam, 2015).

En la Tabla 1. se presentan algunos microorganismos productores de biosurfactantes y su nivel de bioseguridad.

**Tabla 1.** Biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

<b>Organismo</b>	<b>Nivel de bioseguridad</b>	<b>Biosurfactante</b>
<b>Bacterias</b>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	Viscosina, lipopéptidos
<i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Pseudomonas cholovoraphis</i>	2, 1	Ramrólpidos
<i>Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens</i>	1, 1	Surfactina/iturina
<i>Bacillus licheniformis,</i> <i>Bacillus subtilis</i>	1, 1	Liquenina
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	Emulsana
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	Alasana
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1	Trehalosa dicorinomicolato
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	Lípidos neutros
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	Glicosil glicéridos
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	Viscosina
<i>Nocardia erythropolis</i>	1	Lípidos neutros
<i>Serratia marcescens</i>	1	Serrawetina
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1	Lípidos de ornitina
<b>Levaduras</b>		
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	1	Complejos lípido-carbohidrato
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	Complejos carbohidrato-proteína
<i>Torulopsis petrophilum,</i> <i>Torulopsis apicola</i>	1, 1	Soforólpidos
<i>Pseudozyma rugulosa,</i> <i>Pseudozyma aphidis,</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>	1, 1	Lípidos manosil-eritritoles
	1	Complejos carbohidrato-proteína-lípido

**Tabla 1.** Biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos filamentosos. (Continuación)

<b>Organismo</b>	<b>Nivel de bioseguridad</b>	<b>Biosurfactante</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,1	Manoproteínas
<i>Candida antarctica</i>	1	Lípidos manosil-eritritoles
<i>Candida ingens</i>	1	Ácidos grasos
<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	1, 1	Soforolípidos
<i>Phaffia rhodozyma</i>	1	Complejos lípido-carbohidrato
<b>Hongos filamentosos</b>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	Derivados de policétidos
<i>Ustilago maydis</i>	1	Lípidos celobiosa

Nota: Adaptada de: “Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review” por S. Shekhar y A. Sundaramanickam, 2015, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522-1554.

### **Factores que influyen en la producción de biosurfactantes**

#### ◆ Fuente de carbono y nitrógeno

La calidad y cantidad de biosurfactantes que se producen por fermentación se ve afectada por el tipo de fuente de carbono. El diesel, el petróleo crudo, la glucosa, la sacarosa y el glicerol han sido comúnmente utilizados para la producción de biosurfactantes (Roy, 2017). Algunos ejemplos relacionados con los efectos de la composición del medio de cultivo en la producción de biosurfactantes se presentan a continuación. La producción de ramnolípidos por especies de *Pseudomonas*, por ejemplo, está regulada por la presencia de n-alcenos en el medio de cultivo. Kosaric y Sukan (2000) encontraron que *Pseudomonas aeuroginosa* UW-1 produjo rendimientos mayores al crecer en un medio con aceite vegetal en comparación con medios que contenían hidrocarburos líquidos como hexano.

Otro aspecto importante que influye en la producción de biosurfactantes es la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno. Diversos ingredientes se han utilizado como fuente de nitrógeno para la producción de biosurfactantes, entre ellas urea, extracto de levadura, sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sodio, extracto de carne y extractos de malta (Roy, 2017). El extracto de levadura es el más utilizado y la concentración en que se usa depende del medio de cultivo y el organismo (Roy, 2017). En cuanto a las sales inorgánicas de nitrógeno, las sales de amonio y urea son preferidas por *Arthrobacter paraffineus*, mientras que las sales de nitratos son preferidas por *P. aeuroginosa*, *Rhodococcus* sp. y *B. subtilis* (Roy, 2017). La fuente de nitrógeno y la de carbono pueden regular también la producción de biosurfactantes de manera conjunta. De acuerdo a Kosaric et al. (2000), la producción de biosurfactantes por *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Torulopsis* puede ser regulada por la proporción carbono/nitrógeno.

#### ◆ Condiciones ambientales

Cada elemento del ambiente en el que crece el microorganismo productor es crítico para el rendimiento de biosurfactantes. Para maximizar la cantidad que se obtiene de la fermentación, es importante encontrar las condiciones óptimas de temperatura, pH, salinidad y aireación (que favorece disponibilidad de oxígeno). El intervalo óptimo de cada parámetro es distinto atendiendo al tipo de microorganismo y especie. Entre otros aspectos a considerar, además de la temperatura, el pH, el grado de salinidad y de aireación, se encuentran los requerimientos nutrimentales específicos, como en el caso de bacterias ácido lácticas, y otras condiciones específicas a las que microorganismos extremófilos crecen y se desarrollan, como la presión osmótica y el  $a_w$  del medio.

#### **Tratamiento posterior a la producción de biosurfactantes**

Tras la producción de biosurfactantes por fermentación, las etapas siguientes son la separación y purificación. Este procesamiento puede representar el 60-80% del costo total desde la producción hasta la purificación (Satpute, et al., 2010). Por tal motivo, se deben optimizar las técnicas que se empleen para así permitir su producción a nivel comercial. Para su separación deben conocerse las propiedades fisicoquímicas que distingan a los biosurfactantes del resto de los componentes del medio. Previo a la selección del método o combinación de ellos, debe considerarse también si los biosurfactantes se producen

extracelularmente o no. En caso de que se produzcan intracelularmente, el primer paso después de la producción deberá ser la ruptura celular para permitir la salida de estos metabolitos secundarios al medio. Algunos métodos utilizados para el procesamiento posterior a su producción son la separación de fases, precipitación con sales, precipitación ácida, extracción con disolventes, fraccionamiento de espuma y cromatografía.

#### ◆ Separación de fases

La separación de fases es un proceso simple y de bajo costo para la extracción de biosurfactantes del medio de cultivo. La separación de fases resulta de la presencia de biosurfactantes en concentraciones superiores a la concentración de solubilidad causando que la fase en la que se encuentren los biosurfactantes sea más densa que el agua o el medio de cultivo. La mayor parte de la biomasa permanece en la fase superior acuosa, sin embargo, la fase inferior también puede contener biomasa que es necesario remover usando otros métodos como la extracción con disolventes y lavados con agua. Es importante mencionar que este proceso depende de la concentración y/o rendimiento de biosurfactantes y su solubilidad en el medio de cultivo, que a su vez está regulado por parámetros como el pH, temperatura, fuerza iónica, entre otros. La separación de fases puede entonces utilizarse como el paso inicial de su purificación o para la obtención de biosurfactantes cuya aplicación final requiera un nivel bajo de pureza como el uso agrícola o biorremediación ambiental (Banat y Thavasi, 2019).

#### ◆ Precipitación con sales

Algunos biosurfactantes como la emulsana, la alasana y la surfactina pueden precipitarse mediante la adición de sulfato de amonio; la concentración de sulfato de amonio utilizada para este propósito oscila entre el 30 y 65%, y después de que se añaden, el producto se deja reposar a 4 °C durante 12 a 24 horas (Banat y Thavasi, 2019). Por último, los biosurfactantes son separados por diálisis, por lo cual, este método es útil para biosurfactantes cuya masa molar es considerablemente mayor al resto de los componentes del medio.

#### ◆ Precipitación ácida

Este método utiliza ácidos concentrados como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico para disminuir el pH a 2 o 3. Después la solución que contiene a los biosurfactantes se mantiene

en reposo de 8 a 12 horas a 4 °C; bajo estas condiciones de pH, los biosurfactantes se vuelven insolubles, se separan del medio y se depositan en el fondo del fermentador. Los biosurfactantes depositados en el fondo se recuperan por centrifugación o extracción con disolventes. La disminución de pH debe realizarse lentamente controlando simultáneamente la temperatura para evitar la hidrólisis o la degradación de los biosurfactantes. La precipitación ácida se ha empleado para la separación de biosurfactantes como surfactina, ramnolípidos y soforolípidos (Banat y Thavasi, 2019).

#### ◆ Extracción con disolventes

Algunos disolventes que se utilizan para la separación de biosurfactantes incluyen cloroformo, metanol, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano, butanol, pentano, n-hexano, ácido acético, éter dietílico, isopropanol y metil tert-butil éter. Para su uso en el laboratorio, la mayoría de los disolventes mencionados son convenientes mientras que para su uso industrial, la toxicidad, la eficiencia de extracción, los coeficientes de partición, la solubilidad del biosurfactante, la disponibilidad y el costo del disolvente, son criterios que deben tomarse en cuenta. Se ha reportado la extracción con disolventes para la separación de soforolípidos, ramnolípidos, trehalolípidos, lípidos celobiosa y lípidos manosil-eritritoles (Banat y Thavasi, 2019).

#### ◆ Fraccionamiento de espuma

Este proceso de separación se ha utilizado para separar ramnolípidos, soforolípidos y surfactina. Para ello, se permite la producción de espuma que contiene a los biosurfactantes y se conduce a una columna de fraccionamiento; la espuma recolectada es acidificada a pH 2-3 para precipitar los biosurfactantes y al final, estos se extraen con disolventes. Una desventaja de este proceso es que no es selectivo y que sólo es útil para moléculas con alta actividad superficial que forman espuma con mayor eficiencia a diferencia de moléculas con baja actividad superficial (Banat y Thavasi, 2019).

#### ◆ Ultrafiltración

La ultrafiltración es un proceso eficiente y bastante utilizado para concentrar y purificar biosurfactantes del medio de fermentación o a partir de un extracto. El medio que contiene a los biosurfactantes se hace pasar a través de membranas que impiden el paso de moléculas

de determinada masa molar, logrando así el paso de impurezas y la retención de biosurfactantes. La concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante a separar juega un papel importante en este proceso, ya que a concentraciones superiores a la CMC, los biosurfactantes forman agregados conocidos como micelas que facilitan su separación de impurezas de menor masa molar como sales, aminoácidos libres, péptidos y proteínas de baja masa molar. Para lograr una separación eficiente es importante elegir la membrana con el tamaño de poro más apropiado posible considerando la masa molar de los componentes del medio y la CMC de los biosurfactantes. Además, la remoción previa de biomasa puede prevenir la saturación de las membranas. Este proceso se ha aplicado en la separación de surfactina y ramnolípidos (Banat y Thavasi, 2019).

#### ◆ Cromatografía

Por cromatografía es posible separar y purificar los biosurfactantes de un extracto crudo. A pesar de que permite la obtención de biosurfactantes con alto grado de pureza, el costo y el tiempo requeridos para este proceso son una de sus principales desventajas. Algunas técnicas cromatográficas que se han utilizado para la purificación de biosurfactantes son la cromatografía en columna de gel de sílice, la cromatografía de adsorción y desorción, y la cromatografía de intercambio iónico (Banat y Thavasi, 2019).

#### **Caracterización e identificación de biosurfactantes**

El entendimiento de la formación, las estructuras y las propiedades de emulsiones, es esencial para la creación y estabilización de sistemas alimenticios (Kralova y Sjoblom, 2009). Desde el punto de vista fisicoquímico, la selección de un surfactante involucra diversos factores como la naturaleza del sistema en el que se pretende utilizar, la compatibilidad con el sistema en términos de solubilidad, los costos, la efectividad y la eficiencia de su uso en sistemas inmiscibles, por mencionar algunos. De ahí la importancia de la caracterización funcional y estructural de los surfactantes. En cuanto a la caracterización física, es conveniente conocer la apariencia, la solubilidad en agua y en otros disolventes y el color de las disoluciones de los biosurfactantes.

Algunos parámetros útiles para la caracterización funcional de biosurfactantes, son los cambios de la tensión superficial, el balance hidrofílico-lipofílico, el índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) y la concentración micelar crítica (CMC). La efectividad de un

surfactante está relacionada con la reducción de la tensión superficial e interfacial, es decir, la disminución de las fuerzas atractivas entre moléculas del mismo tipo; mientras que la concentración micelar crítica se relaciona con la eficiencia y corresponde a la concentración mínima requerida del surfactante para reducir la tensión superficial lo máximo posible, después de la cual ya no ejerce efecto alguno (Pacwa-Płociniczak et al, 2011). Por su parte, el índice de emulsificación es una manera cualitativa de determinar la capacidad emulsificante de un surfactante (Campos et al., 2013). El balance hidrofílico-lipofílico es un término que relaciona la atracción relativa y simultánea de un surfactante por dos fases inmiscibles (agua y aceite). Esta propiedad se representa mediante una escala arbitraria de 0 a 20. Los emulsificantes con un valor menor a 6, favorecen la estabilización de emulsiones agua en aceite, mientras que aquellos con un valor de 10 a 18, tienen el efecto contrario y favorecen la emulsificación de aceite en agua (Satpute, et al., 2010). Por último, es importante también determinar las condiciones a las que los biosurfactantes presentan actividad superficial. Entre los parámetros de mayor relevancia a considerar para la aplicación de emulsificantes en la industria de alimentos, se encuentran el pH, la concentración de sales y los tratamientos térmicos a los que se someta el alimento en que se deseen utilizar.

Los biosurfactantes en su mayoría son de naturaleza compleja y de alto peso molecular, por lo que se pueden emplear ensayos químicos y/o técnicas espectroscópicas para determinar la presencia y/o proporción proteínica, lipídica y de carbohidratos en estas moléculas. Generalmente, se requiere del uso de una combinación de técnicas para predecir la estructura completa de los biosurfactantes.

Para estimar la proporción del contenido proteínico se han utilizado métodos espectrofotométricos como el de Lowry o de Bradford. Cuando existen fracciones proteínicas en los biosurfactantes, una manera de identificar la presencia de aminoácidos en su estructura es utilizando proteasas, como por ejemplo la tripsina que hidroliza uniones peptídicas precedentes a los aminoácidos lisina y arginina en una cadena de péptidos (Satpute, et al., 2010). Para estimar la masa molecular de la porción proteínica se ha empleado también la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (por sus siglas, SDS-PAGE) (Satpute, et al., 2010). Por otro lado, para estimar el contenido de carbohidratos

y lípidos se puede llevar a cabo una digestión para primero separar dichas fracciones. Para la estimación de azúcares y moléculas afines, al ser tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado, generan una coloración amarillo-anaranjada cuya intensidad puede medirse en un espectrofotómetro y relacionarse con su concentración (Satpute, et al., 2010). Los azúcares reductores pueden determinarse por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Por el método gravimétrico, midiendo la masa de extractos obtenidos con éter dietílico se puede determinar el contenido lipídico y en el caso de glucolípidos, estos pueden detectarse y ser cuantificados mediante el desarrollo de color con el ensayo de antrona u orcinol (Satpute, et al., 2010).

Los métodos espectroscópicos también pueden ser utilizados para elucidar la estructura de biosurfactantes. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es la técnica de mayor sensibilidad para la identificación y cuantificación de glucolípidos (Satpute, et al., 2010). La espectroscopia de infrarrojo permite la identificación de grupos funcionales en moléculas y la resonancia magnética nuclear provee información sobre los grupos funcionales presentes y la posición de enlaces dentro de una molécula.

### **Uso de biosurfactantes en sistemas alimenticios**

Una vez que se obtiene información sobre las características funcionales de los biosurfactantes con relación a su actividad superficial, se pueden designar posibles aplicaciones. Una de ellas es su uso como agentes antiadhesivos en el procesamiento de alimentos, que es prometedor para resolver problemáticas relacionadas con la formación de biopelículas bacterianas en superficies y equipos utilizados para la elaboración de alimentos que compromete su inocuidad. También se han demostrado sus propiedades antimicrobianas y uso potencial en la industria de alimentos que emplea granos y cereales. Klich et al. (1994) reportaron una reducción significativa de la microbiota presente en granos almacenados como maíz, cacahuates y semillas de algodón a concentraciones de 50 a 100 ppm de iturina A. Además, se pueden utilizar como ingredientes en formulaciones de alimentos. Por ejemplo, para la formación y estabilización de emulsiones, estabilización de sistemas aireados, mejoramiento de la textura de alimentos elaborados a base de grasas y modificación de las propiedades reológicas de la masa de trigo (Kachholz y Schlingmann, 1987).

Hasta el momento los biosurfactantes no se utilizan en la industria de alimentos debido a que las agencias gubernamentales correspondientes no han dado su aprobación ni establecido las regulaciones relacionadas con su uso en alimentos (Nitschke et al., 2007). Asimismo, la producción industrial de biosurfactantes no ha sido posible debido a los costos elevados para su producción y separación, además de los bajos rendimientos que se obtienen por fermentación. Los altos costos de producción pueden compensarse con el uso de biosurfactantes en productos con un precio elevado y que requieren de un volumen bajo de producción, como productos farmacéuticos y cosméticos (Helmy et al., 2011). Por el contrario, para aplicaciones que emplean grandes volúmenes de producción de biosurfactantes de bajo costo, como en la industria del petróleo, los surfactantes de origen microbiano no logran competir con los de origen sintético (Makkar and Cameotra, 2002). Una alternativa prometedora para reducir los costos es la utilización de sustratos no convencionales como desechos sólidos y líquidos agroindustriales, y por otra parte, la optimización del medio de crecimiento y condiciones para el desarrollo del microorganismo o incluso el mejoramiento genético del microorganismo de interés para incrementar el rendimiento de producción (Sharma et al., 2016). Algunos sustratos agroindustriales estudiados hasta el momento para producir biosurfactantes incluyen hidrolizados de hemicelulosa, efluentes agroindustriales de destilerías, pasta de cacahuate, suero de queso y bagazo de uva (Sharma et al., 2016).

## METODOLOGÍA

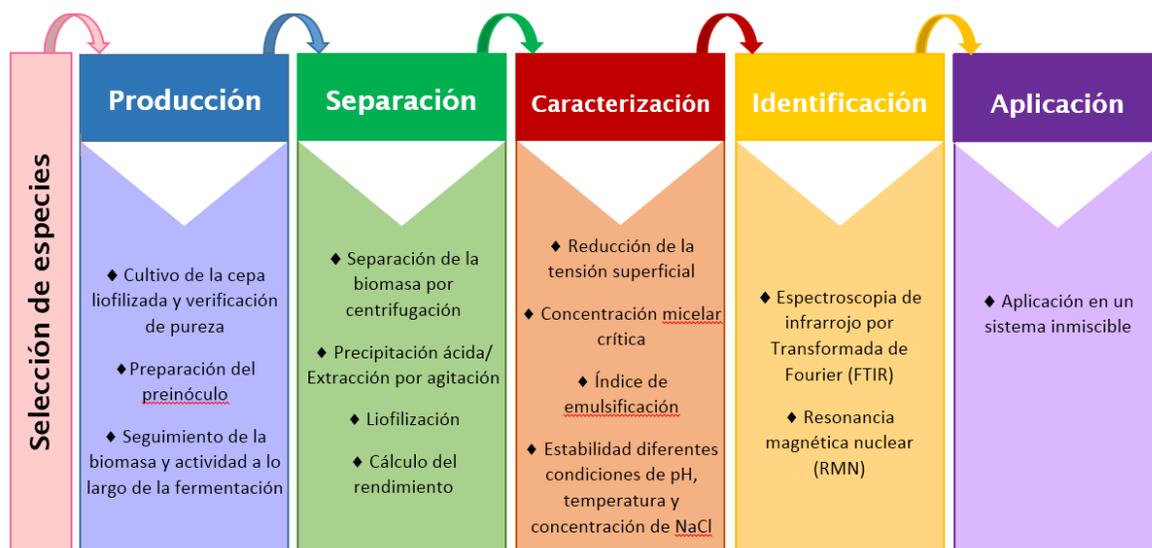


Figura 2. Diagrama de la estrategia experimental empleada.

### Selección de especies

Los microorganismos seleccionados fueron *Lactobacillus casei* (derivada de ATCC 393) y *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (derivada de ATCC 6633) debido a que se encuentran reportados en la literatura como productores de biosurfactantes (Shaligram y Singhal, 2010; Satpute et al., 2016), por poseer un nivel de bioseguridad 1 y por su disponibilidad en el mercado actual en México. Las cepas fueron adquiridas de Microbiologics Inc. (No. de catálogo 0176 P y 0486 P).

### Producción

Para la recuperación de las células liofilizadas, *L. casei* se cultivó en placas de agar De Man, Rogosa y Sharpe (DIFCO™, Sparks, E.U.A.) a 37 °C hasta observar crecimiento, e igualmente, *B. subtilis* se cultivó en placas de agar cuenta en placa (DIFCO™, Sparks, E.U.A.) a 30 °C.

El lote de producción fue 1 L de medio de cultivo líquido, se utilizó caldo De Man, Rogosa y Sharpe (DIFCO™, Sparks, E.U.A.) para *L. casei* y para *Bacillus* sp. se empleó la formulación descrita por Hee-Sik et al. (1997) con ligeras modificaciones, de acuerdo a los ingredientes disponibles en el laboratorio, cuya formulación es la siguiente (g/L): D-glucosa

(Sigma-Aldrich), 20;  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$  (Sigma-Aldrich), 10.5;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (Productos Químicos Monterrey), 1.5;  $(NH_4)_2SO_4$  (J. T. Baker), 6.8;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  (Sigma-Aldrich), 0.5;  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$  (Sigma-Aldrich), 0.05; extracto de levadura (DIFCO™), 0.5. Para la preparación del preinóculo, en ambos casos se inocularon 100 mL del medio líquido correspondiente en matraces Erlenmeyer de 250 mL sin deflectores y con tapones de algodón a partir de colonias aisladas incubadas por 24 horas en los medios utilizados para su recuperación. Las fermentaciones tuvieron una duración de 72 horas. En el caso de *L. casei*, la fermentación se hizo en un matraz Erlenmeyer de 1 L sin deflectores con tapones de algodón a 37 °C y sin agitación (Incubadora Mod. 132000, Boekel Scientific, Feasterville, E.U.A.). La fermentación de *B. subtilis* se realizó en un matraz con un sistema de agitación integrado de capacidad de 1 L (Mod. 4500, Corning ProCulture®, Tewksbury, E.U.A.) con tapones de algodón para permitir el intercambio de gases como el oxígeno, incubando en un baño de agua a una temperatura de 30 °C y 70 rpm utilizando una parrilla de agitación y un termopar (Mod. SP131825, Barnstead International, Dubuque, E.U.A.).

Para detectar la presencia de biosurfactantes en los medios de cultivo, se midió la tensión superficial de los medios de cultivo inoculados a temperatura ambiente (22-23 °C) cada 24 horas, empleando el método del anillo de Du Noüy en un tensiómetro modelo Ez-Pi Plus, Kibron, Finlandia. Para establecer una relación entre la producción de biosurfactante con el crecimiento bacteriano, se midió la absorbancia cada 24 horas, a 600 nm, en un espectrofotómetro modelo Genesys 10UV/VIS, Thermo Scientific Spectronic, E.U.A.

### **Separación**

En el caso de *L. casei*, concluido el tiempo de fermentación, se recuperó la biomasa celular por centrifugación a 7000 g, 10 min y 10 °C (Biofuge Primo R, Heraeus, E.U.A.), se resuspendió en 600 mL de buffer fosfato salino (PBS: 10 mM  $KH_2PO_4$  (J. T. Baker)/ $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$  (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) y pH ajustado a 7) y se dejó bajo agitación a 110 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente (22-23 °C) para lograr la extracción de biosurfactantes asociados a la membrana celular. Concluido lo anterior, se centrifugó nuevamente (7000 g, 10 min, 4 °C) para separar la biomasa del extracto, mismo que se esterilizó por filtración (membrana de nitrocelulosa de la marca Millipore™ de 0.22

µm), se ultracongeló a -70 °C y se liofilizó (FreeZone Mod. 7740020, LABCONCO, E.U.A.) (Rodrigues et al., 2006).

Por su parte, la biomasa celular de *Bacillus* sp. fue separada por centrifugación (7000 g, 10 min, 4 °C) del medio de cultivo empleado para la fermentación. Los biosurfactantes producidos se recuperaron por precipitación ácida (pH 2) del medio de cultivo sin biomasa celular con HCl (J.T. Baker) 1 M y se almacenaron por 24 horas a 4 °C. El precipitado se recolectó por centrifugación (7000 g, 10 min, 4 °C) y se resuspendió en agua desionizada cuyo pH fue ajustado a 7 con NaOH (Sigma) 0.1 M. Por último, el extracto se ultracongeló a -70 °C y se liofilizó (Joshi et al., 2008; Liu et al., 2016). El extracto liofilizado se disolvió en metanol y se filtró utilizando papel filtro Whatman™ 541. El filtrado se evaporó al vacío a 30 °C manteniendo el matraz rotando a 45 rpm (Rotavapor R-205, Büchi, Flawil, Suiza). Por último, el extracto se redisolvió en agua desionizada y se liofilizó.

Los biosurfactantes liofilizados se almacenaron a 4 °C. En el caso de *L. casei*, se midió la tensión superficial y la viscosidad a  $25 \pm 0.01$  °C (reómetro ARES RFS-III, TA Instruments, E.U.A.) del buffer PBS en que se resuspendió el extracto de biosurfactantes.

### **Caracterización**

Para realizar la determinación de la concentración micelar crítica, se prepararon disoluciones stock en agua desionizada de 55 mg/g (*L. casei*) y 90 mg/kg (*Bacillus* sp.). A partir de las disoluciones stock se realizaron disoluciones en agua desionizada de menor concentración: 0.5 – 50 mg/g (*L. casei*) y 10 – 84 mg/kg (*Bacillus* sp.). Se midió la tensión superficial de las disoluciones a temperatura ambiente (22-23 °C) empleando el método del anillo de Du Noüy. La tensión superficial se graficó en función de la concentración de biosurfactantes y a partir de la gráfica obtenida se determinó la CMC en el punto de inflexión.

El índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Pathak y Keharia (2014). Por cada 3 mL de aceite de maíz comercial Mazola®, se adicionaron 2 mL de una disolución de surfactantes (biosurfactantes de *L. casei*, biosurfactantes de *B. subtilis*, Tween 20 (Hycel de México) y Tritón X-100 (Hycel de México)) 0.1 g/100 g en agua desionizada y se mezclaron en un agitador vórtex vigorosamente por 2 minutos. Se preparó también un control negativo de aceite de maíz y agua destilada en la misma proporción. Se dejaron en reposo a temperatura ambiente (22-23

°C) y después de 24 horas se midió la altura de la emulsión y la altura total de líquido para cada caso. Teniendo ambos valores se obtuvo el índice de emulsificación mediante la Ecuación (1).

$$E_{24} = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total de líquido}} \times 100 \quad (1)$$

La estabilidad de los biosurfactantes se evaluó determinando el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua exponiendo los biosurfactantes a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentraciones de NaCl. Se prepararon disoluciones de biosurfactantes de *L. casei* de 12 mg/g en disoluciones con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5, 1, 4 y 8 g /100 mL), diferentes valores de pH (2, 4, 6 y 8) y recibieron varios tratamientos térmicos (pasteurización: 65 °C/30 min, esterilización: 121 °C/15 min, y ultrapasteurización: 135 °C/4 s) (Abdel-Mawgoud et al., 2008). La tensión superficial de cada disolución se midió a temperatura ambiente (22-23 °C) empleando el método del anillo de Du Noüy.

### **Identificación**

Los biosurfactantes liofilizados se analizaron por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) por reflectancia en pastilla de KBr (Espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400, Perkin-Elmer) y por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RMN) en disolución de agua deuterada a una frecuencia de 400 MHz (Espectrómetro de RMN de 9.4 T, Mod. VNMRS, Varian).

### **Aplicación**

Los biosurfactantes se emplearon para preparar espumas líquidas compuestas de aislado de proteína de suero de leche PROLACTA® a 90% (por sus siglas en inglés, WPI), un hidrocoloide (goma xantana, marca Kelco) y un surfactante (estearoil-2-lactilato de sodio, marca Palsgaard®, biosurfactantes de *L. casei* o de *B. subtilis*).

Se preparó una disolución de WPI de 10 g/100 mL disolviendo la cantidad requerida en una disolución de NaCl 100 mM y se mantuvo en agitación por 2 horas. Posteriormente, se ajustó el pH a 7 con NaOH 2.5 M y se mantuvo a 4 °C por una noche. Las disoluciones hidrocoloide/surfactante se prepararon disolviendo el surfactante en agua destilada (0.08 g/100 mL) y agregando después el hidrocoloide (0.15 g/100 mL). Por último, se prosiguió de

la misma manera que para el WPI. Para disolver el estearoil-2-lactilato de sodio (ELS), éste se mantuvo bajo agitación a 70 °C durante 30 minutos.

Una vez que se prepararon las disoluciones requeridas, la disolución de WPI se mezcló con cada una de las disoluciones hidrocoloide/surfactante en una relación 6:4. Las espumas se prepararon vertiendo 100 mL de la mezcla anterior en un vaso de precipitados de 600 mL y se homogeneizaron con un rotor-estator (Ultra Turrax T25 digital, IKA, Alemania) a 15400 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (22-23 °C) (López Santiago, 2017). Una vez formada la espuma se determinó el rendimiento mediante la Ecuación (2):

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Volumen de espuma} - \text{Volumen de líquido inicial}}{\text{Volumen de líquido inicial}} \times 100 \quad (2)$$

La estabilidad se determinó midiendo el líquido drenado cada 10 minutos a partir de 100 mL de espuma vertidos en una probeta de 100 mL durante 2.5 h.

Además de las espumas preparadas con proteína de lactosuero, se prepararon espumas con disoluciones de surfactantes en agua a una concentración superior a la CMC:  $n + 0.1n$ , donde  $n$  es la CMC expresada en g/100 g. De cada disolución, se midieron 15 mL, se vertieron en un vaso de precipitados de 50 mL y se homogeneizaron en un rotor estator (Ultra Turrax T25, IKA, Alemania) a 24000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente (22-23 °C). Por último, se determinó el rendimiento utilizando también la Ecuación 2.

Los biosurfactantes se emplearon también para preparar emulsiones y medir su estabilidad con el paso del tiempo basado en el método indicado por Song et al. (2002). Se utilizaron disoluciones acuosas de 0.5 g/100 g de biosurfactantes de *B. subtilis* y 1.5 g/100 g para el caso de los biosurfactantes de *L. casei* (ambas concentraciones superiores a su respectiva CMC). La concentración de aceite de maíz comercial Mazola® utilizada fue igual a la del surfactante en la emulsión correspondiente. Para la preparación de las emulsiones se empleó un rotor-estator (Ultra Turrax T25 digital, IKA, Alemania) a 8000 rpm durante 5 minutos. Al término de la preparación de las emulsiones, éstas se mantuvieron en reposo total a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron 40 (emulsiones con 0.5 g de surfactantes en 100 g) y 50 veces (emulsiones con 1.5 g de surfactantes en 100 g) en agua desionizada e

inmediatamente se registró la absorbancia de las emulsiones diluidas a 400 nm (longitud de onda a la que las emulsiones presentaron mayor absorbancia) cada 10 minutos hasta los 60 minutos utilizando como blanco, agua desionizada. Las mediciones de absorbancia se realizaron 1, 2, 3 y 7 días después de haber preparado las emulsiones.

Empleando el mismo procedimiento, se prepararon emulsiones con estearoil-2-lactilato de sodio y monolaurato de polioxietilensorbitano, conocido comercialmente como Tween 20. También se prepararon emulsiones control compuestas únicamente de aceite y agua desionizada.

Para cada valor de absorbancia se calculó la turbidez utilizando la siguiente ecuación:

$$\tau = 2.303 \times \text{Absorbancia} \quad (3)$$

Nota: Se eligieron el Tween 20 y el estearoil-2-lactilato de sodio para comparar con los biosurfactantes porque el primero es un surfactante no iónico y el segundo un surfactante iónico.

#### **Análisis estadístico**

Se calcularon los valores promedio y desviaciones estándar correspondientes utilizando Microsoft® Office Excel® 2013. En las pruebas de estabilidad se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 y en los casos requeridos se realizaron pruebas a posteriori de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Producción y separación

En la Tabla 2, se muestra la evolución del crecimiento celular y la tensión superficial durante la fermentación de *Lactobacillus casei*. Entre las 48 y las 72 horas se detectó un cambio considerable en los valores de absorbancia, lo que sugiere un incremento en el número de células de *Lactobacillus sp.* Para conocer la fase de crecimiento correspondiente a ese valor de absorbancia, es necesario obtener un número mayor de mediciones utilizando intervalos de tiempo menores. En lo que concierne a la tensión superficial del medio de cultivo comparado con el control ( $47.81 \pm 0.98$  mN/m), se observó una disminución total de 7 mN/m unidades al término de la fermentación. El cambio abrupto de tensión superficial ocurrió entre las 0 y 24 horas.

A pesar de que el número de mediciones en el tiempo no fue suficiente para determinar con certeza la fase del crecimiento en la que se detecta la actividad máxima del biosurfactante (valor mínimo alcanzado de la tensión superficial del medio de cultivo), el tiempo de duración de la fermentación puede reducirse a 24 horas pues no se observó una disminución notable de la tensión superficial de las 48 a las 72 horas. Se ha encontrado que durante la fase estacionaria, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* produce biosurfactantes con una menor y mejor definida concentración micelar crítica sin que exista una gran diferencia entre la actividad superficial de biosurfactantes obtenidos en la fase estacionaria y a la mitad de la fase exponencial (Velraeds et al., 1996). No obstante, para ello deben estudiarse por separado los biosurfactantes producidos por la especie bajo estudio en ambas fases de crecimiento para así determinar el tiempo óptimo de fermentación.

Después de extraer los biosurfactantes agitando suavemente la biomasa celular en buffer PBS, se comparó la tensión superficial de la disolución obtenida con el buffer PBS sin extracto (resultados mostrados en la Tabla 3), y se observó una reducción de la tensión

**Tabla 2.** Crecimiento celular y tensión superficial a lo largo de la fermentación de *Lactobacillus casei*.

	0 h	24 h	48 h	72 h
<b>Crecimiento celular (<math>A_{600\text{ nm}}</math>)</b>	$0.025 \pm 0.002$	$0.138 \pm 0.004$	$0.151 \pm 0.003$	$1.504 \pm 0.008$
<b>Tensión superficial (mN/m)</b>	$47.81 \pm 0.98$	$42.62 \pm 0.63$	$41.38 \pm 0.61$	$40.73 \pm 0.66$

El valor de la tensión superficial control fue  $47.81 \pm 0.98$  mN/m.

**Tabla 3.** Valores de tensión superficial del buffer PBS con y sin el extracto de biosurfactantes de *L. casei*.

	Buffer PBS sin extracto	Buffer PBS con extracto
<b>Tensión superficial (mN/m)</b>	72.03 ± 0.51	55.93 ± 0.30

superficial de 72.03 ± 0.51 a 55.93 ± 0.30 mN/m (16 unidades). Rodrigues et al. (2006) estudiaron la cinética de producción de biosurfactantes de bacterias ácido lácticas, entre ellas *Lactobacillus casei* CECT-5275, y encontraron que redujo la tensión superficial del buffer PBS de 70.0 ± 0.1 a 53.0 ± 0.1 mN/m (17 unidades). Con base en lo anterior, la reducción de la tensión superficial del medio de cultivo a lo largo de la fermentación (7 unidades) no fue tan apreciable como en el caso del buffer PBS con biosurfactantes (16 unidades), lo cual está relacionado con que la especie *L. casei* produce biosurfactantes que se mantienen unidos a la membrana en vez de ser excretados al medio (Fanun, 2014).

La viscosidad del buffer PBS con el extracto de biosurfactantes fue 1.16 ± 0.11 mPa·s a 25 °C (datos no mostrados). La viscosidad del agua es 1 mPa·s a 20 °C (Walstra, 2002), por lo que los biosurfactantes no provocan un cambio importante en la viscosidad del buffer PBS. Lo anterior constituye un aspecto favorable para el manejo de este fluido a gran escala.

Los resultados de crecimiento celular y tensión superficial del medio de fermentación de *B. subtilis* se exhiben en la Tabla 4. Entre las 0 y 24 horas se observa un aumento en la absorbancia, sin embargo, no se continuó con las mediciones debido a la formación de una biopelícula en la superficie del medio de cultivo. Cuando no se promueve la difusión de oxígeno hasta las células, esto da lugar a la formación de biopelículas en la superficie (Fratamico et al., 2009). En un primer intento de producir biosurfactantes con *B. subtilis*,

**Tabla 4.** Crecimiento celular y tensión superficial a lo largo de la fermentación de *B. subtilis*.

	0 h	24 h	48 h	72 h
<b>Crecimiento celular (A<sub>600 nm</sub>)</b>	0.073 ± 0.002	0.176 ± 0.002	ND	ND
<b>Tensión superficial (mN/m)</b>	54.04 ± 0.44	49.69 ± 0.32	49.66 ± 0.54	48.10 ± 0.55

ND: No determinado El control de tensión superficial fue 54.04 ± 0.44 mN/m.

no se formó espuma, la cual resulta de la aireación y de la presencia de proteínas u otras sustancias superficialmente activas (Flickinger, 2013). En un segundo intento, efectuando la fermentación con agitación constante, no se logró disminuir la formación de película en la superficie ni se formó espuma. Esto sugiere que la producción de biopelículas es independiente de la agitación o que la difusión de oxígeno no fue suficiente para evitar su formación. Además de la producción de espuma, influyen también otros factores como la composición del medio de cultivo y el mejoramiento genético relacionado con la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* (Yoneda et al., 2006). Dado que las mediciones espectrofotométricas no brindaban información sobre el crecimiento celular en forma de biopelícula, se considera que la determinación de la biomasa mediante esta técnica no es adecuada en este caso. Se sugiere entonces el uso del método gravimétrico, en el que se mide la masa seca de la biomasa de una serie de cultivos, donde cada cultivo corresponda a un intervalo de tiempo de la fermentación.

En cuanto a la producción de biosurfactantes, se encontró una reducción de la tensión superficial del medio de cultivo de  $54.04 \pm 0.44$  a  $48.10 \pm 0.55$  mN/m (6 unidades). Este cambio se presentó prácticamente entre las 0 y 24 horas de la fermentación. En la literatura está reportado que *B. subtilis* 20B reduce la tensión superficial del medio de cultivo de 50 a  $30.50 \pm 0.50$  mN/m (Joshi et al., 2008), y que esta especie produce biosurfactantes extracelularmente, es decir, los secreta al medio (Vlamakis et al., 2013). El seguimiento de la tensión superficial durante la fermentación no proporcionó evidencia suficiente de la presencia de biosurfactantes en el medio de cultivo como se esperaba. Esto probablemente esté asociado a la interferencia de otros solutos (azúcares, sales) en el medio al momento de realizar las mediciones de tensión superficial.

En la Tabla 5 se presenta el rendimiento del extracto obtenido de *B. subtilis* (0.095 g/L). Chtioui et al. (2012) produjeron biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 sin formación de espuma como una ventaja para el escalamiento del proceso y lograron un rendimiento de 0.212 g de surfactina por litro. En otro caso, en una fermentación anaeróbica con *Bacillus subtilis* DSM 10<sup>T</sup> obtuvieron 0.242 g/L de surfactina (Willenbacher et al., 2015). En otros estudios se ha indicado que la formación y remoción continua de espuma

**Tabla 5.** Rendimiento obtenido del extracto de biosurfactantes.

	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>
<b>Rendimiento (g/L)</b>	5.22	0.095

favorece una mayor producción de biosurfactantes y como consecuencia, un rendimiento mayor (Alonso y Martin, 2016). Se sugiere entonces el estudio y la optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para así maximizar la cantidad de biosurfactantes a producir.

En cuanto al rendimiento de *L. casei* (mostrado también en la Tabla 5), éste fue notablemente mayor en comparación con *B. subtilis* (55 veces mayor), sin embargo, se trata de especies distintas. Además, al ser la extracción de biosurfactantes de *L. casei* menos específica (agitación en buffer de células recuperadas por centrifugación seguida de liofilización) se pudo promover también la extracción de otros componentes celulares que podían no tener actividad superficial y al no realizarse otras operaciones de purificación subsecuentes, estos dos factores explican la mayor cantidad de extracto de biosurfactantes obtenida. Rodrigues et al. (2006), reportaron un rendimiento de 1.6 g/L por *L. casei* CECT-5275 en medio MRS de un lote de 100 mL calculado indirectamente utilizando una curva patrón que relaciona la tensión superficial de los biosurfactantes en buffer PBS, su concentración y el consumo de glucosa. A pesar de que las condiciones de fermentación fueron las mismas (temperatura y medio de cultivo) y que tampoco purificaron el extracto de biosurfactantes, la diferencia entre rendimientos puede deberse a la omisión de la preparación del preinóculo que no se menciona por dichos autores. El uso de un preinóculo puede promover un rendimiento mayor de biosurfactantes por el hecho de que la biomasa inicial en tal caso es mayor.

### **Caracterización**

En la Tabla 6, se exhibe la tensión superficial mínima del agua con cada extracto de biosurfactantes. Los biosurfactantes que redujeron en mayor medida la tensión superficial del agua fueron los obtenidos de la fermentación con *B. subtilis* (aprox. 43 unidades) en comparación con los de *L. casei* (aproximadamente 32 unidades).

**Tabla 6.** Tensión superficial del agua adicionada con biourfactantes.

	Biosurfactantes de <i>Lactobacillus casei</i> <sup>j</sup>	Biosurfactantes de <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> <sup>k</sup>
<b>Tensión superficial (mN/m)</b>	41.42 ± 0.32	29.18 ± 0.16

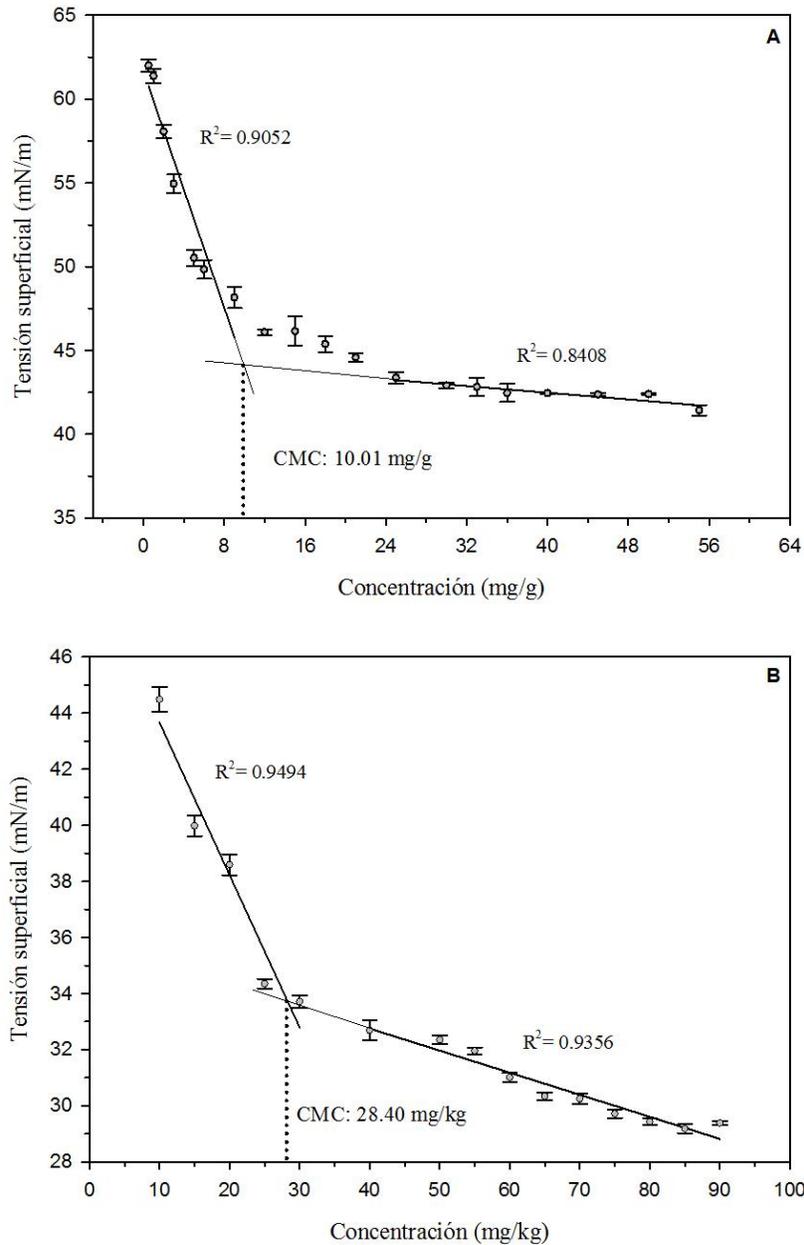
Tensión superficial del agua: 72.98 ± 0.11 mN/m j) Concentración de biosurfactantes: 55 mg/g; k) Concentración de biosurfactantes: 85 mg/kg.

Un biosurfactante efectivo es aquel que es capaz de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m según Mulligan (2005). Con base en lo anterior, sólo los biosurfactantes producidos por *B. subtilis* se consideran biosurfactantes efectivos, sin embargo, eso no descarta que aquellos producidos por *L. casei* sean de utilidad en sistemas que no requieran de biosurfactantes altamente efectivos.

En términos de eficiencia, se relaciona la reducción de la tensión superficial con la concentración de un surfactante en disolución (Pattanathu y Gakpe, 2008). La variación de la tensión superficial a medida que incrementa la concentración de los biosurfactantes se muestra en la Figura 3. Además de alcanzar valores de tensión superficial más bajos en agua, se requiere una menor cantidad del extracto de biosurfactantes de *B. subtilis* que de *L. casei* para reducir al mínimo posible la tensión superficial del agua.

Para el caso de *L. casei* y otras bacterias ácido lácticas que también producen biosurfactantes asociados a la membrana celular, los valores de CMC se encuentran entre 1 y 20 mg/mL. En el caso de *Lactobacillus acidophilus* RC14, 1 mg/mL (Velraeds et al., 1996); *Streptococcus thermophilus* A, 20 mg/mL (Rodrigues et al., 2006); *Lactobacillus fermenti* 126, 9 mg/mL (Brzozowski et al., 2011) y en este estudio con *L. casei*, 10 mg/g.

Por su parte, la CMC de los biosurfactantes de *B. subtilis* también se encuentra dentro de los valores de CMC reportados para la misma especie (10 – 25 mg/L) (Heryani y Putra, 2017). Surfactantes sintéticos como el dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés, SDS), cuya concentración micelar crítica es 1.8 mg/L con una reducción de la tensión superficial del agua hasta 37 mN/m (Satpute et al., 2008), y el estearoil-2-lactilato de sodio con una CMC



**Figura 3.** Valores de tensión superficial a diferentes concentraciones de los biosurfactantes producidos por (A) *Lactobacillus* sp. y (B) *Bacillus* sp. Cada punto representa el valor promedio de mediciones realizadas por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

de 500 mg/kg (Ortiz-Tafoya y Tecante, 2018), comparados con el extracto de *B. subtilis* (con grado de pureza menor), el extracto de *B. subtilis* tuvo una CMC de 28.40 mg/kg y logró reducir la tensión superficial del agua hasta 34 mN/m. Esto indica una mayor eficiencia relacionada con su actividad superficial.

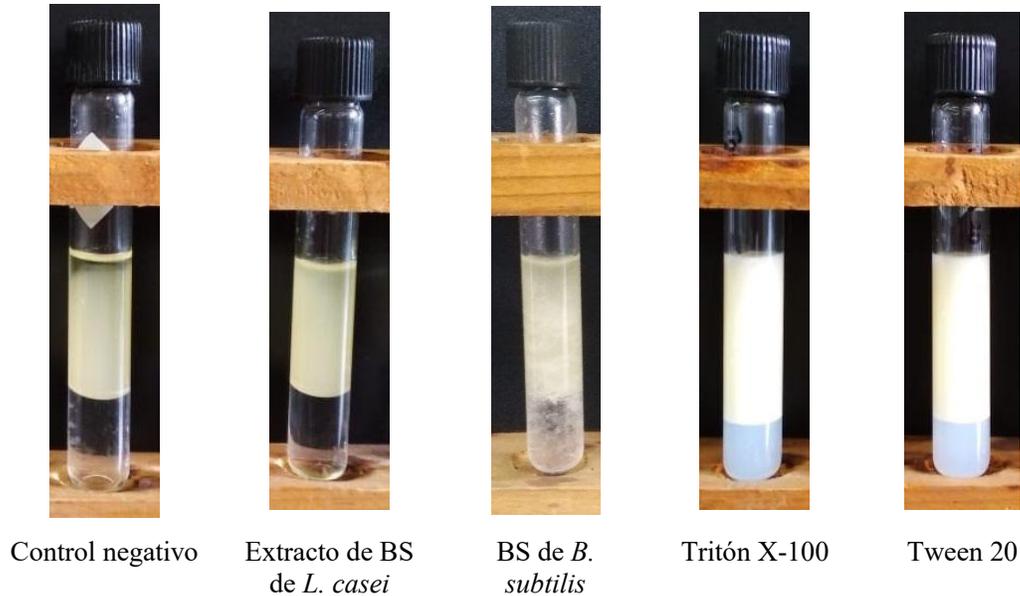
Con el objetivo de comparar la capacidad de emulsificación, en la Tabla 7 y Figura 4 se presentan los resultados del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de los biosurfactantes de *L. casei*, de *B. subtilis* y otros surfactantes comerciales como Tritón X-100 y Tween 20. Los surfactantes comerciales mostraron un índice de emulsificación muy semejante (70 y 71%), mientras que los índices de emulsificación para los biosurfactantes de *L. casei* y *B. subtilis* fueron nulos. En el caso de *B. subtilis*, la fase superior de aceite presentó flóculos a diferencia de la muestra con biosurfactantes de *L. casei* y el control, indicando que los biosurfactantes de *B. subtilis* lograron mantener glóbulos de aceite formados después de 24 horas. Los índices de emulsificación nulos obtenidos con las emulsiones preparadas con biosurfactantes, indican que estos poseen una menor efectividad frente a los surfactantes comerciales para aplicarse en emulsiones con aceite de maíz. No obstante, el índice de emulsificación puede variar entre aceites.

La utilidad y aplicación de los biosurfactantes en alimentos depende en parte de los efectos que tengan la temperatura, la concentración de cloruro de sodio y el pH en su actividad superficial. Para evaluar la estabilidad de los biosurfactantes, éstos se expusieron a condiciones diferentes de dichos parámetros. Los resultados derivados de estos experimentos se encuentran en las Figuras 5 y 6. En el caso de los biosurfactantes producidos por *L. casei* después de recibir los distintos tratamientos térmicos (Figura 5-A), se observó un incremento en el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua (de 2 a 3 unidades). Esto puede deberse a que el calentamiento provocó cambios en la estructura química de los biosurfactantes, tales que permitieron una mayor extensión de la molécula en la superficie. Como ocurrió en los tratamientos térmicos, los biosurfactantes también mostraron estabilidad a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio evaluadas (Figura 5-B). En

**Tabla 7.** Índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de aceite de maíz comercial con los biosurfactantes producidos por *L. casei*, *B. subtilis* y surfactantes comerciales.

	Control negativo	Extracto de BS de <i>L. casei</i>	Biosurfactantes de <i>B. subtilis</i>	Tritón X-100	Tween 20
$E_{24}$ (%)	0 ± 0.1	0 ± 0.1	0 ± 0.1	71 ± 0.1	70 ± 0.1

La concentración de los surfactantes fue 0.1 g/100g. (n=3)

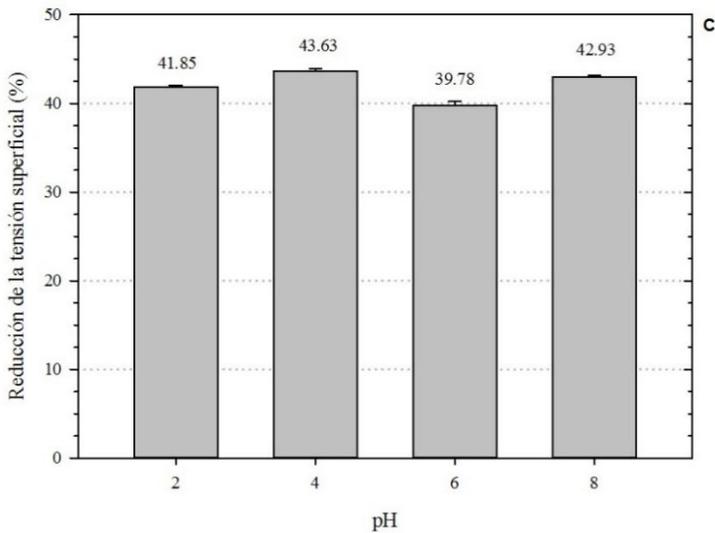
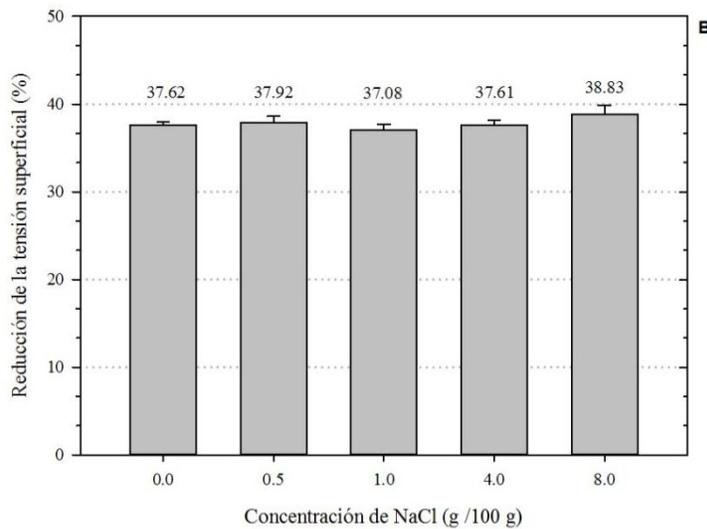
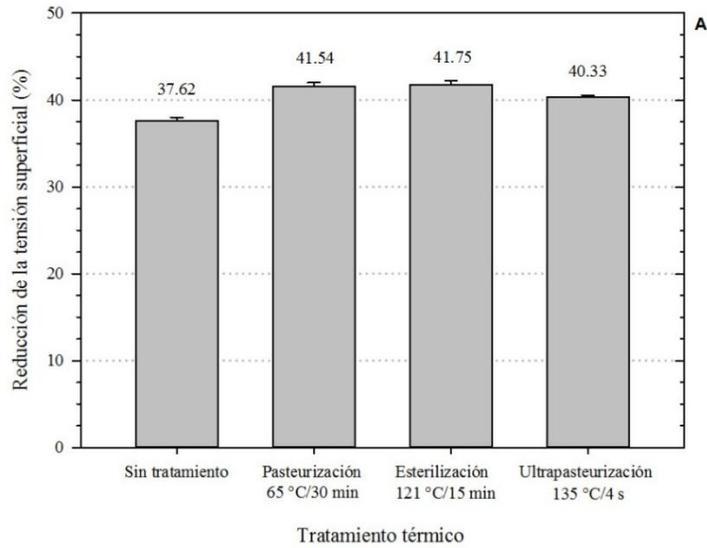


**Figura 4.** Pruebas del índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de aceite de maíz comercial con los surfactantes.

todos los casos no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de reducción de la tensión superficial en comparación con el control.

Los valores de pH empleados se encuentran dentro del intervalo de pH que presentan diversas categorías de alimentos. Los resultados se pueden ver en la Figura 5-C para el caso de *L. casei*. Los porcentajes de reducción de tensión superficial más altos se presentaron a valores de pH 4 y 8, y el porcentaje más bajo a pH 6. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de los cuatro valores de pH y comparando éstos con el control (37.62%), los porcentajes son mayores. Tomando en cuenta lo anterior, se presume que estos biosurfactantes presentan estabilidad a pH 2, 4, 6 y 8, pues no perdieron actividad superficial. Igualmente, estos biosurfactantes pueden ser considerados estables a tratamientos térmicos severos y a las concentraciones de cloruro de sodio utilizadas.

Gudiña et al. (2015), estudiaron la estabilidad de biosurfactantes asociados a la membrana obtenidos de *Lactobacillus agilis* CCUG31450; estos presentaron una buena estabilidad a altas temperaturas (reducción de 41.35% de la tensión superficial del agua después de incubar a 121 °C por 20 minutos), sin embargo, el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua disminuyó a ~40.00% a mayores concentraciones de NaCl de hasta 10%,



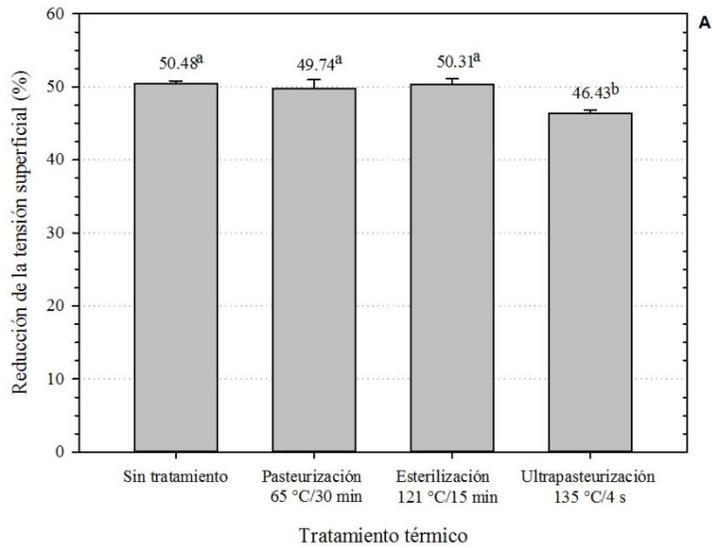
**Figura 5.** Efecto de la temperatura (A), cloruro de sodio (B) y pH (C) en la actividad superficial de los biosurfactantes producidos por *Lactobacillus casei* en una concentración de 12 mg/g. La actividad superficial se expresó como el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua ( $72.98 \pm 0.11$  mN/m). En todos los casos no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. (n=3)

y a 35.60% a condiciones más ácidas (pH 2). Por el contrario, Portilla-Rivera et al. (2008), reportaron que los biosurfactantes producidos por *L. pentosus* CECT 4023 únicamente presentaron estabilidad a temperaturas entre 10 y 40 °C. A diferencia de las bacterias ácido lácticas mencionadas, los biosurfactantes de *L. casei* muestran una mayor estabilidad a condiciones variables de cloruro de sodio, de pH y de distintos tratamientos térmicos.

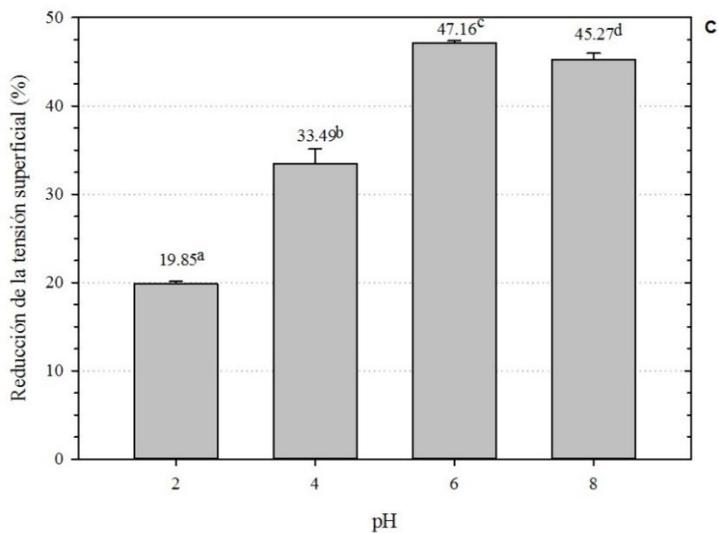
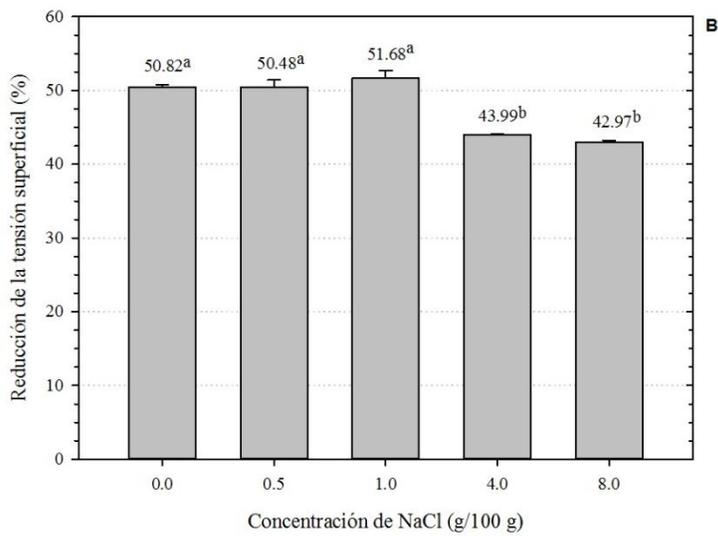
Por su parte, los biosurfactantes producidos por *B. subtilis* tras los tratamientos térmicos equivalentes de pasteurización y de esterilización (ver Figura 6-A), no revelaron diferencia significativa alguna con el control en términos del porcentaje de reducción de la tensión superficial (49.74, 50.31 y 50.48%, respectivamente). Otros autores han reportado también que los biosurfactantes de *B. subtilis* presentan una excelente estabilidad térmica. Mohd et al. (2016) encontraron que los biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* UKMP-4M5 exhibieron estabilidad térmica a 100 °C hasta por 1 hora y a 121°C durante 20 minutos. Asimismo, Bezza y Chirwa (2015) reportaron no haber encontrado diferencias en la reducción de la tensión superficial del agua a 120 °C durante 30 minutos por biosurfactantes de *Bacillus subtilis* CN2. En cambio, bajo las condiciones de ultrapasteurización de este trabajo, se encontró una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua de 50.48 a 46.43%. No obstante, a pesar de ser una disminución de 4.05 unidades, dependiendo de la aplicación en la que se utilicen los biosurfactantes, éstos pueden seguir siendo de utilidad en diversos sistemas dado que no se perdió la actividad superficial en su totalidad.

En cuanto a la estabilidad de los biosurfactantes de *B. subtilis* ante la presencia de cloruro de sodio (Figura 6-B), no se presentaron cambios en la actividad superficial a 0.5 y 1 g/100 g. A concentraciones de 4 y 8 g/100 g, se detectó una disminución de 7 y 8 unidades por debajo del control, respectivamente. De igual manera, como en el caso de los cambios observados para los tratamientos térmicos, se continuó exhibiendo actividad superficial a pesar de ser menos efectiva.

Por último, en la Figura 6-C se muestran los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad de los biosurfactantes de *B. subtilis* a diferentes valores de pH. El porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua resultó estadísticamente diferente para los valores de pH



**Figura 6.** Efecto de la temperatura (A), cloruro de sodio (B) y pH (C) en la actividad superficial de los biosurfactantes producidos por *B. subtilis* en una concentración de 30 mg/kg. (n=3) La actividad superficial se expresó como el porcentaje de reducción de la tensión superficial del agua ( $72.98 \pm 0.11$  mN/m). Aquellos valores con letras distintas (a-d) en una sola gráfica presentan diferencia significativa entre sí ( $p < 0.05$ ).



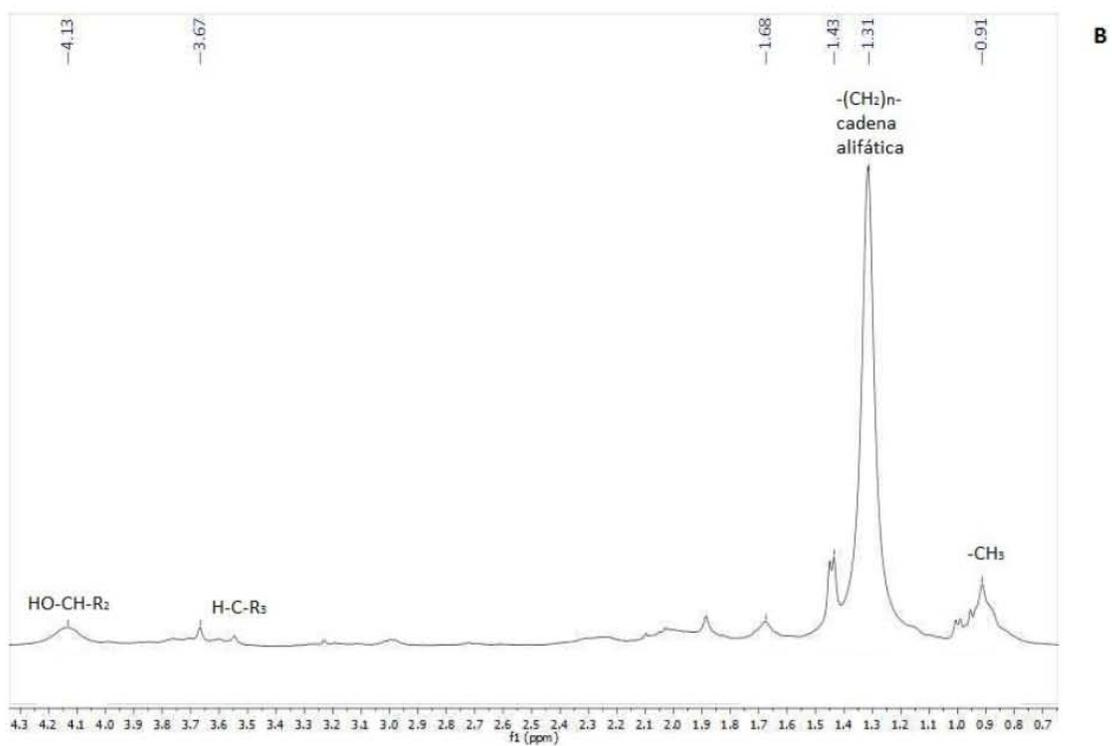
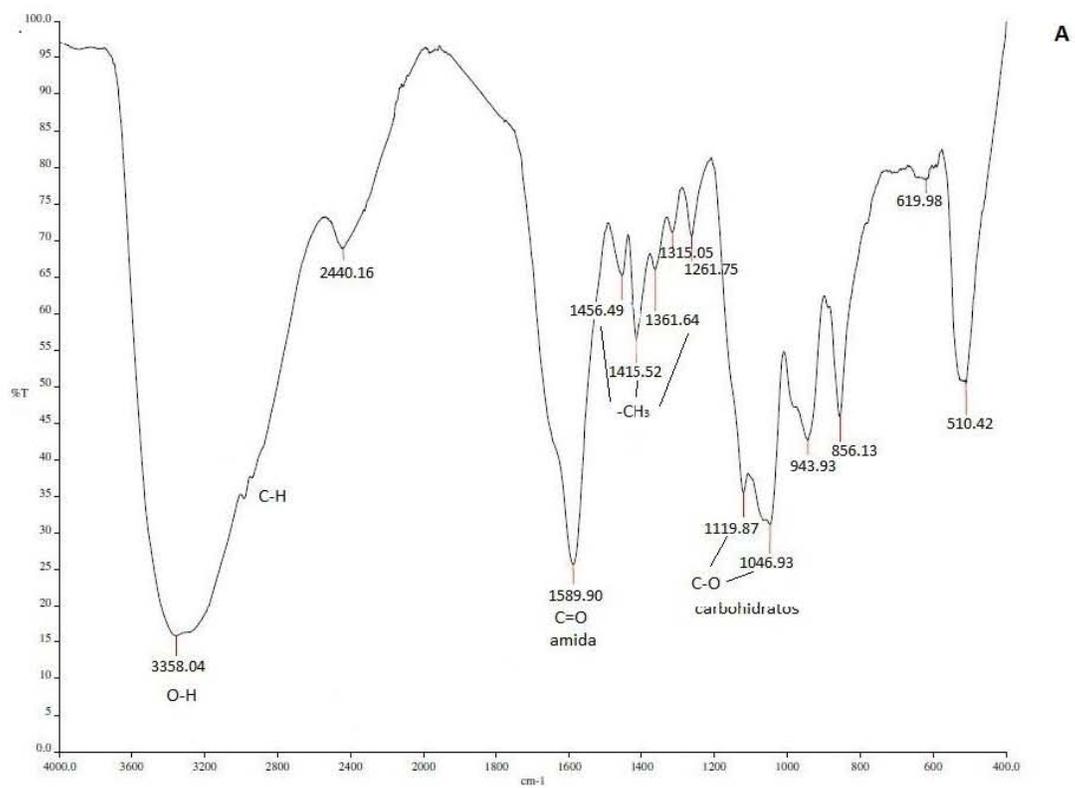
utilizados y se observó un menor porcentaje a medida que el pH fue disminuyendo desde un valor de 6 a 2. Esto puede deberse a la presencia de aminoácidos ácidos y cadenas peptídicas identificados por métodos analíticos instrumentales que se discuten en la siguiente sección. Dicha porción ácida, puede provocar la agregación de los biosurfactantes por el estado neutro de la molécula a valores bajos de pH y como consecuencia, la disminución de la actividad superficial (Abdel-Mawgoud et al., 2008). Bezza y Chirwa (2015), Mohd et al. (2016) y Hee-Sik et al. (1997) obtuvieron resultados similares sobre el descenso de actividad superficial en medio ácido ( $\text{pH} < 5$ ) de biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* CN2, *Bacillus subtilis* UKMP-4M5 y *Bacillus subtilis* C9, respectivamente.

De acuerdo a los estudios de estabilidad de los biosurfactantes de *B. subtilis*, éstos son considerablemente estables a tratamientos térmicos severos y moderadamente estables a la presencia de cloruro de sodio en concentraciones comunes en alimentos. En cuanto a las condiciones de pH, por debajo de 5 se pierde en gran medida su actividad superficial por lo que esto puede limitar su uso en alimentos, pues gran parte de estos poseen un pH ácido entre 2 y 6.5 (Harrison, 2017).

Es importante tomar en cuenta que el efecto del calentamiento, de las concentraciones de NaCl y el pH de los biosurfactantes en disolución se evaluó por separado y que estas condiciones en conjunto pueden tener un efecto distinto al encontrado en este estudio.

### **Identificación**

La espectroscopia de infrarrojo permite detectar los grupos funcionales presentes en una determinada molécula; y por su parte, la espectroscopia por resonancia magnética nuclear asiste en la deducción de la estructura química (Solomons, 1995). En la Figura 7, se muestran los espectros de infrarrojo (Figura 7-A) y el de resonancia magnética nuclear (Figura 7-B) del extracto con biosurfactantes de *L. casei*. Las bandas identificadas de mayor importancia en el espectro de infrarrojo fueron  $3358.04 \text{ cm}^{-1}$  (enlace O-H),  $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$  (enlaces C-H que indican la presencia de compuestos saturados),  $1589.90 \text{ cm}^{-1}$  (enlace C=O perteneciente a una amida),  $1119.87$  y  $1046.93 \text{ cm}^{-1}$  (enlace C-O presente en carbohidratos) (Wang y Scott, 2005). En el espectro de resonancia magnética nuclear se encontraron desplazamientos químicos correspondientes a cadenas alifáticas (0.91 y 1.31 ppm) y



**Figura 7.** (A) Espectro FTIR y (B) espectro <sup>1</sup>H RMN de los biosurfactantes producidos por *L. casei*.

probablemente de carbonos polisustituídos (metilenos y metinos) a 3.67 y 4.13 ppm. Sin embargo, a intensidades menores de campo magnético no se encontró algún desplazamiento de hidrógeno en el enlace N-H de la amida identificada por espectroscopía de infrarrojo. Tomando en cuenta lo encontrado en el espectro de infrarrojo presumiblemente se trata de una molécula parecida a una glucoproteína. En algunos estudios se ha encontrado que *Lactobacillus casei* produce biosurfactantes tipo glucoproteínas pero también glucolípidos (Sharma, 2016). Sin embargo, es necesaria su purificación y el uso de otras técnicas complementarias como la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (que provee información del esqueleto carbonado) y la espectrometría de masas (que provee información de la masa molar) para obtener información más concluyente sobre la naturaleza y estructura química.

En el caso de *B. subtilis*, se encontraron bandas consistentes con la presencia del enlace O-H ( $3272.92\text{ cm}^{-1}$ ), el enlace C-H presente en metilos y metilenos ( $2800\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ ), el enlace C=O de amidas ( $1643.28\text{ cm}^{-1}$ ) y el enlace N-H de amidas ( $1537.17\text{ cm}^{-1}$ ) en el espectro de infrarrojo (Figura 8-A). Las señales del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (Figura 8-B) indican la presencia de un grupo amida (6.5-10 ppm) y enlaces C-H (3.30 - 3.60 ppm) en un arreglo parecido a cadenas peptídicas de acuerdo a Pereira et al. (2013), un grupo éter a 3.57 ppm que puede corresponder a un grupo metoxi en un aminoácido ácido (Tang et al., 2007), átomos de hidrógeno de una cadena alifática (1.32 ppm) y grupos metilo (0.94 ppm). Por último, también se detectó un grupo carbonilo de éster a 5.24 ppm perteneciente a un anillo de lactona que se identificó en la caracterización de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* HSO 121 (Liu et al., 2009). Con base en la información encontrada en ambos espectros de *B. subtilis*, se presume que estos biosurfactantes son lipopéptidos.

No se consideró la integral y multiplicidad de las señales (en intervalos de 0.5 a 1.5 ppm y 3 a 4.5 ppm) en el espectro de RMN de *B. subtilis* debido a que las líneas base no estaban altamente definidas y éstas dificultaron la identificación de señales distintas. Esto se atribuye a la presencia de otras impurezas en los extractos obtenidos.

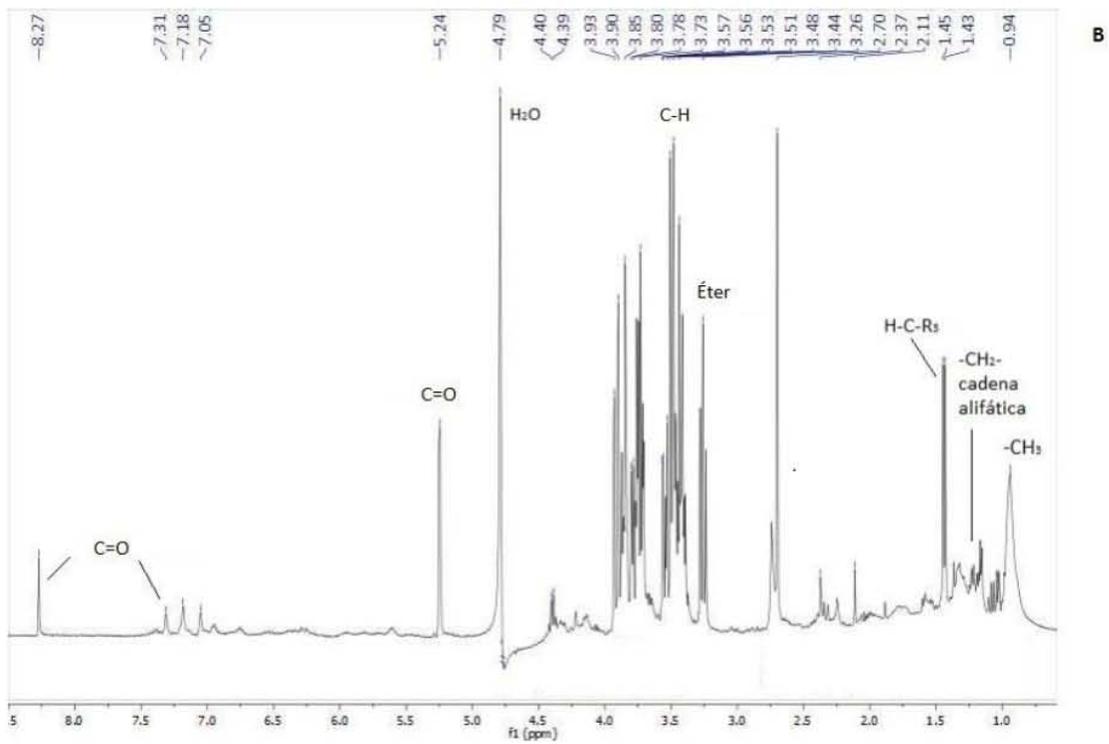
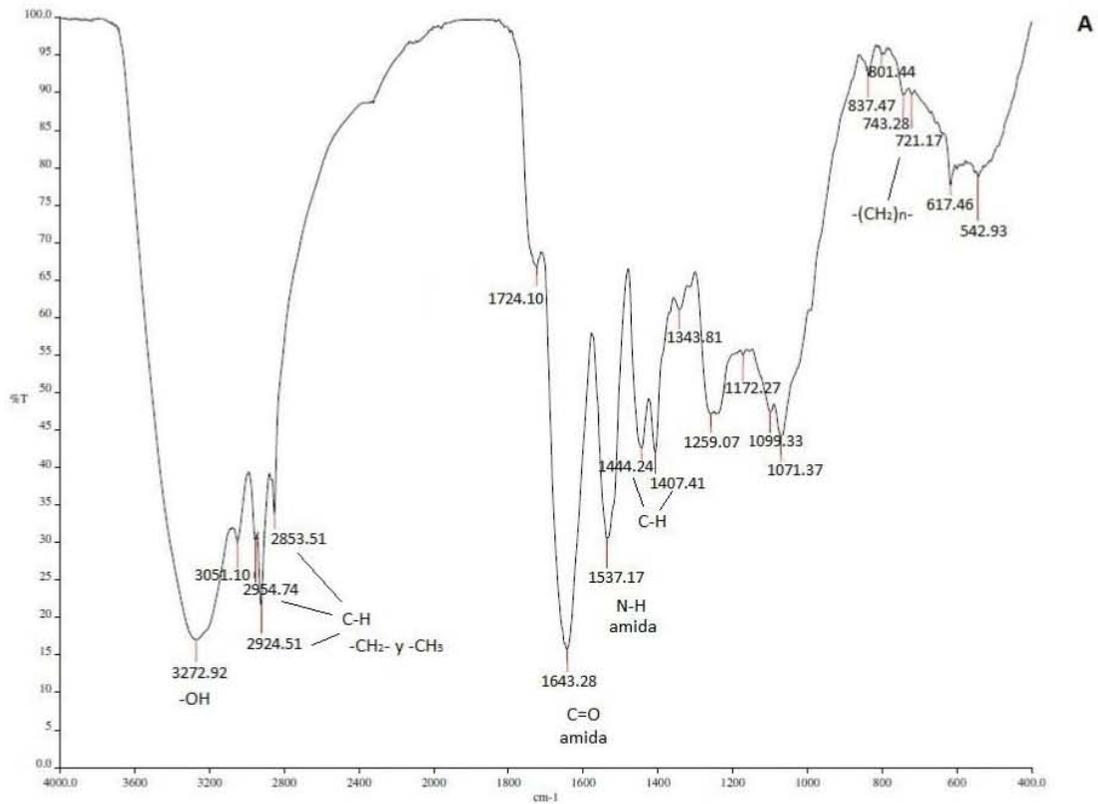


Figura 8. (A) Espectro FTIR y (B) espectro <sup>1</sup>H RMN de los biosurfactantes producidos por *B. subtilis*.

## Aplicación

Los resultados del rendimiento de espumas líquidas se muestran en la Tabla 8, la concentración empleada de surfactantes fue 0.08 g/100 g debido a que no se contaba con una cantidad suficiente de extracto de biosurfactantes de *B. subtilis*. Comparando el rendimiento de ambos extractos de biosurfactantes con el control (sin surfactante), se obtuvieron rendimientos iguales (300%). En cambio, el rendimiento de la espuma con estearoil-2-lactilato de sodio (ELS) fue menor (200%). Se observaron burbujas de aire más pequeñas y espumas más finas preparadas con los biosurfactantes que aquella preparada con estearoil-2-lactilato de sodio (Figura 9).

En primer lugar, lo anterior puede explicarse por la concentración utilizada para el ELS y los biosurfactantes, que es menor a la concentración micelar crítica de cada uno de los biosurfactantes y poco superior a la del ELS (CMC de 0.05 g/100g). Por ello, la concentración empleada de 0.08 g/100 g no fue suficiente para cubrir la nueva superficie en la interfase. En segundo lugar, se debe a la ineficiencia de los biosurfactantes al migrar hacia la interfase entre el aire incorporado y el líquido previo a la coalescencia de burbujas de aire frente a las proteínas del lactosuero, que fueron las encargadas de la formación de espuma en este sistema. Es importante mencionar que los biosurfactantes no poseen un alto grado de pureza y que las impurezas pueden también afectar su desempeño durante la formación de espumas líquidas. El ELS, a diferencia de los biosurfactantes, tuvo un efecto de reducción en el rendimiento de la espuma formada por las proteínas del lactosuero que puede ser atribuido a su baja masa molar comparada con dichas proteínas y que le permitió migrar más rápido a la nueva superficie en la que se encontraban tanto proteínas como moléculas de ELS. Razón que explica una espuma menos fina que las otras dos espumas de biosurfactantes.

**Tabla 8.** Rendimiento obtenido de la preparación de las espumas líquidas con proteínas de lactosuero y un surfactante. (n=1)

	Control	Extracto de BS de <i>L. casei</i>	Extracto de BS de <i>B. subtilis</i>	Estearoil-2-lactilato de sodio
<b>Rendimiento (%)</b>	300 ± 1	300 ± 1	300 ± 1	200 ± 1



Estearoil-2-lactilato de sodio

Extracto de BS de *L. casei*

Extracto de BS de *B. subtilis*

**Figura 9.** Vista superior de las espumas líquidas preparadas con proteínas de lactosuero y un surfactante.

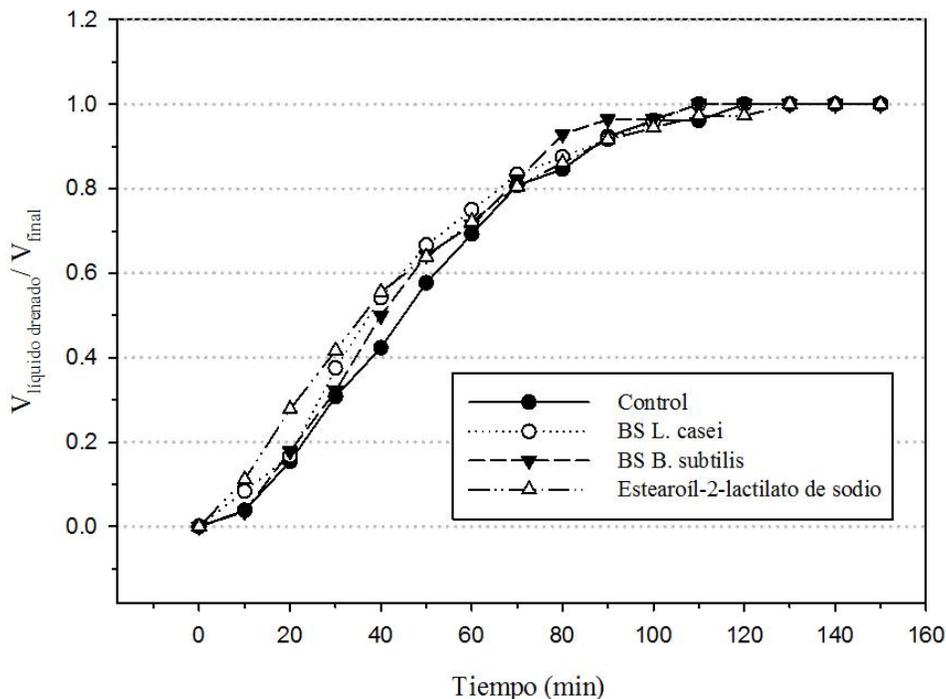
En la Figura 10, se exhibe el aumento del volumen de líquido drenado a partir de 100 mL de espuma durante 2 horas y media. Las curvas que se observan presentaron el mismo comportamiento desde el minuto 0 hasta después de 90 minutos de que se formaron las espumas. El volumen drenado fue aumentando hasta permanecer constante a partir de los 130 minutos. Como se explicó en el párrafo anterior, los espumas formadas que contenían un surfactante además de las proteínas de lactosuero, no tuvieron un efecto positivo en la formación y rendimiento de las espumas por lo que no lograron estabilizar la emulsión líquido-aire desde su formación. Como consecuencia, las curvas obtenidas de las tres espumas con biosurfactantes fueron similares a la del control.

El rendimiento de las espumas sólo con surfactantes en agua se muestra en la Tabla 9, esto con el objetivo de evaluar la capacidad de los biosurfactantes de formar espumas. Los biosurfactantes de *L. casei* lograron producir un volumen de espuma mayor al volumen de líquido inicial por lo que el rendimiento (utilizando la Ecuación 2) fue 35.6%, mientras que

**Tabla 9.** Rendimiento obtenido de la preparación de las espumas líquidas de surfactantes sin proteínas de lactosuero. (n=3)

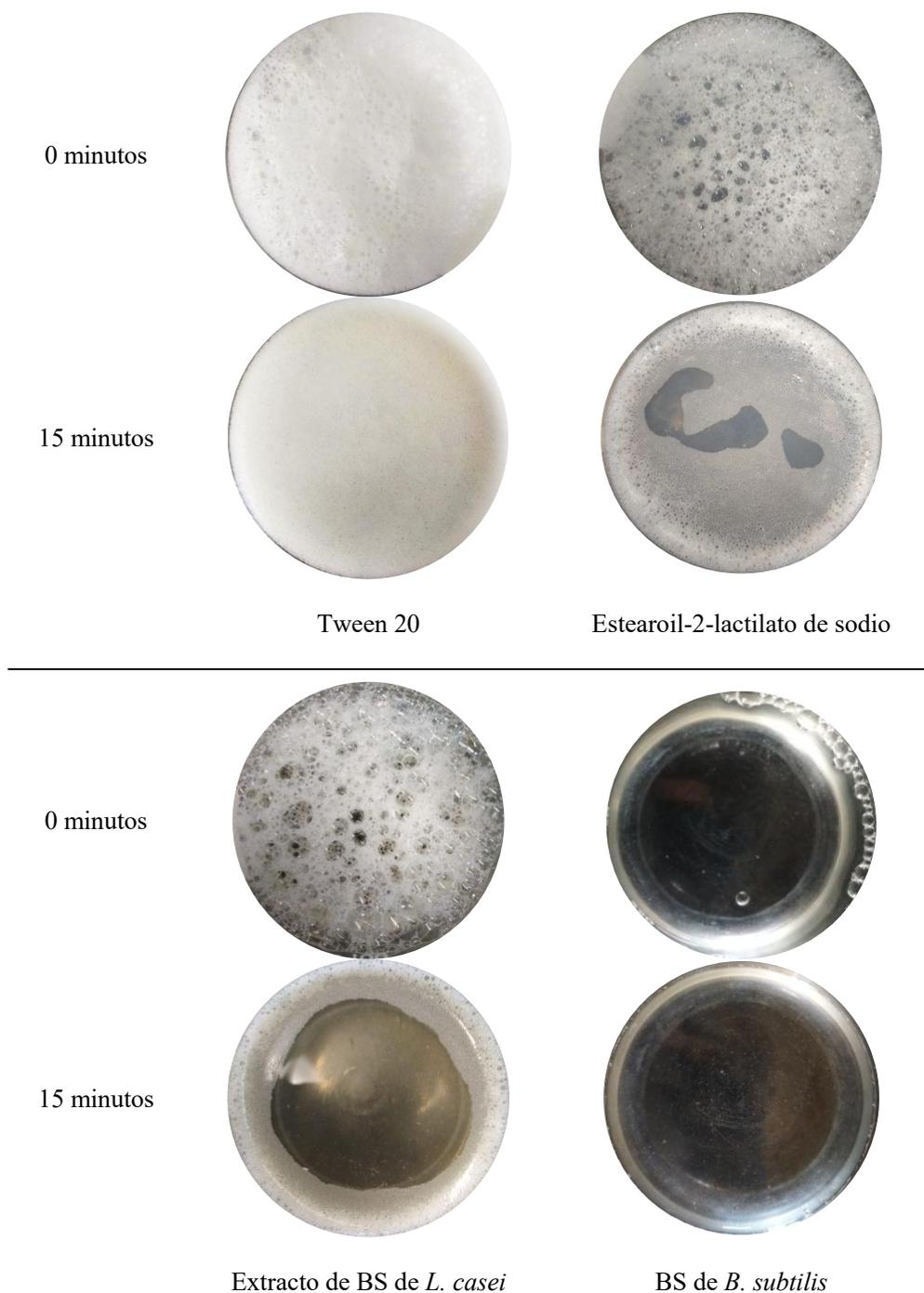
Surfactante Concentración	Tween 20 0.0074 g/ 100 g	ELS 0.055 g/ 100 g	Extracto de BS de <i>L. casei</i> 1.1 g/ 100 g	BS de <i>B. subtilis</i> 0.0035 g/ 100 g
Rendimiento (%)	249.6 ± 34.5	129.4 ± 47.6	35.6 ± 3.8	N/A

N/A: No aplica. No se produjo espuma.



**Figura 10.** Estabilidad de las espumas líquidas con proteína de lactosuero medida por el volumen drenado durante dos horas y 30 minutos.

los biosurfactantes de *B. subtilis* no lograron producir espuma aun cuando su concentración fue mayor a la concentración micelar crítica. Al emplear surfactantes como Tween 20 y ELS, se obtuvieron rendimientos mayores, 249.6 y 129.4%, respectivamente. Las diferencias entre los rendimientos se debe a factores como la tensión superficial del líquido en presencia de un surfactante, la concentración del surfactante, la velocidad de difusión hacia la interfase, la estructura de los surfactantes (localización de grupos hidrofílicos y la ramificación de cadenas hidrocarbonadas) y en el caso de surfactantes iónicos, del tamaño de sus contraiones (Rosen, 2004). Considerando que la concentración para cada biosurfactante fue 10% superior a su respectivo valor de CMC y que a menor tensión superficial se espera que el volumen de espuma sea mayor, en este trabajo se esperaba que los biosurfactantes de *B. subtilis* produjeran un mayor volumen de espuma en comparación con los de *L. casei*. Sin embargo, ocurrió lo contrario y factores como la difusión hacia la interfase, grado de pureza, naturaleza y estructura química deben considerarse en conjunto para proveer una explicación razonable. Por ello, también es importante la identificación del tipo de moléculas que son los biosurfactantes y el conocimiento de su estructura química.



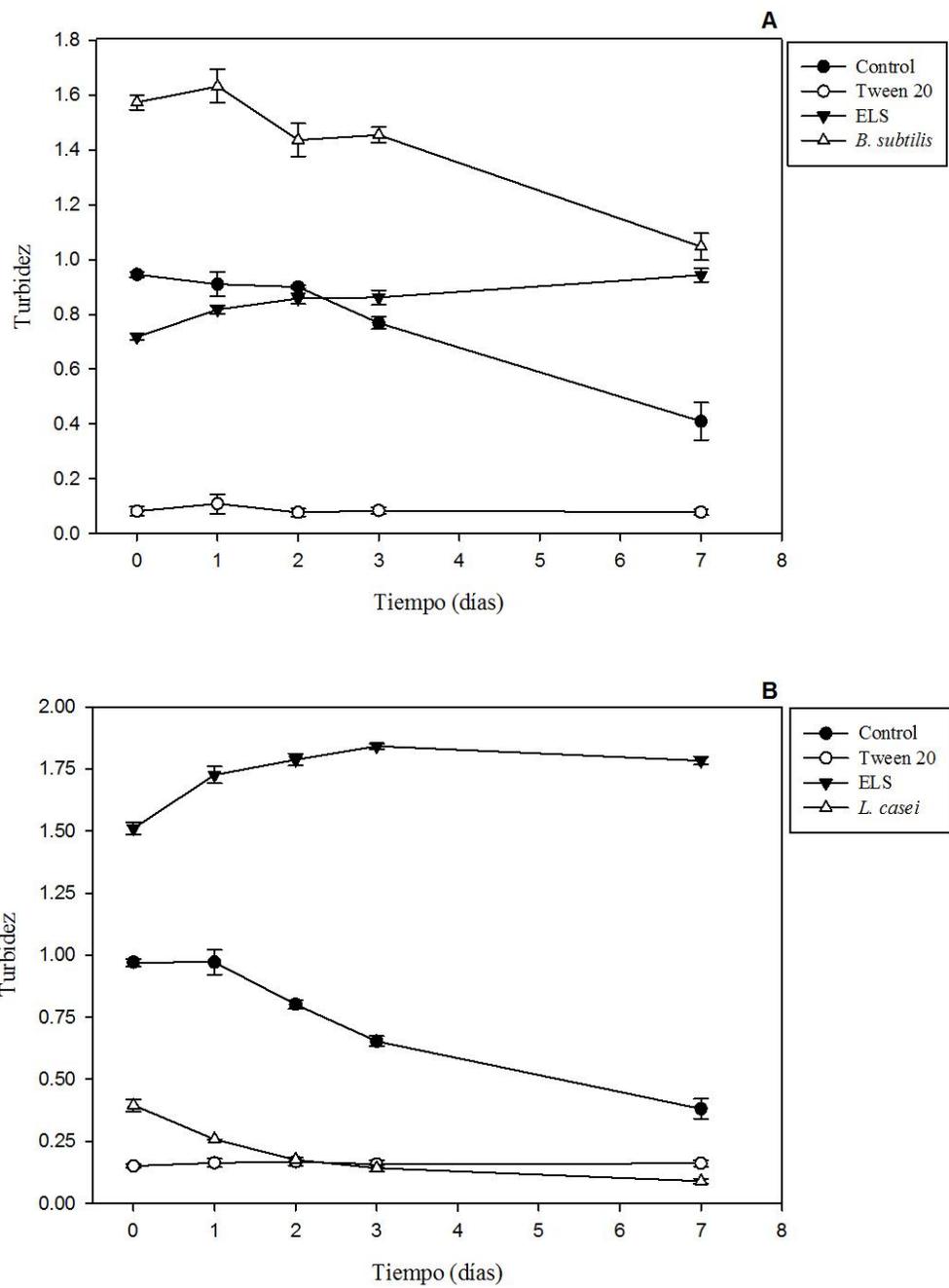
**Figura 11.** Vista superior de las espumas líquidas de surfactantes sin proteínas de lactosuero.

En cuanto a la vista superior de las espumas líquidas que se prepararon, los biosurfactantes de *L. casei* y el ELS tomaron más tiempo para migrar a la interfase y cubrirla por completo antes de que se formaran burbujas de mayor tamaño. Por lo cual, contrario a las espumas

preparadas con Tween 20, el tamaño de las burbujas a simple vista resultó mayor (ver Figura 11). Quince minutos después de preparar las espumas, el líquido que formaba parte de ambas espumas drenó casi por completo a diferencia de las espumas con Tween 20. La permanencia de las espumas con Tween 20 sugiere que son más estables que las preparadas con los otros surfactantes empleados.

Por último, también se evaluó la capacidad de los biosurfactantes de formar y estabilizar emulsiones aceite en agua. Para calificar la estabilidad de las emulsiones resultantes, se midió la turbidez de las emulsiones mantenidas en condiciones de reposo por varios días. Los resultados se presentan en la Figura 12. Para el caso de *B. subtilis*, la concentración que se utilizó de surfactantes y aceite se limitó a 0.5 g/100 g por el bajo rendimiento de producción de biosurfactantes. De acuerdo a Song et al. (2002), la turbidez de una emulsión descende con el tiempo a determinada longitud de onda por la desestabilización de la misma. La emulsión control y aquellas que contenían a los biosurfactantes, exhibieron dicha tendencia. Las emulsiones con ELS, mostraron un comportamiento distinto en el que la turbidez de estas emulsiones aumentó con el paso del tiempo. Una posible explicación es que el surfactante que no se adsorbió en las gotas de aceite formó agregados que se fueron depositando en el fondo provocando que la turbidez aumentara cada día. Por otra parte, el hecho de que las emulsiones con Tween 20 presentaran prácticamente la misma turbidez desde su preparación hasta después de 7 días, sugiere que dichas emulsiones se mantuvieron estables.

Al comparar la emulsión control con la emulsión con biosurfactantes de *B. subtilis* (Figura 12-A), se observa que la turbidez de la segunda es mayor que la de la primera. Song et al. (2002), explica que la dispersión de la luz es mayor cuando el tamaño de partícula disminuye. Con base en lo anterior, se puede decir que el tamaño de las gotas de aceite, justo después de la preparación de las emulsiones, es mayor para la emulsión control que aquella con biosurfactantes de *B. subtilis* pero para confirmarlo, otra técnica o instrumento que brinde una estimación del tamaño de partícula debe emplearse. Después de 7 días, la turbidez disminuyó aproximadamente 0.6 unidades de turbidez en ambos casos, por lo que otro factor diferente del tamaño de las gotas de aceite, como la ausencia de carga superficial



**Figura 12.** Turbidez de emulsiones en función del tiempo, cuya fase oleosa y surfactantes se encuentran en una concentración del 0.5 g/100 g (A) y 1.5 g/100 g (B).

impartida por la adsorción de biosurfactantes, pudo provocar la desestabilización de las emulsiones con biosurfactantes en la misma medida que se desestabilizó la emulsión control.

Por último, la turbidez de la emulsión preparada con biosurfactantes de *L. casei* disminuyó en mayor medida durante los dos primeros días y después los cambios fueron poco apreciables hasta los 7 días (Figura 12-B). Esto quiere decir que llegó a una etapa en la que la separación de fases empezó a ocurrir lentamente a diferencia del control, cuyo descenso de turbidez fue mayor.

Dado que la turbidez inicial de la emulsión control fue aproximadamente el doble que el de la emulsión con biosurfactantes de *L. casei*, y que las emulsiones con gotas de aceite de mayor tamaño se desestabilizan con mayor rapidez, se presume que las emulsiones con estos biosurfactantes presentan menor estabilidad que las emulsiones control. Algunos factores que pueden provocar la desestabilización de emulsiones con biosurfactantes similares al control son: una carga nula superficial de las gotas de aceite, una baja velocidad de difusión de los biosurfactantes hacia la interfase y el tamaño de las gotas de aceite. Considerando que los biosurfactantes no tienen un alto nivel de pureza, la presencia de otros compuestos pudo provocar también un efecto negativo en la capacidad emulsificante de estas biomoléculas.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener surfactantes por vía fermentativa producidos por *Lactobacillus casei* y *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, lo cual se confirmó por su capacidad de reducir la tensión superficial del agua de 72.98 mN/m a 41.42 y 28.19 mN/m, respectivamente.

En términos de la CMC, la eficiencia de los biosurfactantes de *L. casei* es comparable con la de otras bacterias ácido lácticas, mientras que los biosurfactantes de *B. subtilis* son aún más eficientes que el ELS y el SDS.

El extracto de biosurfactantes de *L. casei* no presentó capacidad emulsificante ( $E_{24}$ ) a las concentraciones que comúnmente se emplean los surfactantes en emulsiones (0.1%) y bajo las condiciones empleadas para su preparación. Estos biosurfactantes presentaron estabilidad a tratamientos térmicos severos (pasteurización, esterilización y ultrapasteurización), concentraciones de cloruro de sodio de hasta 8 g/100 g, condiciones ácidas (pH 2) y condiciones ligeramente básicas (pH 8). En el caso de los biosurfactantes de *B. subtilis*, a pesar de que presentaron un índice de emulsificación nulo, se observaron glóbulos de grasa floculados después de 24 horas en lugar de una fase homogénea como el control, y mantuvieron gran parte de su actividad superficial tras experimentar los mismos tratamientos térmicos, ante las mismas concentraciones de cloruro de sodio y a valores de pH 6 y 8.

De acuerdo a los espectros FTIR y de RMN, el extracto de biosurfactantes de *L. casei* presenta señales de enlaces de moléculas que se asemejan a glucopéptidos. Por otra parte, los biosurfactantes del extracto de *B. subtilis* son presumiblemente lipopéptidos.

Por último, los biosurfactantes no formaron emulsiones de aceite en agua estables a las concentraciones y condiciones de preparación empleadas en comparación con los controles. Sólo los biosurfactantes de *L. casei* lograron producir espumas.

## PERSPECTIVAS

Para dar continuación a los hallazgos de este trabajo, se sugiere proceder con la optimización de las condiciones de fermentación para incrementar el rendimiento, la optimización del proceso de purificación y la identificación de las estructuras empleando las mismas técnicas espectroscópicas utilizadas complementándolas con técnicas como la hidrólisis con proteasas y lipasas, SDS-PAGE y análisis químicos para la determinación de fracciones de carbohidratos.

## REFERENCIAS

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A. 2008. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 289-303.
- Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J. (Eds.) 2011. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. New York: Springer.
- Alonso, S. y Martin, P.J. 2016. Impact on foaming on surfactin production by *Bacillus subtilis*: Implications on the development of integrated in situ foam fractionation removal systems. *Biochemical Engineering Journal*, 100, 125-133.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488-494.
- Banat, I.M., Thavasi, R. (Eds.) 2019. Downstream Processing of Microbial Biosurfactants. En: *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Bezza, F.A. y Chirwa, E.M.N. 2015. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 168-178.
- Brzozowski, B., Bednarski, W.O., Goi, P. 2011. The Adhesive Capability of Two *Lactobacillus* Strains and Physicochemical Properties of Their Synthesized Biosurfactants. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 177-186.
- Campos, J.M., Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M. 2013. Microbial surfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1097-1108.
- Christova, N. y Stoineva, I. (Eds) 2014. Trehalose Biosurfactants. En: *Biosurfactants: Research Trends and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Chtioui, O., Dimitrov, K., Gancel, F., Dhulster, P., Nikov, I. 2012. Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production. *Process Biochemistry*, 47(12), 2020-2024.
- Dasgupta, N. y Ranjan, S. 2018. *An Introduction to Food Grade Nanoemulsions*. Singapur: Springer.
- Elshafie, A.E., Joshi, S.J., Al-Wahaibi, Y.M., Al-Bemani, A.S., Al-Bahry, S.N., Al-Maqbali, D., Banat, I.M. 2015. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1324.

- Fakruddin, M. 2012. Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 3(124).
- Fanun, M. (Ed.) 2014. *The Role of Colloidal Systems in Environmental Protection*. Oxford: Elsevier.
- Flickinger, M.C. (Ed.) 2013. *Upstream Industrial Biotechnology*, Volumen 2. New Jersey: Wiley.
- Fratamico, P.M., Annous, B.A., Guenther, N.W. (Eds.) 2009. *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Cornwall: Elsevier.
- Golek, P., Bednarski, W., Brzozowski. 2009. The Obtaining and Properties of Biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology*, 59(1), 119-126.
- Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Texeira, J.A., Rodrigues, L. R. 2015. Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 90960-90968.
- Harrison, J.A. (Ed.) 2017. *Food Safety for Farmers Markets: A Guide to Enhancing Safety of Local Foods*. Cham: Springer Nature.
- Hee-Sik, K., Byung-Dae, Y., Chang-Ho, L., Hyun-Hyo, S., Hee-Mock, O., Tohoru, K., Yoshiki, T. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 41-46.
- Helmy, Q., Kardena, E., Funamizu, N., Wisjnuprpto. 2011. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. *International Journal of Biotechnology*, 12, 66 - 86.
- Heryani, H. y Putra, M.D. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49-54.
- Horowitz, S., Gilbert, J.N. & Griffin, W.M. 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, 6(4), 243-248.
- Jiménez-Islas, D., Medina, S., Rodríguez, J. 2010. Biosurfactant properties, applications and production. A review. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Joshi, S., Bharucha C., Desai, A. J. 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, 99(11), 4603-4608.

- Kachholz, T. y Schlingmann, M. 1987. Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. En: N. Kosaric, W. L. Carns, N. C. C. Gray (Eds.), *Biosurfactants and biotechnology* (183-210). New York: Marcel Dekker.
- Kalia, V.C. y Kumar P. (Eds.) 2017. *Microbial Applications Vol. 1: Bioremediation and Bioenergy*. New York: Springer-Verlag.
- Khattari, Z., Al-Abdullah, T., Maghrabi, M., Khasim, S., Roy, A., Alfasfous, I. 2015. Interaction Study of Lipopeptide Biosurfactant viscosin with DPPC and Cholesterol by Langmuir Monolayer Technique. *Soft Materials*, 13(4), 254-262.
- Klich, M.A., Arthur, K.S., Lax, A.R., Bland, J.M. 1994. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia*, 127(2), 123-127.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 295-304.
- Kosaric, N. y Sukan, F.V. 2000. Biosurfactants. *Encyclopedia Microbiology*. 2<sup>da</sup> ed. 1, 618-635.
- Kosaric, N. y Vardar-Sukan, F. (Eds.) 2014. *Biosurfactants: Production and Utilization – Processes, Technologies, and Economics*. Boca Raton: CRC Press.
- Kralova, I. y Sjoblom, J. 2009. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.
- Li, Q. 2017. Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11(1), 27-36.
- Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Carvalho, A.M.X., Tótola, M.R., Borges, A.C. 2011. Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation*, 22(3), 585-592.
- Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X., Yu, Q. 2016. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Buletin*, 107(1), 46-51.
- Liu, J.F., Mbadanga, S.M., Yang, S.Z., Gu, J.D., Mu, B.Z. 2015. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Surfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4814-4837.
- Liu, X-Y., Yang, S-Z., Mu, B-Z. 2009. Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochemistry*, 44(10), 1144-1151.

- López Santiago, R. F. 2017. *Preparación y comportamiento reológico de espumas obtenidas a partir de proteína de lactosuero, polisacáridos, surfactantes y sus mezclas*. Tesis para el título de Química de Alimentos. Ciudad de México. Facultad de Química, UNAM.
- Makkar, R.S. y Cameotra, S.S. 2002. Effect of various nutritional supplements on biosurfactant production by strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(1), 11-17.
- Mittal, K.L. y Jaiswal, R. 2015. *Particle Adhesion and Removal*, Salem: John Wiley & Sons. 621-622
- Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E. K. 2006. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*. 40(3), 533-540.
- Mohd, S. U. K. y Hamzah, A. 2016. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* UKMP-4M5. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20, 986-1000.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133 (2), 183-198.
- Nguyen, T.T. y Sabatini, D.A. 2011. Characterization and Emulsification Properties of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 1232-1244.
- Nitschke, M. y Costa, S.G.V.A.O. 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- Ortiz-Tafoya, M.C. y Tecante, A. 2018. Physicochemical characterization of sodium stearoyl lactylate (SSL), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) and  $\kappa$ -carrageenan. *Data in Brief*, 19, 642-650.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., y Cameotra, S. S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-54.
- Pathak, K.V. y Keharia, H. 2014. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *3 Biotech*, 4(1), 41–48.
- Pattanathu, K. S. M. Rahman y Gakpe, E. 2008. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants- Review. *Biotechnology*, 7(2), 360-370.
- Pereira, J.F., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A., Rodrigues, L. R. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery. *Fuel*, 111, 259-268.

- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., Wagner, F. 1991. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), 157-163.
- Portilla-Rivera, O., Torrado, A., Domínguez, J.M., Moldes, A. B., 2008. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8074-8080.
- Rodrigues, L., Moldes A., Teixeira J., Oliveira R. 2006. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28(2), 109-116.
- Rosen, M. J. 2004. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Roy, A. 2017. A Review on Biosurfactants: Properties, Types, and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8(1), 248-252.
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B.A. 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 127-144.
- Satpute, S.K., Bhawsar B.D., Dhakephalkar P.K., Chopade B.A. 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, 37(3), 243-250.
- Satpute, S.K., Kulkarni, G.R., Bankupar, A. G., Banat, I. M., Patil, R.H., Cameotra, S. S. 2016. Biosurfactants from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 1-19.
- Shaligram, N.S. y Singhal, R.S. 2010. Surfactin - A review on biosynthesis, fermentation, Purification and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 119-134.
- Sharma, D. 2016. *Biosurfactants in Food*. New York: Springer.
- Sharma, D. y Saharan, B.S. 2014. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal of Microbiology*, 2014.
- Sharma D., Saharan B.S., Kapil S. 2016. Substrates and Production of Biosurfactants. En: *Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. Springer Briefs in Microbiology*. Cham: Springer.
- Shekhar, S. y Sundaramanickam, A. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522-1554.
- Soberón-Chávez, G. (Ed.) 2011. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Nueva York: Springer-Verlag.

- Somasundaran, P., Patra, P., Dominic, J.A., Nambi, I. 2014. Microbially Derived Biosurfactants: Sources, Design and Structure-Property Relationships. En: Surfactant Science and Technology: Retrospects and Prospects. Boca Raton: CRC Press.
- Solomons, T. W. G. 1995. *Fundamentos de Química Orgánica*. México: Limusa.
- Tang, J-S., Gao, H., Hong, K., Yu, Y., Jiang, M-M., Lin, H-P., Ye, W-C., Yao, X-S. 2007. Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data of nine surfactin isomers. *Magnetic Resonance of Chemistry*, 45, 792-796.
- Velraeds, M.M.C., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. 1996. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 8(1-2), 51-61.
- Vijayakumar S. y Saravanan V. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10, 181-192.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugerard, P., Losick, R., Kolter, R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 157-168.
- Walstra, Peter. 2002. *Physical Chemistry of Foods*. Boca Raton: CRC Press.
- Wang, X. L. y Scott, D. A. (Eds.) 2005. *Molecular Mechanisms of Tobacco-induced Diseases*. New York: Nova Publishers.
- Willenbacher, J., Rau, J.-T., Rogalla, J., Syldatk, C., Hausmann, R. 2015. Foam-free production of surfactin via anaerobic fermentation of *Bacillus subtilis* DSM 10<sup>T</sup>. *AMB Express*, 5(21).
- Yoneda, T., Miyota, Y., Furuya, K. y Tsuzuki, T. 2006. Production process of surfactin. US patent 701196