

INTRODUCCIÓN:

Los biosurfactantes (BS) son tensoactivos ampliamente utilizados en diferentes áreas de interés industrial. Sin embargo, aún existen desventajas en su comercialización masiva asociadas a los elevados costos de producción/recuperación. El precio final de las formulaciones de BS está relacionado con la composición del medio de cultivo, pero específicamente, con la elección de la fuente de carbono. Para aumentar la competitividad en el mercado y disminuir costos, actualmente se ha optado por emplear desechos o sub-productos industriales, dentro de los que se destacan los residuos oleosos. Sorpresivamente, se ha reportado que el empleo de estos residuos hidrofóbicos solos o en combinación con sustratos hidrofílicos, incrementan la producción microbiana de BS resultando en rendimientos superiores a los encontrados para fuentes de carbono tradicionales.

OBJETIVO:

Estudiar la producción de BS empleando *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* como microorganismo productor, utilizando un residuo hidrofóbico (aceite de fritura residual), sustratos hidrofílicos convencionales y una mezcla de ambos en los medios de cultivo.

METODOLOGÍA:



1. Glicerol (Gli)
2. Aceite de fritura residual (AFR)
3. Mezcla glicerol y AFR 1:1 (Gli/AFR)



Fuentes de carbono (1 g/L final)

1. Sacarosa (Sac)
2. Almidón (Alm)
3. Fructosa (Fru)
4. Glucosa (Glu)

Incubación por 72 h y monitoreo del crecimiento y producción de BS cada 24 h:

- ✓ DO 600 nm
- ✓ Índice de emulsificación con kerosene (IEK)
- ✓ Diámetros de gotas por prueba del Parafilm M (PPM)
- ✓ Disminución relativa (DR %) por el método colorimétrico con azul de Bromotimol (BTB)
- ✓ Tensión Superficial (TS) por el método de la gota colgante

Extracción y purificación:

- ✓ extracto crudo de BS
- ✓ Cuantificación por medidas de peso seco
- ✓ IEK y estabilidad a las 24 h (ES)
- ✓ TS
- ✓ Diámetros de gotas (PPM)
- ✓ HPLC

Selección de la fuente de carbono que incremente la producción de BS mediante un análisis estadístico (comparación de múltiples muestras empleando un Test de Fisher)

Extracto de BS seleccionado:

Caracterización química:

- ✓ FT-IR
- ✓ LC-ESI-MS

Propiedades fisicoquímicas:

- ✓ Dilución micelar crítica (CMD)
- ✓ Estabilidad frente a diferentes T, pH y fuerza iónica sobre el IEK
- ✓ Actividad emulsionante frente a distintos solventes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN DE DISTINTAS FUENTES DE CARBONO Y SELECCIÓN DEL MEDIO

Fuente de carbono	Masa de BS* (mg)	[Extracto Crudo] (mg/mL)	Título de BS** (g/L)	Diámetros (PPM) (mm)	TS (mN/m)	IEK (%)	IEK ₂₄ (%)	ES (%)
Gli	54,60 (± 3,63)	15,83 (± 0,73)	0,546 (± 0,036)	4,41 (± 0,25)	47,87 (± 0,89)	68,33 (± 2,89)	63,33 (± 2,89)	92,68 (± 0,32)
Sac	23,33 (± 1,89)	4,43 (± 0,38)	0,233 (± 0,019)	4,37 (± 0,28)	49,45 (± 0,66)	66,67 (± 2,89)	63,33 (± 2,89)	95,06 (± 4,29)
Alm	12,67 (± 1,98)	2,53 (± 0,39)	0,133 (± 0,019)	4,05 (± 0,19)	51,29 (± 1,87)	65,00 (± 0,00)	61,67 (± 2,89)	94,87 (± 4,44)
Fru	29,82 (± 2,04)	5,67 (± 0,41)	0,290 (± 0,024)	4,15 (± 0,06)	50,26 (± 0,51)	64,17 (± 1,44)	64,17 (± 1,44)	100 (± 0,00)
Glu	39,56 (± 2,18)	7,52 (± 0,44)	0,396 (± 0,022)	4,19 (± 0,11)	48,41 (± 1,83)	65,00 (± 0,00)	63,33 (± 2,89)	97,44 (± 4,44)
AFR	127,67 (± 2,67)	16,77 (± 0,53)	1,276 (± 0,027)	4,49 (± 0,14)	43,23 (± 1,46)	69,17 (± 5,20)	62,52 (± 1,11)	90,66 (± 5,59)
Gli/AFR	172,95 (± 3,29)	23,87 (± 0,66)	1,730 (± 0,033)	4,51 (± 0,18)	40,07 (± 0,43)	75,83 (± 3,82)	63,33 (± 2,89)	83,64 (± 5,25)

Tabla 1: Evaluación de extractos crudos de BS. Los datos corresponden al promedio de triplicados ± DE. * La masa BS representa el total obtenido a partir de 100 mL de medio de cultivo después de la extracción. ** El título de producción de BS se calcula como la cantidad de BS que se obtendría empleando 1 L de medio.

CURVAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BS

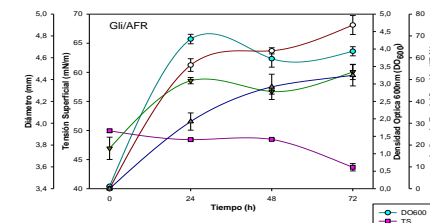


Figura 1: Seguimiento del crecimiento y producción de BS durante las 72 h de incubación para el medio Gli/AFR.

Luego de realizar el test estadístico de comparación de múltiples muestras, se seleccionó al medio Gli/AFR (relación 1:1) como aquel que logra incrementar la producción de BS.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

El espectro de FT-IR dilucidó que los grupos funcionales detectados en la muestra analizada coinciden con una naturaleza lipopeptídica. Esto fue confirmado por el ensayo de LC-ESI-MS:

Compuesto	(SIM) m/z	Especie
Mono-ramnolípido C10-C12	527,0	-----
Syringomicina E	613,0	[M+2H] ²⁺
Di-Ramnolípido C10-C12	673,3	-----
Syringopeptina 22-PhvB	1079,0	[M+2H] ²⁺
Syringomicina E	1201,0	[M+H] ⁺
Artrofactina B	1390,8	[M+Na] ⁺
Artrofactina C	1402,8	[M+Na] ⁺
Artrofactina D	1404,8	[M+Na] ⁺
Syringopeptina 22-PhvB	2157,0	[M+H] ⁺

Tabla 2: Análisis LC-ESI-MS de la muestra de BS obtenida con el medio Gli/AFR. Las especies que se indican significa que se detectó un compuesto compatible con los nombrados en la primera columna.

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

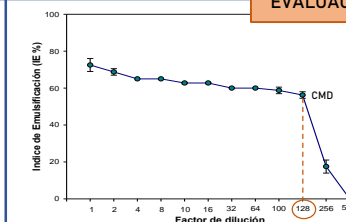


Figura 2: Determinación de CMD empleando kerosene, por duplicado ± DE.

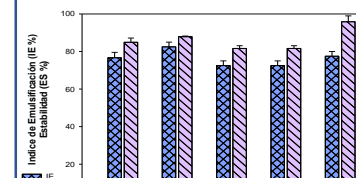


Figura 3: IE y ES frente a kerosene (K), tolueno (T), hexano (Hex), heptano (Hep) y aceite de motor (AM), por duplicado ± DE.

Muestra de BS	Temperatura (°C)			
	20	40	60	80
Ref.*	77,50 ± 2,50	72,50 ± 2,50	67,50 ± 2,50	63,33 ± 2,87
NaCl 5%	72,50 ± 2,50	72,50 ± 2,50	69,17 ± 1,44	63,33 ± 2,87
NaCl 10%	72,50 ± 2,50	70,83 ± 1,44	68,33 ± 1,44	59,17 ± 1,44
NaCl 15%	67,50 ± 2,50	65,83 ± 1,44	62,50 ± 2,50	59,16 ± 1,44
NaCl 20%	65,83 ± 1,44	65,00 ± 2,50	60,83 ± 1,44	58,75 ± 2,50
pH 5	67,50 ± 2,50	66,67 ± 1,44	66,67 ± 1,44	61,67 ± 1,44
pH 9	77,50 ± 2,50	76,67 ± 1,44	75,86 ± 1,44	64,17 ± 1,44
pH 12	76,67 ± 1,44	76,67 ± 1,44	75,83 ± 1,44	66,67 ± 1,44

Tabla 3: Ensayos de estabilidad frente a diferentes condiciones experimentales sobre el IEK. Los datos representan la media de duplicados ± DE. *Medio de referencia: pH 7,2.

CONCLUSIÓN: Estos hallazgos indican la posibilidad de utilizar un residuo hidrofóbico altamente contaminante en el diseño de medios de cultivos para la producción de BS empleando a *P. syringae* pv. *tabaci*. Adicionalmente, los resultados muestran la versatilidad de la mezcla obtenida dado sus atractivas y prometedoras propiedades fisicoquímicas.