

**PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE RESIDUOS  
AGROINDUSTRIALES UTILIZANDO *BACILLUS SUBTILIS***

**DAVID CABALLERO TORRES  
MARIA ANGELICA CASTILLO CASTAÑEDA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

**PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE RESIDUOS  
AGROINDUSTRIALES UTILIZANDO *BACILLUS SUBTILIS***

**DAVID CABALLERO TORRES  
MARIA ANGELICA CASTILLO CASTAÑEDA**

**Trabajo de Grado para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**DIRECTOR**

**Viviana Sánchez Torres  
Ingeniera Química, PhD.**

**Julio Andrés Pedraza Avella  
Ingeniero Químico, Dr.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

*Dedicado con todo mi amor a mis padres, Celmira y Miguel por su apoyo incondicional, esfuerzo, comprensión, amor y sabiduría en todos estos años de aprendizaje. Por entenderme, guiarme en cada paso de la vida y ayudarme a continuar en mis momentos críticos.*

*A mis hermanos, Jorge y Lucho por sus consejos y sus ánimos constantes.*

*A Dios, por darme el regalo más preciado: La vida. Por hacerme fuerte espiritualmente para evitar derrumbarme ante cualquier dificultad y sobre todo por ayudarme a ser mejor cada día.*

*A Carlos, por su paciencia, dedicación, entendimiento, por darme fortaleza en los momentos difíciles, por regalarme alegrías y también tristezas. Por compartir conmigo un pedacito de su vida...*

*A Sthefy, por todos estos años de amistad, por sus consejos necesarios, por ser tan especial conmigo.*

*Finalmente, a mi familia, compañeros y amigos que aportaron un granito de arena para que todo esto fuera posible.*

*María Angélica Castillo*

*A mi familia, especialmente a mis padres Nancy y Hernán, mis abuelos Elsa y Esteban y mi hermano Marcos, por su apoyo y compañía en todos los momentos importantes de mi vida.*

*A mis amigos de la universidad: Silvia, Elo, Stephie, amigo William, Erika, Orlando, Freddy, Saily, Richard, Lina, Ximena, Natha, gracias a ellos disfrute mucho esta etapa y ha sido de las mejores experiencias que he podido vivir hasta ahora.*

*David Caballero*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Ingeniería Química.

A la Facultad de Ingenierías Físicoquímicas por su apoyo con la auxilia tura de investigación asignada para el desarrollo del proyecto.

A nuestros maestros por ser el pilar de nuestra formación no solo ingenieril, sino también personal.

A nuestros directores Viviana Sánchez Torres y Julio Pedraza Avella que con sus sugerencias fueron una guía que permitió que este trabajo fuese posible.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular y al Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente, por permitimos desarrollar las pruebas experimentales en sus instalaciones.

A Oriana Serna por su ayuda y dirección durante el desarrollo del proceso investigativo.

A Nathalia Bedoya por su orientación y asesoría.

A Daniel Osorio por su paciencia, interés, dedicación y ayuda.

A nuestros compañeros de laboratorio por las buenas experiencias y brindarnos ánimo en los momentos difíciles.

A todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a realizar este trabajo de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	19
1.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	19
1.1.1 Extracto de piña	19
1.1.2 Lactosuero	20
1.1.3 Mucílago de café	20
1.2 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	21
1.3 SURFACTANTES	21
1.3.1 Biosurfactantes producidos por <i>B. subtilis</i>	22
1.4 CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES	23
1.4.1 Prueba de la gota colapsada	23
1.4.2 Barrido de salinidad	23

2. METODOLOGÍA	25
2.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	25
2.1.1 Caracterización de los sustratos	26
2.1.2 Determinación de la concentración de ART en los medios de cultivo	26
2.1.3 Adición de una fuente de nitrógeno	26
2.1.4 Crecimiento celular de <i>B. subtilis</i>	27
2.1.5 Prueba de la gota colapsada.	27
2.2 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES	28
2.3 EXTRACCIÓN DE BIOSURFACTANTES	29
2.4 CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS	29
2.4.1 Barrido de salinidad	29
3. RESULTADOS	30
3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	30
3.1.1 Caracterización de los sustratos	30

3.1.2 Determinación de la concentración óptima de ART en los medios de cultivo	30
3.1.3 Fuente de nitrógeno	30
3.1.4 Curvas de crecimiento de <i>B. subtilis</i>	31
3.1.5 Gota colapsada	33
3.2 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE	34
3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	35
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSURFACTANTE	36
4. CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
BIBLIOGRAFIA	46
ANEXOS	52

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura de la surfactina	22
<b>Figura 2.</b> Comportamiento de sistemas agua-surfactante-aceite.	24
<b>Figura 3.</b> Diagrama metodológico de la producción de biosurfactantes utilizando lactosuero, mucílago de café y extracto de piña como sustrato a partir de <i>B. subtilis</i> .	25
<b>Figura 4.</b> Diagrama de cambio de la prueba de la gota colapsada.	28
<b>Figura 5.</b> Curvas de crecimiento del medio LB, mucílago de café, extracto de piña y lactosuero por periodo de 78 horas.	31
<b>Figura 6.</b> Curva de crecimiento de mucílago de café.	32
<b>Figura 7.</b> Gota colapsada luego de un tiempo de 10 minutos.	33
<b>Figura 8.</b> Datos obtenidos en la prueba de la gota de aceite colapsada para un periodo de tiempo de 0 y 10 minutos y las horas 60, 66, 72 y 78.	34
<b>Figura 9.</b> Formación de emulsiones en concentraciones de sal del 1,5%, 3%, 4,5% y 6% respectivamente luego de un periodo de 10 días.	36
<b>Figura 10.</b> Curvas de barrido de salinidad para cada uno de los surfactantes producidos a partir de los medios de cultivo escogidos.	37

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición físico-química de la piña en porcentaje.	19
<b>Tabla 2.</b> Composición físico-química media del lactosuero dulce.	20
<b>Tabla 3.</b> Composición físico-química del mucílago de café.	20
<b>Tabla 4.</b> Concentración de ART en lactosuero, extracto de piña y mucílago de café.	30
<b>Tabla 5.</b> Velocidades de crecimiento específico de los medios de cultivo implementados en la producción de biosurfactantes.	32
<b>Tabla 6.</b> Producción de biosurfactante sin purificar por litro de medio de cultivo.	35
<b>Tabla 7.</b> Concentración de biosurfactantes semipurificados a partir de residuos agroindustriales	36

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Preparación del reactivo DNS, curva de calibración de glucosa y estandarización de la cantidad de ART.	52
<b>Anexo B.</b> Comparaciones visuales del crecimiento bacteriano en diferentes diluciones de ART.	53
<b>Anexo C.</b> Adición de fuente externa de nitrógeno.	54
<b>Anexo D.</b> Prueba de Tukey y ANOVA de la prueba de la gota colapsada.	57
<b>Anexo E.</b> Rendimiento de la producción de biosurfactantes reportado en la literatura.	58
<b>Anexo F.</b> Datos reportados en la literatura de extracción de lipopéptidos utilizando cultivos alternativos.	52

## RESUMEN

**TITULO:** PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES UTILIZANDO *BACILLUS SUBTILIS*\*

**AUTORES:** David Caballero Torres\*\*, María Angélica Castillo Castañeda.

**PALABRAS CLAVES:** Biosurfactantes, *Bacillus subtilis*, residuos, suero de leche, extracto de piña, mucílago del café.

Los residuos orgánicos provenientes de productos agroindustriales presentan un impacto ambiental negativo al ser vertidos en las fuentes hídricas (en caso de ser líquidos) o en las basuras (para residuos sólidos). En esta investigación se desea evaluar el potencial para producir biosurfactantes de algunos residuos que se generan en grandes cantidades en Santander, como lo son: extracto de la piña, lactosuero dulce y mucílago de café, utilizándolos como medio de cultivo. Se utilizaron medios de cultivo con 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio, 10 g.L<sup>-1</sup> de azúcares reductores totales y pH de 7. Se inocularon por 72 horas a condiciones de 150 rpm y 30 °C. Se realizó una extracción y purificación de los biosurfactantes secretados en el medio de cultivo utilizando diclorometano con relación 2:1 en 3 etapas. El rendimiento de biosurfactante sin purificar por litro de cultivo fue de 3,75 g.L<sup>-1</sup> para mucílago de café, 2,23 g.L<sup>-1</sup> para extracto de piña, 5,20 g.L<sup>-1</sup> para medio LB y 6 g.L<sup>-1</sup> para lactosuero. La concentración de los biosurfactantes semipurificados fue de 4,07 mg.mL<sup>-1</sup> para el mucílago de café, 4,63 mg.mL<sup>-1</sup> para el extracto de piña, 3,37 mg.mL<sup>-1</sup> para el medio LB y 0,72 mg.mL<sup>-1</sup> para el lactosuero. En la prueba de barrido de salinidad el biosurfactante obtenido en medio de mucílago de café presentó mayor volumen emulsificado que el del lactosuero y el extracto de piña. Los medios de cultivo formulados a partir de los residuos agroindustriales escogidos e inoculados con *Bacillus subtilis* a las condiciones establecidas, presentaron actividad tensoactiva sugiriendo la presencia de biosurfactantes.

---

\* Proyecto de grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Dr. Julio Andrés Pedraza Avella.

## ABSTRACT

**TITLE:** BIOSURFACTANTS PRODUCTION FROM AGROINDUSTRIAL WASTE USING *BACILLUS SUBTILIS*\*

**AUTHORS:** David Caballero Torres\*\*, María Angélica Castillo Castañeda.

**KEYWORDS:** Biosurfactants, *Bacillus subtilis*, waste, whey, pineapple peel, coffee mucilage.

The organic wastes from agroindustrial products have a negative environmental impact when they are poured into water sources (in case of liquids) or garbage (solid waste). In this study we aimed to evaluate the potential to produce biosurfactants from some kind of wastes generated in large quantities in Santander such as: pineapple extract, sweet whey and coffee mucilage, using them as culture medium. Culture media were used with  $1\text{g.L}^{-1}$  of ammonium sulfate,  $10\text{g.L}^{-1}$  of ART and pH 7. They were inoculated for 72 hours at 150 rpm and  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  conditions. Final product was purified and characterized using dichloromethane at a 2:1 ratio in 3 stages. The crude biosurfactant yield per liter of culture was  $3.75\text{ g.L}^{-1}$  for coffee mucilage,  $2.23\text{ g.L}^{-1}$  for pineapple extract,  $5.20\text{ g.L}^{-1}$  LB medium and  $6\text{ g.L}^{-1}$  for whey. The concentration of semipurified biosurfactants was  $4.07\text{ mg.mL}^{-1}$  for coffee mucilage,  $4.63\text{ mg.mL}^{-1}$  for pineapple extract,  $3.37\text{ mg.mL}^{-1}$  for LB medium and  $0.72\text{ mg.mL}^{-1}$  for whey. In the sweep test salinity the biosurfactant obtained from coffee mucilage showed higher volume emulsified than the obtained from whey and pineapple extract. The culture media formulated from the selected agro-industrial wastes and inoculated with *Bacillus subtilis* at the established conditions, showed surfactant activity suggesting the presence of biosurfactants.

---

\* Bachelor thesis

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Dr. Julio Andrés Pedraza Avella.

## INTRODUCCIÓN

Los vertimientos de hidrocarburos en suelos como consecuencia de actividades industriales, derrames accidentales o mala disposición representan un problema grave de contaminación para las fuentes de agua subterránea [1]. Una de las técnicas utilizadas para descontaminar este tipo de derrames es la biorremediación *in situ* por medio de microorganismos capaces de degradar las sustancias allí presentes. Sin embargo, uno de los problemas que presentan es la poca accesibilidad en fase acuosa de los hidrocarburos, debido a que la mayoría son insolubles en agua y forman capas o agregados entre las superficies del suelo y estas sustancias [2].

Para la solución a este problema es necesario agregar moléculas tensoactivas las cuales son capaces de modificar la tensión interfacial reduciendo la energía libre del sistema, haciendo más estables las mezclas de sustancias que se componen de dos fases para promover la formación de emulsiones [3]. La producción de surfactantes a nivel mundial se estimó en el año 2007 alrededor de 10 millones de ton/año [4]. Debido a que la mayoría de surfactantes utilizados en la industria proceden de origen petroquímico, éstos no son renovables y su posterior disposición resulta en una afectación medioambiental. Por lo tanto existe un interés en la producción de surfactantes biodegradables que además representen un recurso renovable [5].

Los biosurfactantes producidos por microorganismos son una alternativa a los surfactantes convencionales debido a que presentan múltiples ventajas frente a ellos como: notable actividad superficial comparada con los sintéticos; tolerancia al pH, concentración de sales y temperatura; biodegradabilidad y baja toxicidad [6]. Dentro de los biosurfactantes más potentes se encuentran lipopéptidos como la surfactina producida por la bacteria *Bacillus subtilis* [7]. Este lipopéptido aniónico tiene la capacidad de reducir la tensión superficial del agua de 72 mN.m<sup>-1</sup> a 27

mN.m<sup>-1</sup> en concentraciones de aproximadamente 10 μmol.L<sup>-1</sup> [8]. Sin embargo el costo elevado de los medios de cultivo hace que sea una necesidad buscar medios alternativos que permitan reducir los costos de producción [9] como por ejemplo los residuos procedentes de actividades agroindustriales.

Teniendo en cuenta que Colombia es un país dedicado en su mayoría al sector agroindustrial, se presenta la oportunidad de conseguir fácilmente subproductos originados en el desarrollo de estas actividades. En el presente trabajo se buscó producir biosurfactantes a partir de residuos de cáscara de piña, lactosuero, y mucílago de café utilizando *B. subtilis*. Para caracterizar la actividad de los surfactantes se estudió el comportamiento de las fases agua-aceite-surfactante al variar la concentración de sales.

# 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

## 1.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

La agroindustria es una actividad económica que combina procesos agrícolas con industriales para generar materias primas semi-elaboradas destinadas al mercado, además de comercializar productos provenientes del campo [10]. Los residuos sólidos o líquidos provenientes de la agroindustria, presentan materia orgánica que puede ser utilizada como sustrato para procesos biológicos que permitan obtener productos de valor agregado.

**1.1.1 Extracto de piña.** Santander cuenta con 5.600 hectáreas donde se cultiva piña, en los municipios de Girón, Rionegro y Lebrija [11]. En el 2010 se reportó un rendimiento de 50.285 kg por hectárea cultivada con piña en Santander [12]. La composición media de los residuos de piña, extracto y corazón se presentan en la Tabla 1. Teniendo en cuenta que el extracto de la piña es rico en vitaminas y azúcares [13] se desea utilizar como fuente de carbono para la producción de surfactina con la especie *B. subtilis*.

**Tabla 1.** Composición físico-química de la piña en porcentaje.

Parámetro	Residuo de piña
Humedad (%)	91,35
Cenizas (mg/100g)	0,04
Ácido ascórbico (mg/100g)	26,5
Azúcares reductores (%)	8,2
Azúcares no reductores (%)	8,8
Fibra cruda (g/100g-fw)	0,6
Proteína (mg/100g)	10

Fuente: Hemalatha et.al (2013) [14].

**1.1.2 Lactosuero.** El lactosuero es un subproducto originado por la coagulación de la leche, ya sea por vía ácida o enzimática, donde la primera produce lactosuero ácido y la segunda lactosuero dulce. En la Tabla 2 se presenta la composición fisicoquímica del lactosuero dulce, el cual se usará debido a alto su contenido nutricional, proveniente de la coagulación enzimática de la caseína [15].

**Tabla 2.** Composición físico-química del lactosuero dulce.

<b>Propiedad</b>	<b>Lactosuero dulce</b>
pH	6,4-6,6
Sólidos Totales (%)	7
Ácido Láctico [g.L <sup>-1</sup> ]	0,37
Proteínas (%)	0,86
Cenizas (%)	0,587
Grasa (%)	0,55
Lactosa (%)	4,74

Fuente: Bon Rosas (1990) [16].

**1.1.3 Mucílago de café.** Para la industria del café, solo el 9.5% del fruto fresco se utiliza para el consumo humano y el 90.5% restante queda como residuo. El mucílago de café corresponde a una fibra soluble ubicada entre el mesocarpio y el endocarpio del grano de café, la composición del mucílago de café se presenta en la Tabla 3 [17]. Debido a que el mucílago es rico en nutrientes, los vertimientos de este residuo al suelo o fuentes hídricas provocan una sobrecarga de materia orgánica, afectando el medio ambiente.

**Tabla 3.** Composición físico-química del mucílago de café.

<b>Porcentaje de Composición en base seca %</b>	
Azúcares Totales	45,8
Azúcares reductores	30
Azúcares no reductores	20
Celulosa y cenizas	17

Fuente: Bressani (1987) [18].

## 1.2 *BACILLUS SUBTILIS*

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva [19] con la capacidad para formar endosporas que le ayudan a sobrevivir a ambientes hostiles [20]. Se considera una bacteria aerobia facultativa [21], se encuentra principalmente en el suelo y se conoce que hace parte de la microbiota intestinal de los seres humanos [22]. Debido a su versatilidad para ser manipulada genéticamente, la *B. subtilis* se ha convertido en un microorganismo ampliamente utilizado la para producción de metabolitos secundarios [23]. El crecimiento de esta bacteria se lleva a cabo en un rango de temperaturas de 5 °C-55 °C, presentando valores óptimos de 28 °C-30 °C. En cuanto al pH el rango activo de crecimiento es 5,5-8,5 [24].

## 1.3 SURFACTANTES

Un surfactante es una sustancia que al presentarse en baja concentración en un sistema tiene la capacidad de adsorberse sobre las superficies o interfases del sistema [3]. En el caso de las interfases reduce la energía libre del sistema que es la mínima cantidad de trabajo requerida para formar una interfase. Los surfactantes están formados por una cabeza polar y una cola apolar la cual generalmente es un ácido graso [25].

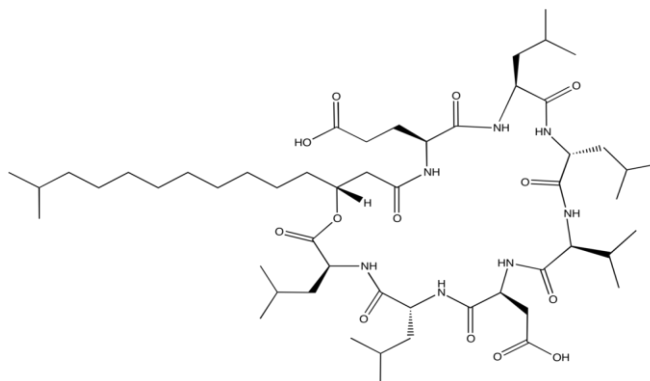
Los surfactantes se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la carga de su fracción polar [26]:

- **Catiónico:** presentan una carga positiva.
- **Aniónico:** presentan una carga negativa.
- **Anfótero:** contienen carga negativa y positiva.
- **No iónico:** no posee cargas.

Los surfactantes tienen aplicaciones en la industria de petróleo, de cosméticos, de productos de higiene y de limpieza [10] siendo este último el sector que utiliza la mayor parte de los surfactantes producidos como materia prima para la fabricación de detergentes de uso doméstico [5]. La mayoría de los surfactantes disponibles son sintetizados a partir de derivados del petróleo [7].

**1.3.1 Biosurfactantes producidos por *B. subtilis*.** En 1968 se descubrió la existencia de un nuevo compuesto biológicamente activo producido por *B. subtilis*, el cual fue denominado surfactina, debido a su alta actividad superficial y emulsificante [27]. La molécula es un lipopéptido compuesto por un ciclo de 7 aminoácidos y ácido graso  $\beta$ -hidroxiácido con una longitud de cadena que varía entre los 12 a 16 átomos de carbono [28]. Tanto el tipo de aminoácidos presentes en el ciclo como la longitud de la cadena del ácido graso dependen de la cepa utilizada, de las condiciones de cultivo y la naturaleza del medio [29]. En la Figura 1 se presenta la estructura de la surfactina.

**Figura 1.** Estructura de la surfactina.



Fuente: Autores usando programa Jmol.

Las interacciones que puede realizar con los componentes fosfolipídicos de las membranas celulares le confieren a la surfactina propiedades bactericidas, fungicidas, antivirales, antitumorales, inmunomoduladoras, así como servir de vehículo para la administración de medicamentos por vía pulmonar [30]. En

cuanto a su estabilidad frente a diferentes condiciones como temperatura, pH y concentración de sales; las cuales afectan a la mayoría de surfactantes, la forma cíclica de la surfactina y su composición mixta de lípidos y polos proteicos la convierten en una sustancia con una estabilidad destacable [31]. No obstante se han reportado otros lipopéptidos de acción surfactante como la Iturina A y la fengicina, con propiedades similares a la surfactina los cuales también son producidos por *B. subtilis* [32].

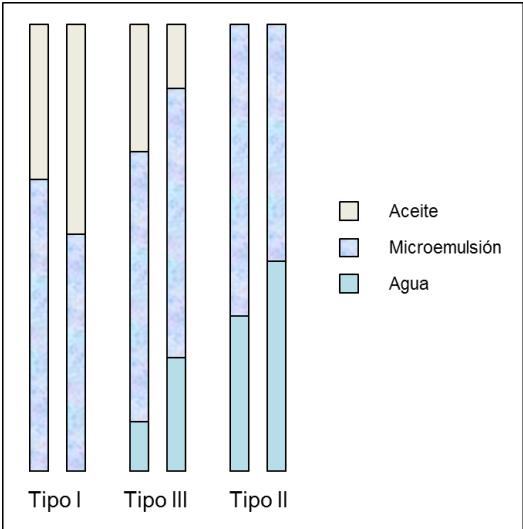
## **1.4 CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES**

**1.4.1 Prueba de la gota colapsada.** La prueba de la gota colapsada es un método cualitativo que se utiliza para determinar la acción surfactante de una sustancia. Una gota de un compuesto apolar se agrega a una superficie sólida sobre la cual se deposita una gota de fase acuosa. Si la fase acuosa no contiene surfactantes repelerá la fase polar y se formarán gotas estables. Si al contrario, el líquido contiene surfactante, la gota se dispersará hasta colapsar debido a la disminución de la tensión interfacial entre el líquido de la gota y la parte hidrofóbica [33].

**1.4.2 Barrido de salinidad.** Cuando a una mezcla agua-aceite se adiciona una sustancia tenso activa, a menudo se forman sistemas llamados micelas que dan origen a microemulsiones las cuales son sistemas isotrópicos termodinámicamente estables [34]. La formulación de este tipo de sistemas requiere establecer parámetros de composición, como la proporción en la que se adicionan los componentes al sistema, y fisicoquímicos como temperatura y presión en el caso de las físicas y la salinidad en fase acuosa, número de carbonos del aceite, longitud de la cola apolar del surfactante y presencia de co-surfactantes en el caso de las variables químicas [35].

Hay tres comportamientos que pueden presentar los sistemas agua-surfactante-aceite; se dice que exhibe un comportamiento Tipo I, cuando el surfactante posee mayores interacciones con la fase acuosa, si por el contrario se presenta mayor afinidad del surfactante con la fase apolar se dice que es de Tipo II, y si se presentan interacciones de carácter similar tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica se habla de un comportamiento Tipo III [36]. Los tipos de comportamiento de dichos sistemas se presentan en la Figura 2.

**Figura 2.** Comportamiento de sistemas agua-surfactante-aceite.

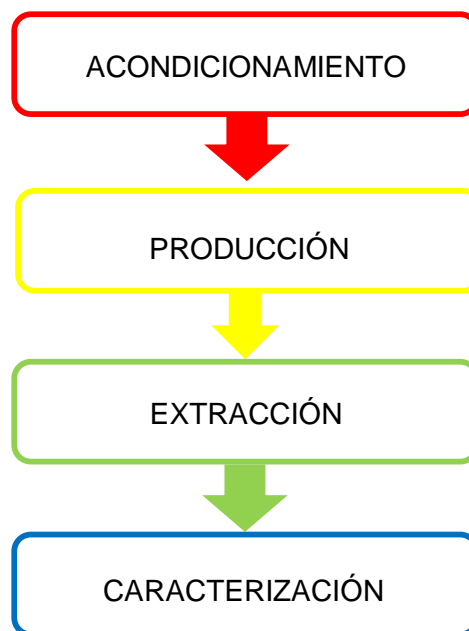


Fuente: Vidal Prada (2013) [35].

## 2. METODOLOGÍA

La Figura 3 ilustra el proceso global de la producción de biosurfactantes utilizando residuos agroindustriales a partir de *B. subtilis*.

**Figura 3.** Diagrama metodológico de la producción de biosurfactantes utilizando lactosuero, mucílago de café y extracto de piña como sustrato a partir de *B. subtilis*.



### 2.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Como sustrato se utilizó extracto de piña, mucílago de café y lactosuero. El extracto de piña se obtuvo mediante una infusión de 500 g de cáscara de piña y 3 litros de agua destilada por 150 minutos a 97 °C. El mucílago de café y el lactosuero se utilizaron sin ningún procesamiento adicional. Se removieron mediante filtración las impurezas presentes en los sustratos utilizando un tamiz de apertura nominal de 150 µm. Los filtrados fueron almacenados a 4 °C. La bacteria

*Bacillus subtilis* utilizada en esta investigación fue donada de The Pennsylvania State University.

**2.1.1 Caracterización de los sustratos.** Se midió el pH inicial de cada uno de los sustratos utilizando el medidor de pH ORION 3 STAR BENCHTOP (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se determinó la concentración de azúcares reductores totales (ART) utilizando el método del DNS de Miller [37] y el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo scientific, Estados Unidos). Para realizar la curva de calibración se emplearon soluciones patrón de glucosa. La descripción detallada del método se encuentra en el Anexo A.

**2.1.2 Determinación de la concentración de ART en los medios de cultivo.** En cajas de Petri se prepararon medios sólidos (15% agar) de cada sustrato con concentraciones de ART de 5 g.L<sup>-1</sup>, 10 g.L<sup>-1</sup> y con los sustratos sin dilución. Se ajustó el pH de los medio de cultivo a 7 adicionando NaOH 3 M y se inocularon con *B. subtilis* por agotamiento utilizando un asa bacteriológica. Posteriormente se determinó por medio de inspección visual la concentración óptima para el crecimiento bacteriano.

**2.1.3 Adición de una fuente de nitrógeno.** Para determinar si la adición de una fuente adicional de nitrógeno favorece el crecimiento, se prepararon 3 tubos de ensayo con 3 mL de medio con cada uno de los sustratos utilizando la concentración óptima de ART (sección 3.1.2). Se inocularon dos tubos cada uno con una colonia de *B. subtilis*, uno sin fuente de nitrógeno externa y el otro agregando sulfato de amonio a una concentración de 1 g.L<sup>-1</sup> [38]. Los tubos se incubaron a 150 rpm, 30 °C y 72 horas. En cajas de Petri con medio Luria Bertani (LB)-agar se sembraron 20 µL de los cultivos con diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>. Las cajas se incubaron a 30 °C por 24 h y por inspección visual se determinaron las mejores condiciones de crecimiento.

**2.1.4 Crecimiento celular de *B. subtilis*.** Se realizaron cultivos de *B. subtilis* en 125 mL de medio de cultivo elaborado con cada uno de los residuos agroindustriales con las concentraciones de ART y nitrógeno externo seleccionadas en las etapas 3.1.2 y 3.1.3. El pH se ajustó a 7 porque es el que favorece el crecimiento de *B. subtilis*. Como control del crecimiento se escogió el medio LB, el cual es un medio reportado en la literatura favorable para el crecimiento de *B. subtilis*. Los cultivos se incubaron a 150 rpm y 30 °C. Se tomaron muestras del cultivo cada 6 horas durante 78 horas. Debido a la turbidez del medio a base de lactosuero, no se pudo medir la densidad óptica (DO). La cantidad de células de la muestra de lactosuero fue determinada por conteo de unidades formadoras de colonias UFC [39] con diluciones desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-4}$ , en cajas Petri con medio LB-agar después de 24 horas de incubación a 30 °C. Para los medios de extracto de piña, mucílago de café y LB se determinó la DO a 600 nm en el espectrofotómetro Lambda 25 UV/VIS (Perkin Elmer, Estados Unidos) y luego fueron convertidos a UFC utilizando como factor de conversión el número de UFC obtenidas al inocular 1  $\mu$ L de cultivo con dilución  $10^{-2}$  en cajas Petri con medio LB-agar, partiendo de una DO de 0.5 en cada uno de los medios analizados.

**2.1.5 Prueba de la gota colapsada.** De cada cultivo realizado en la etapa 3.1.4, se retiró 1 mL durante las horas 60, 66, 72 y 78. Se agregaron a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugaron en una centrífuga Model 6500 (KUBOTA, Japón) a 10000 g y 4°C por 15 minutos. Se forró una lámina de vidrio con papel milimetrado y parafilm donde se agregaron 2  $\mu$ L de aceite de motor y posteriormente 5  $\mu$ L de sobrenadante a la gota de aceite, se dejaron reposar por 10 minutos y se observó en un estereoscopio. La presencia de biosurfactantes en los medios inoculados hará que el área de la gota de aceite disminuya con el tiempo debido a la reducción de la tensión superficial del agua. Empleando el programa Image J (National Institutes of Health, USA) se midió y comparó por

medio de un ANOVA el cambio de área después de 10 minutos de agregar la gota de sobrenadante como lo indica la Figura 4.

**Figura 4.** Diagrama de cambio de la prueba de la gota colapsada.



## 2.2 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Se realizó un precultivo de *B. subtilis* en un erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio LB y se incubó por 24 horas a 30 °C. Se realizaron cultivos con 300 mL de los medios LB, extracto de piña, mucílago de café y lactosuero con una DO inicial de 0,1 y se incubaron en agitador orbital rotatorio a 30 °C y 150 rpm hasta alcanzar el mismo número de UFC por mL de la curva de crecimiento a las 72 horas [5]. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los cultivos fueron centrifugados a 10.000 g y 4 °C por 15 minutos. Se separó el sobrenadante de cada cultivo y su pH fue ajustado a 2 con HCl 3 M. Luego de 24 h en reposo, los sobrenadantes se centrifugaron con las mismas condiciones empleadas previamente. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue pesado y diluido en 30 mL de agua destilada con pH 7 [40]. Los resultados se expresaron como gramo de biosurfactante producido por litro de residuo utilizado [g.L<sup>-1</sup>].

### 2.3 EXTRACCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Las muestras fueron pasadas por filtros de 47  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para eliminar los residuos provenientes de la precipitación del biosurfactante. Se realizó una extracción líquido-líquido con 3 etapas y relación 2:1 con diclorometano: agua a temperatura ambiente. Se dejó reposar por una hora para la separación de las fases y se extrajo la fase orgánica encontrada en la parte inferior (debido a que el diclorometano es más denso que el agua). Se rotoevaporó a 40 °C para recuperar el solvente y el surfactante fue nuevamente pesado y diluido en 30 mL de agua destilada. El producto fue denominado como biosurfactante semipurificado [5]. Los resultados se tabularon como los miligramos de biosurfactante semipurificado producido por mililitro de agua [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ].

### 2.4 CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS

**2.4.1. Barrido de salinidad.** Se preparó una solución madre de NaCl al 25% p/p. Se fijó la concentración de los biosurfactantes a partir de medio LB, extracto de piña, mucílago, y lactosuero a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se utilizó una relación 1:1 entre la fase acuosa y la fase orgánica. Se utilizaron pipetas de 5 mL graduadas y selladas en la parte inferior donde se ajustó la concentración de sal a 1,5%, 3%, 4,5% y 6%. Las pipetas fueron tapadas en la parte superior e invertidas 4 veces su posición vertical diariamente durante 10 días [35]. El volumen de la emulsión formada fue medido a diario hasta encontrar la salinidad óptima la cual se presenta cuando el comportamiento del sistema agua-surfactante-aceite es tipo III.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

**3.1.1 Caracterización de los sustratos.** La Tabla 4 muestra los valores obtenidos de la cantidad de ART y el pH que contienen el lactosuero, el extracto de piña y el mucílago del café.

**Tabla 4.** Concentración de ART en lactosuero, extracto de piña y mucílago de café.

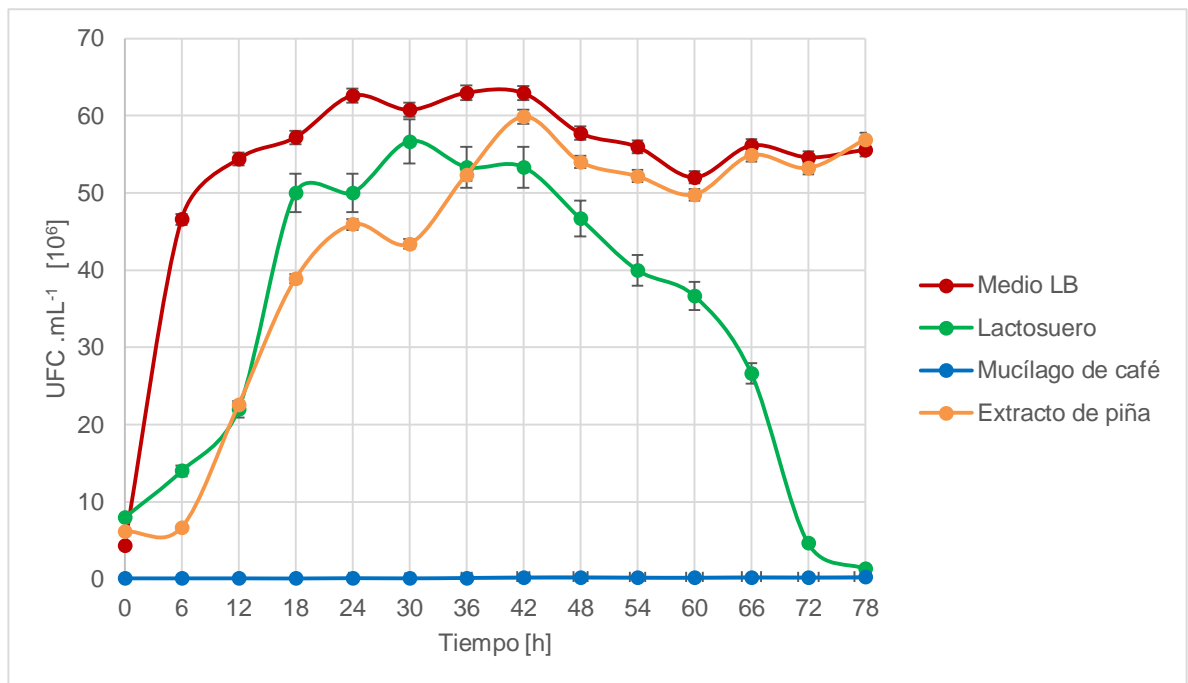
Medio de cultivo	Concentración ART [g.L <sup>-1</sup> ]	pH
Lactosuero	58,44	6,9
Extracto de piña	37,1	4,2
Mucílago de café	30,8	5,5

**3.1.2 Determinación de la concentración óptima de ART en los medios de cultivo.** La bacteria fue capaz de crecer en los 3 medios de cultivo a diferentes concentraciones utilizando 15% de agar como agente aglutinante **Anexo B**. En las cajas de Petri utilizando los medios sin dilución la bacteria no creció debido a inhibición por sustrato. Las colonias de *B. subtilis* presentaron menor tamaño en el medio con lactosuero.

**3.1.3 Fuente de nitrógeno.** Se evidenciaron menores cantidades de UFC en las muestras de los tubos que no contenían 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio demostrando que los medios de cultivo no tienen la cantidad de nitrógeno suficiente para el crecimiento de la bacteria. **Anexo C**. Debido a que la producción surfactante está relacionada con la cantidad de células presentes en el medio se utilizó 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio para la producción de biosurfactantes como lo reporta la literatura [41].

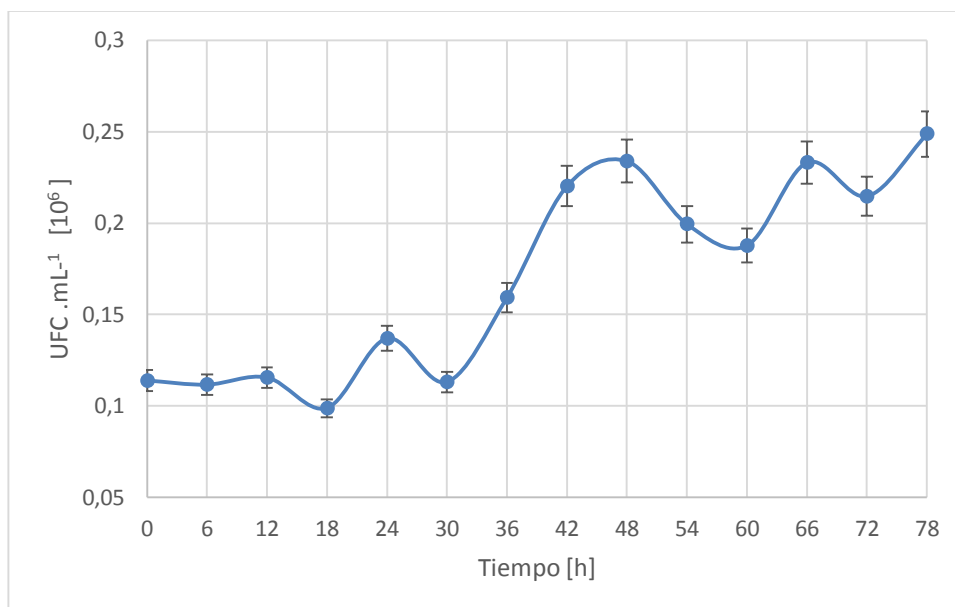
**3.1.4 Curvas de crecimiento de *B. subtilis*.** La Figura 5 muestra las curvas de crecimiento de extracto de piña, medio LB y lactosuero. El mayor crecimiento bacteriano se evidenció en el medio sintético LB el cual se encuentra en fase estacionaria a las 72 horas junto al extracto de piña mientras que el lactosuero presenta una fase de muerte a las 78 horas.

**Figura 5.** Curvas de crecimiento del medio LB, extracto de piña y lactosuero por periodo de 78 horas.



En la figura 6 se evidencia que la cantidad de células presentes en el mucílago del café es aproximadamente 100 veces menor a los demás medios de cultivo y alcanza una fase estacionaria a las 78 horas.

**Figura 6.** Curva de crecimiento de mucílago de café.



La tabla 5 muestra las velocidades de crecimiento específicas de los diferentes medios de cultivo, los cuales se encuentran dentro del orden de magnitud reportado en la literatura [42].

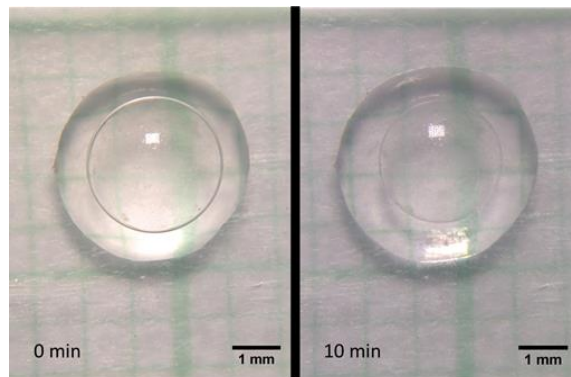
**Tabla 5.** Velocidades de crecimiento específico de los medios de cultivo implementados en la producción de biosurfactantes.

Medio de cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ [h <sup>-1</sup> ]	Coefficiente de correlación R <sup>2</sup>
Extracto de piña	0,146	0,97
Medio LB	0,395	1
Lactosuero	0,099	0,99
Mucílago de café	0,053	0,99

En la literatura se ha reportado que la fase estacionaria se encuentra entre las 60-80 horas [40], lo cual se cumple en los medios evaluados a excepción del lactosuero que en esa región ya se comienza a presentar la fase de muerte.

**3.1.5 Gota colapsada.** En la Figura 7 se ilustra el cambio de área producido por los biosurfactantes después de un periodo de tiempo de 10 minutos.

**Figura 7.** Gota colapsada luego de un tiempo de 10 minutos.



Los datos obtenidos en la prueba de la gota colapsada para un tiempo de 0 y 10 minutos y las horas 60, 66, 72, 78 se muestran en la Figura 8. En el anexo D también se encuentra la tabla resumen que se utilizó para el ANOVA. Se demostró que para cada medio no existe diferencia significativa entre la reducción de las áreas tomadas para mostrar la acción surfactante entre las 60-80 horas ( $p > 0,05$ ).

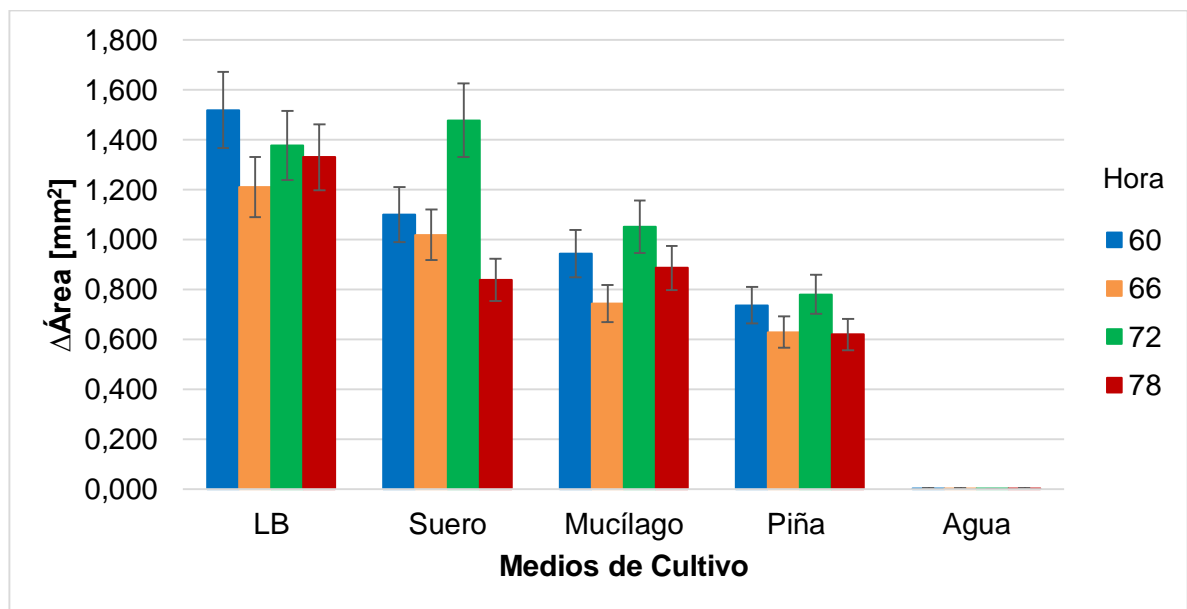
Se evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de la reducción de área entre los medios LB, mucílago de café, lactosuero y extracto de piña.

Se comprobó que para cada medio existe una diferencia significativa en la reducción del área entre el tiempo 0 y 10 minutos, ya que el ANOVA arroja un valor de  $4,93 \cdot 10^{-11}$ .

Según la prueba de Tukey (Anexo D), existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del cambio de área entre los medios de cultivo a partir de mucílago de café, extracto de piña y lactosuero respecto al agua utilizado como control. Sin embargo, no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre el medio LB-agua debido a que cambian de área proporcionalmente.

Por lo tanto los resultados sugieren que sí hay un cambio de área que indica acción surfactante pero no hay diferencia significativa entre las diferentes horas de incubación ensayados ni los diferentes medios de cultivo.

**Figura 8.** Datos obtenidos en la prueba de la gota de aceite colapsada para un periodo de tiempo de 0 y 10 minutos y las horas 60, 66, 72 y 78.



El método de la gota de aceite colapsada permite evidenciar la acción surfactante que se presenta en la interfaz aceite-sobrenadante de cada uno de los medios de cultivo, manteniéndose una producción aproximadamente constante alrededor de las 60-80 horas como lo indica la literatura [40].

### 3.2 PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE

La Tabla 6 presenta la producción de biosurfactante sin purificar por cada 300 mL de medio de cultivo utilizado con su respectiva desviación, la producción total en los 4 medios de cultivo implementados y el rendimiento en [g.L<sup>-1</sup>].

**Tabla 6.** Producción de biosurfactante sin purificar por litro de medio de cultivo.

<b>Residuo</b>	<b>Surfactante Producido [g]</b>	<b>Rendimiento [g.L<sup>-1</sup>]</b>
Mucílago	1,12 ± 0,08	3,75
Extracto de piña	0,67 ± 0,06	2,23
Medio LB	1,6 ± 0,1	5,2
Lactosuero	1,8 ± 0,2	6,0

Los datos de producción en g.L<sup>-1</sup> obtenidos en la investigación se encuentran dentro del orden de magnitud reportado en la producción de diferentes biosurfactantes sin purificar utilizando otros microorganismos a partir de medios de cultivo alternativos [43] que se pueden ver con detalle en el anexo E. Es importante mencionar que esta es la primera vez que se reportan rendimientos de producción de biosurfactantes sin purificar utilizando mucílago de café, lactosuero y extracto de piña a partir *B. subtilis*.

### **3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO**

La Tabla 7 indica la concentración de biosurfactante semipurificado obtenido utilizando mucílago de café, extracto de piña, medio LB y lactosuero expresados en [mg.mL<sup>-1</sup>]. La concentración de biosurfactante semipurificado obtenido a partir de lactosuero se encuentra dentro del orden de magnitud reportado en la extracción de lipopéptidos utilizando *B. subtilis* y medios de cultivos utilizando residuos industriales y alimenticios [44]. Respecto al mucilago de café, extracto de piña y medio LB, superan los valores reportados en la literatura. Los valores reportados en la literatura se ven con detalle en el anexo F.

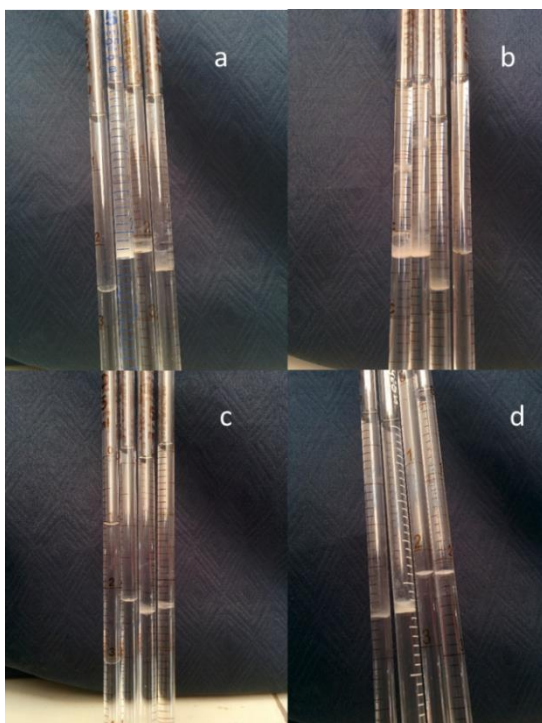
**Tabla 7.** Concentración de biosurfactantes semipurificados a partir de residuos agroindustriales.

Residuo	Biosurfactante semipurificado [mg.mL <sup>-1</sup> ]
Mucílago	4,073
Extracto de piña	4,633
Lactosuero	0,720
Medio LB	3,397

### 3.4 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSURFACTANTE

Los biosurfactantes producidos en esta investigación presentan un comportamiento tipo III en transición hacia el comportamiento tipo II lo cual sugiere una afinidad por la fase apolar a esas condiciones de concentración de sales. Las fases de emulsificación se pueden ver con detalle en el la Figura 8.

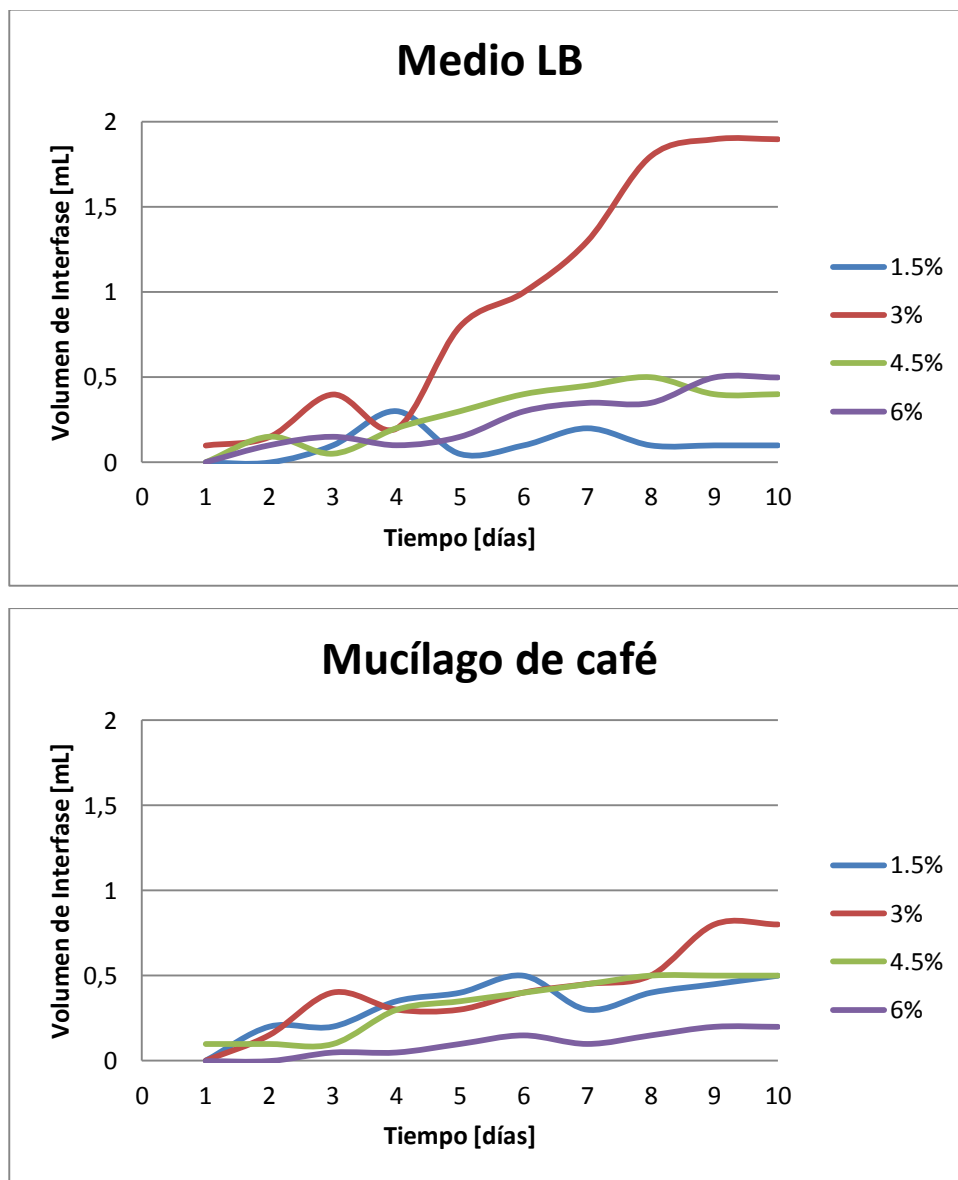
**Figura 9.** Formación de emulsiones en concentraciones de sal del 1,5%, 3%, 4,5% y 6% respectivamente luego de un periodo de 10 días.

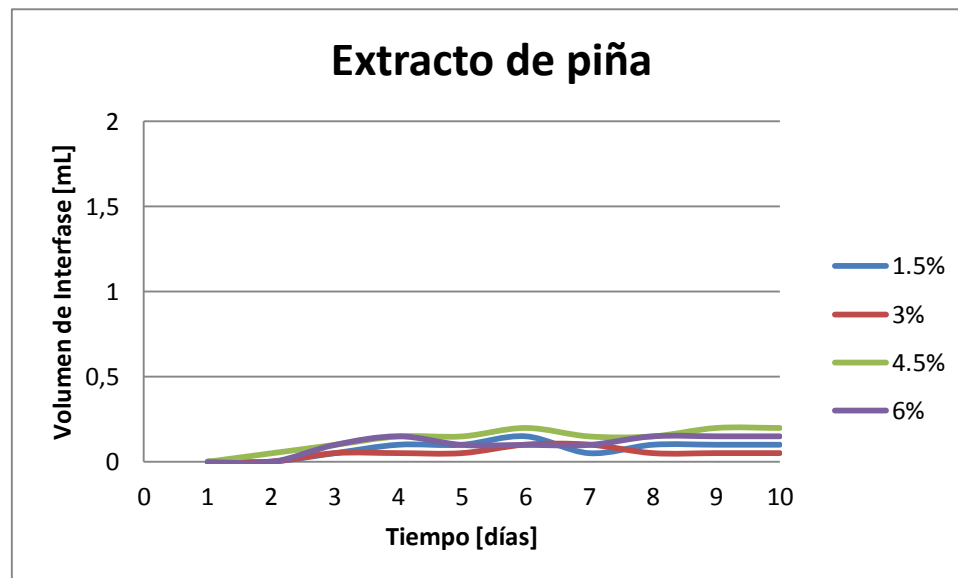
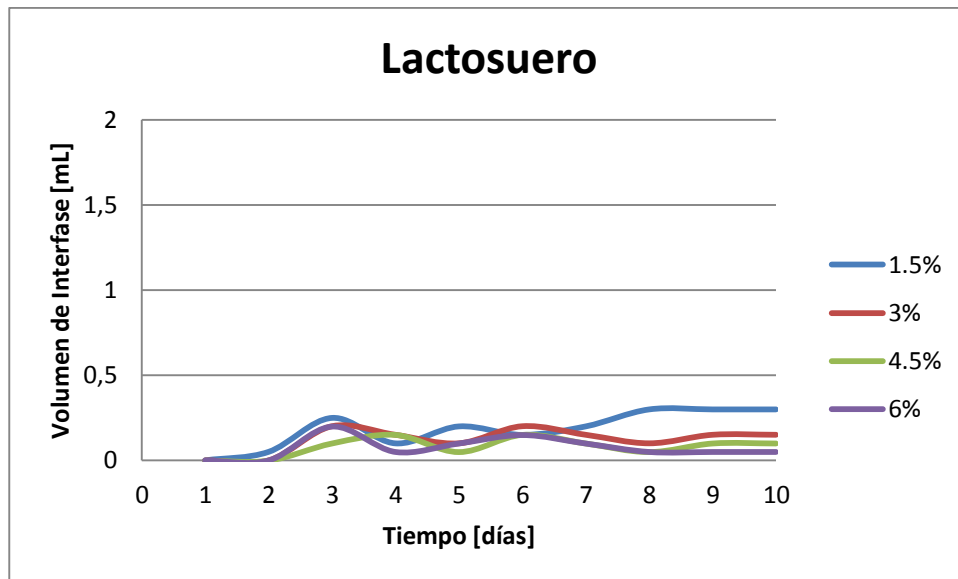


a) Medio LB b) Mucílago de café c) Extracto de piña d) Lactosuero

El comportamiento de los sistemas agua-surfactante-aceite para los diferentes medios de cultivo al variar las condiciones de salinidad se presenta en la Figura 9.

**Figura 10.** Curvas de barrido de salinidad para cada uno de los surfactantes producidos a partir de los medios de cultivo escogidos.





El comportamiento estable presentado alrededor del día 8 de los surfactantes producidos en los diferentes medios de cultivo puede deberse a su propia naturaleza, puesto que la longitud del ácido graso que compone el surfactante, así como el tipo de aminoácidos que componen el ciclo peptídico varían dependiendo de la composición del medio donde se lleve a cabo la producción [29].

El medio de cultivo a partir del cual se obtuvo mejores resultados de volumen emulsificado a las condiciones establecidas fue el medio sintético LB con valores de interfase que rondan el doble del mucílago de café, el cual fue el mejor de los residuos agroindustriales escogidos, seguido por el lactosuero y el extracto de piña. Se destaca el hecho de que el mucílago de café fue el medio que menor densidad celular presentó, lo que sugiere que el microorganismo utiliza un porcentaje de sustrato mayor que en el lactosuero y el extracto de piña para producir biosurfactantes en lugar de utilizarlo para producir más biomasa, con el fin de aumentar la disponibilidad de sustrato **[45]**.

Al comparar los valores de metabolito extraído con solventes y la actividad surfactante presentada en el barrido de salinidad se evidenció que no todo el peso procedente de la extracción corresponde a tensoactivo sino puede que haya una mezcla de otros metabolitos producidos durante el crecimiento o propios de cada uno de los medios utilizados.

#### 4. CONCLUSIONES

Los medios de cultivo formulados a partir de los residuos agroindustriales escogidos e inoculados con *Bacillus subtilis* a las condiciones establecidas, presentaron actividad tensoactiva implicando la presencia de biosurfactantes.

El sustrato que exhibió mayor potencial fue el mucílago de café debido a que al evaluar el comportamiento en presencia de sales el volumen de interfase que solubilizó fue superior respecto a los otros sustratos residuales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. *Lewis Publishers, Boca Raton*. 542 pp.
- [2] Stelmack P., Gray M., Pickard M. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and environmental microbiology*. p. 163–168.
- [3] Rosen MJ and Kunjappu JT. (2012). Surfactants and interfacial phenomena (4th Ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. p. 1
- [4] Coelho D., Barbosa S., Silveira E., Souza R., Tambourgi E. (2012). Biosurfactant production from unconventional resources: a short overview. *International Review of Chemical Engineering, Vol. 4, 2035-1755*.
- [5] Nitschke, M., Pastore, G. M. (2003). Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, p. 63-67.
- [6] Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152 41-52*.
- [7] Makkar R.S, Cameotra S.S, Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*.
- [8] Heerklotz, H. & Seelig, J. (2001). Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophysical Journal, Vol. 81, No. 3*.
- [9] Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology, 50*, p. 520-529.
- [10] Sabal, S. (2012) Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. México, D.F: Instituto de Ingeniería, UNAM.
- [11] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Desarrollo de la Fruticultura en Santander. Bucaramanga, noviembre de 2006. 14 de Mayo de 2014.
- [12] La república: La piña es significativa para el país. 15 de Agosto de 2012. [http://www.larepublica.co/agronegocios/producción-de-piña-es-significativa-en-el-país\\_18079](http://www.larepublica.co/agronegocios/producción-de-piña-es-significativa-en-el-país_18079). 14 de Mayo de 2014.

- [13] Pereira da Silva W., Silva C., Lins M., Gomes J. (2014). Osmotic dehydration of pineapple (*Ananas comosus*) pieces in cubical shape described by diffusion models. *LWT - Food Science and Technology* 55 1e8.
- [14] Hemalatha R., Anbuselvi S. (2013). Physicochemical constituents of pineapple pulp and waste. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(2):240-242.
- [15] Miranda Miranda O., Ponce Palma I., Fonseca Palma P., Cutiño Espinosa M., Díaz Lara R, Cedeño Agramonte C. (2009). Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *Rev. Cub Aliment Nutr.*; 19(1), p.21-25.
- [16] Bon Rosas, F. (1990). Desarrollo de un proceso de factores combinados. *Investigación Y Ciencia*. p. 13-15.
- [17] Calle, H. Subproductos del café. Chinchiná (Colombia). Cenicafé. (1977). 84p. (Boletín Técnico N°6).
- [18] Bressani, R. (Ed.). (1987). Coffee pulp: composition, technology, and utilization. Guatemala City: Institute of Nutrition of Central America and Panama, p.15-16.
- [19] Ehrenberg CG. (1835). *Physikalische abhandlungen der koeniglichen akademie der wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835*. pp. 145–336.
- [20] Madigan M; Martinko J (editors). (2005). *Brock biology of microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall.
- [21] Nakano, Michiko M.; Zuber, Peter (1998). "Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*)". *Annual Review of Microbiology* 52: 165–90.
- [22] Hong, Huynh A.; Khaneja, Reena; Tam, Nguyen M.K.; Cazzato, Alessia; Tan, Sisareuth; Urdaci, Maria; Brisson, Alain; Gasbarrini, Antonio; Barnes, Ian; Cutting, Simon M. (2009). "*Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract". *Research in Microbiology* 160 (2): 134–43.
- [23] Saito, Yukiko; Taguchi, Hisataka; Akamatsu, Takashi. (2006). "Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of

*Bacillus subtilis*: A continuous length of incorporated DNA". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (3): 257–62.

[24] Bergey D., Buchanan R., Gibbons R., American society for microbiology. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8ed.) Williams and Wilkins Company, Baltimore. (1974). P 531-533.

[25] Jönsson B.; Lindman B.; Holmberg K.; Kronberg, B. (1998). *Em surfactants and polymers in aqueous solutiones*; Wiley: New York, cap. 1.

[26] Waters, J. (1991). *Em Recent developments in the analysis of surfactants*; Porter, M. R., ed.; Crown House: UK, cap. 6.

[27] Arima K.; Kakinuma A. & Tamura G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 31, No. 3, (488-494).

[28] Hue N.; Serani L. & Laprevote O. (2001). Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 15, No. 3, (203-209), 0951-4198.

[29] Bonmatin J. M.; Laprevote O. & Peypoux F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, Vol. 6, No. 6, (541-556), 1386-2073.

[30] Cavalcante Barros F., Pereira de Quadros C., Maróstica Júnior M., Pastore G. (2007) Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova*, Vol. 30, 409-414.

[31] Barros F.F.V., Ponezi A.N., and Pastore G.M. (2008). Production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava waste water as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1071-1078.

[32] Kim P., Jaewon R., Young H., Youn-Tae C. (2010) Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis*

CMB32 for control of colletotrichum gloeosporioides. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 138–145.

**[33]** Sneha K.S., Padmapriya B., Rajeswari T. (2012). Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Vol 3.* 321-325.

**[34]** Slomkowski S., Alemán J., Gilbert R., Hess M., Horie K., Jones R., Kubisa P., Meisel I., Mormann W., Penczek S., Stepto R. (2011). Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems. *Pure Appl. Chem., Vol. 83, No. 12*, pp. 2229–2259.

**[35]** Vidal Prada J. C. Factibilidad del uso de alcalosis orgánicas como sustitutos de alcálisis inorgánicos para recobro químico de crudo de los campos dina y cretáceo y san francisco. Trabajo de grado (Maestría en Ingeniería Química), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2013, 223p. (Director: Pachón Contreras, Z. P., Codirector: Muñoz Navarro, S. F.)

**[36]** Winsor, P. A. (1954). Solvent properties of amphiphilic compounds. London: Butterworths Scientific Publications.

**[37]** Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, p. 426-428.

**[38]** Felix A., Cavalcante K., França I., Oliveira D., Melo V., De Santana H., et al. (2012) Estabilidade e propriedade emulsificante da surfactina *Bacillus subtilis* LAMI005. En: XIX Congresso Brasileiro de engenharia quimica, Rio de Janeiro, Brasil.

**[39]** Miles A. A., Misra S. S. (1979). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene* p. 122.

**[40]** Cooper D.G, Macdonald C. R., Duff S. J. B., Kosaric N. (1981). Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and environmental microbiology* p. 408-412.

- [41] Govindammal M., Parthasarathi R. (2013). Biosurfactant production using pineapple juice as medium by pseudomonas fluorescens isolated from mangrove forest soil. *Indian Streams Research Journal*. Vol.2, p. 1-12.
- [42] Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of Bacillus subtilis lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International*. Vol. 2, p. 1-6.
- [43] Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactant. *Trends Biotech*, 24:509-515.
- [44] Zorzeto Dos Santos R. H., Etchegaray Júnior A. (2012). Coprodução de biomassa e biossurfactantes de *Bacillus subtilis* reciclando alimentos, resíduos de biomassa e da síntese de biodiesel. *Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica, Anais do II Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação*. p. 5.
- [45] Healy, M.G., Devine, C.M., Murphy, R. (1997). Microbial Production of biosurfactants. *Studies in environmental science*. 66, p. 179-195.

## BIBLIOGRAFÍA

Arima K.; Kakinuma A. & Tamura G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 31, No. 3, (488-494).

Barros F.F.V., Ponezi A.N., and Pastore G.M. (2008). Production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava waste water as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1071-1078.

Bergey D., Buchanan R., Gibbons R., American society for microbiology. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8ed.) Williams and Wilkins Company, Baltimore. (1974). P 531-533.

Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152 41-52.

Bon Rosas, F. (1990). Desarrollo de un proceso de factores combinados. *Investigación Y Ciencia*. p. 13-15.

Bonmatin J. M.; Laprevote O. & Peypoux F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, Vol. 6, No. 6, (541-556), 1386-2073.

Bressani, R. (Ed.). (1987). Coffee pulp: composition, technology, and utilization. Guatemala City: Institute of Nutrition of Central America and Panama, p.15-16.

Calle, H. Subproductos del café. Chinchiná (Colombia). Cenicafé. (1977). 84p. (Boletín Técnico N°6).

Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, p. 520-529.

Cavalcante Barros F., Pereira de Quadros C., Maróstica Júnior M., Pastore G. (2007) Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova*, Vol. 30, 409-414.

Coelho D., Barbosa S., Silveira E., Souza R., Tambourgi E. (2012). Biosurfactant production from unconventional resources: a short overview. *International Review of Chemical Engineering*, Vol. 4, 2035-1755.

Cooper D.G, Macdonald C. R., Duff S. J. B., Kosaric N. (1981). Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and environmental microbiology* p. 408-412.

Ehrenberg CG. (1835). *Physikalische abhandlungen der koeniglichen akademie der wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835*. pp. 145–336.

Felix A., Cavalcante K., França I., Oliveira D., Melo V., De Santana H., et al. (2012) Estabilidade e propriedade emulsificante da surfactina *Bacillus subtilis* LAMI005. En: XIX Congresso Brasileiro de engenharia quimica, Rio de Janeiro, Brasil.

Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International*. Vol. 2, p. 1-6.

Govindammal M., Parthasarathi R. (2013). Biosurfactant production using pineapple juice as medium by *pseudomonas fluorescens* isolated from mangrove forest soil. *Indian Streams Research Journal*. Vol.2, p. 1-12.

Healy, M.G., Devine, C.M., Murphy, R. (1997). Microbial Production of biosurfactants. *Studies in environmental science*. 66, p. 179-195.

Heerklotz, H. & Seelig, J. (2001). Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophysical Journal*, Vol. 81, No. 3.

Hemalatha R., Anbuselvi S. (2013). Physiochemical constituents of pineapple pulp and waste. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(2):240-242.

Hong, Huynh A.; Khaneja, Reena; Tam, Nguyen M.K.; Cazzato, Alessia; Tan, Sisareuth; Urdaci, Maria; Brisson, Alain; Gasbarrini, Antonio; Barnes, Ian; Cutting, Simon M. (2009). "*Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract". *Research in Microbiology* 160 (2): 134–43.

Hue N.; Serani L. & Laprevote O. (2001). Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 15, No. 3, (203-209), 0951-4198.

Jönsson B.; Lindman B.; Holmberg K.; Kronberg, B. (1998). *Em surfactants and polymers in aqueous solutiones*; Wiley: New York, cap. 1.

Kim P., Jaewon R., Young H., Youn-Tae C. (2010) Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of colletotrichum gloeosporioides. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 138–145.

La república: La piña es significativa para el país. 15 de Agosto de 2012. [http://www.larepublica.co/agronegocios/producción-de-piña-es-significativa-en-el-país\\_18079](http://www.larepublica.co/agronegocios/producción-de-piña-es-significativa-en-el-país_18079). 14 de Mayo de 2014.

Madigan M; Martinko J (editors). (2005). Brock biology of microorganisms, 11th ed., Prentice Hall.

Makkar R.S, Cameotra S.S, Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*.

Miles A. A., Misra S. S. (1979). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene* p. 122.

Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, p. 426-428.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Desarrollo de la Fruticultura en Santander. Bucaramanga, noviembre de 2006. 14 de Mayo de 2014.

Miranda Miranda O., Ponce Palma I., Fonseca Palma P., Cutiño Espinosa M., Díaz Lara R, Cedeño Agramonte C. (2009). Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *Rev. Cub Aliment Nutr.*; 19(1), p.21-25.

Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactant. *Trends Biotech*, 24:509-515.

Nakano, Michiko M.; Zuber, Peter (1998). "Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*)". *Annual Review of Microbiology* 52: 165–90.

Nitschke, M., Pastore, G. M. (2003). Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. *Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento*, p. 63-67.

Pereira da Silva W., Silva C., Lins M., Gomes J. (2014). Osmotic dehydration of pineapple (*Ananas comosus*) pieces in cubical shape described by diffusion models. *LWT - Food Science and Technology* 55 1e8.

Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. *Lewis Publishers, Boca Raton*. 542 pp.

Rosen MJ and Kunjappu JT. (2012). Surfactants and interfacial phenomena (4th Ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. p. 1

Sabal, S. (2012) Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. México, D.F: Instituto de Ingeniería, UNAM.

Saito, Yukiko; Taguchi, Hisataka; Akamatsu, Takashi. (2006). "Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of *Bacillus subtilis*: A continuous length of incorporated DNA". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (3): 257–62.

Sneha K.S., Padmapriya B., Rajeswari T. (2012). Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. Vol 3. 321-325.

Slomkowski S., Alemán J., Gilbert R., Hess M., Horie K., Jones R., Kubisa P., Meisel I., Mormann W., Penczek S., Stepto R. (2011). Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 83, No. 12, pp. 2229–2259.

Stelmack P., Gray M., Pickard M. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and environmental microbiology*. p. 163–168.

Vidal Prada J. C. Factibilidad del uso de alcalosis orgánicas como sustitutos de alcálisis inorgánicos para recobro químico de crudo de los campos dina y cretáceo y san francisco. Trabajo de grado (Maestría en Ingeniería Química), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2013, 223p. (Director: Pachón Contreras, Z. P., Codirector: Muñoz Navarro, S. F.)

Waters, J. (1991). Em *Recent developments in the analysis of surfactants*; Porter, M. R., ed.; Crown House: UK, cap. 6.

Winsor, P. A. (1954). *Solvent properties of amphiphilic compounds*. London: Butterworths Scientific Publications.

Zorzeto Dos Santos R. H., Etchegaray Júnior A. (2012). Coprodução de biomassa e biossurfactantes de *Bacillus subtilis* reciclando alimentos, resíduos de biomassa e da síntese de biodiesel. *Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica, Anais do II Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação*. p. 5.

## ANEXOS

**Anexo A.** Preparación del reactivo DNS, curva de calibración de glucosa y estandarización de la cantidad de azúcares reductores totales.

- **Preparación del reactivo DNS**

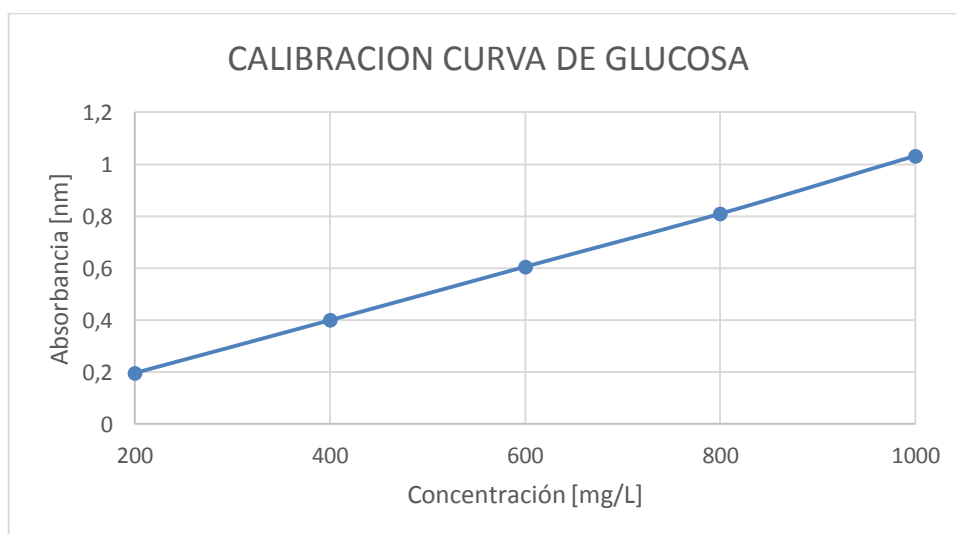
En un vaso de precipitado se disolvieron 0,8 gramos de NaOH en agua destilada, 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 0,5 g de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). La mezcla se agitó por 5 horas en ausencia de luz, se aforo en un balón de 50 mL y se almacenó en frasco ámbar a 4 °C para su preservación.

- **Curva de calibración de glucosa**

1. Se prepararon 5 muestras con concentraciones de glucosa entre 0 y 1000 mg/L siendo la muestra de concentración 0 mg/L el blanco.
2. En tubos de ensayo se mezclaron 2 mL de cada una de las 6 muestras preparadas anteriormente con 1 mL del reactivo DNS.
3. Las muestras fueron colocadas en agua destilada a 92 °C por 5 minutos. Pasado dicho tiempo se detuvo la reacción con un baño de agua y hielo.
4. Cada una de las muestras fue reconstruida con 5 mL de agua destilada. Posteriormente fueron agitadas y dejadas en reposo por 15 minutos.
5. Se determinó la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Termo Scientific, Estados Unidos) utilizando una longitud de onda de 540 nm.

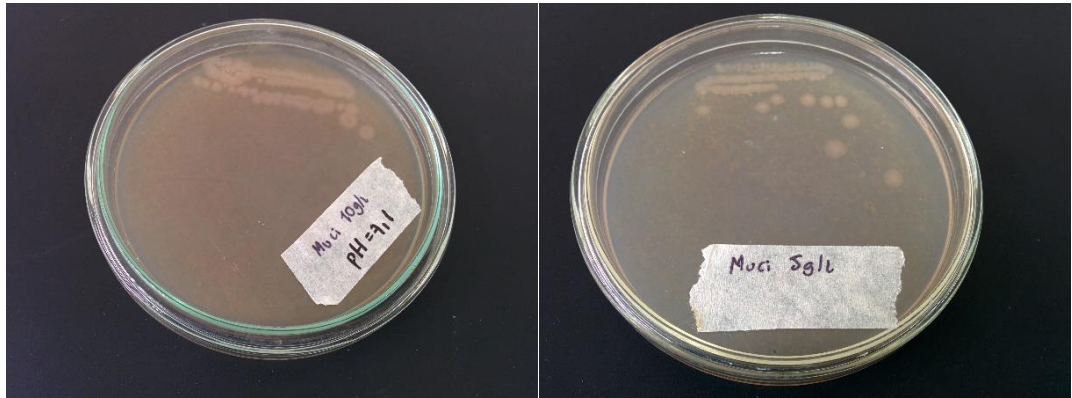
Al realizar la curva de calibración de la glucosa se obtuvo el resultado deseado de un coeficiente de correlación R<sup>2</sup> mayor a 0,96 ajustándose a una función lineal.

**Figura A.1.** Curva de calibración de la glucosa usando el método de Miller.

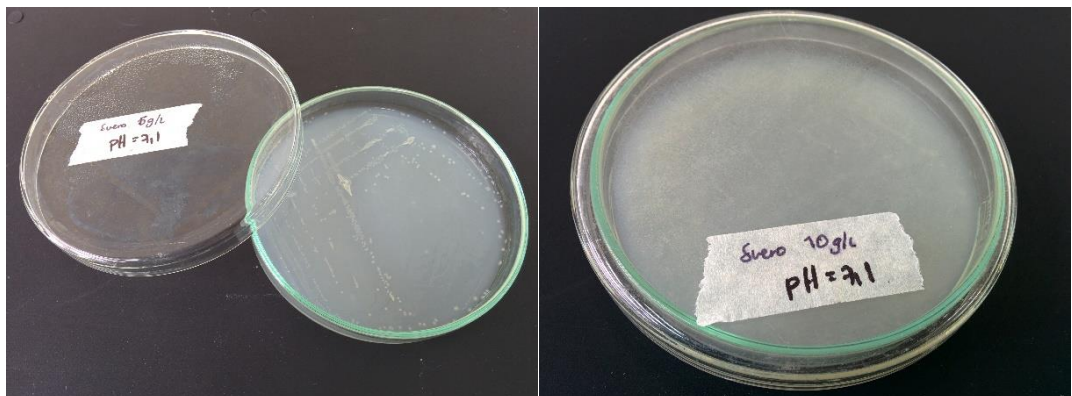


**Anexo B.** Comparación visual del crecimiento bacteriano en diferentes diluciones de ART

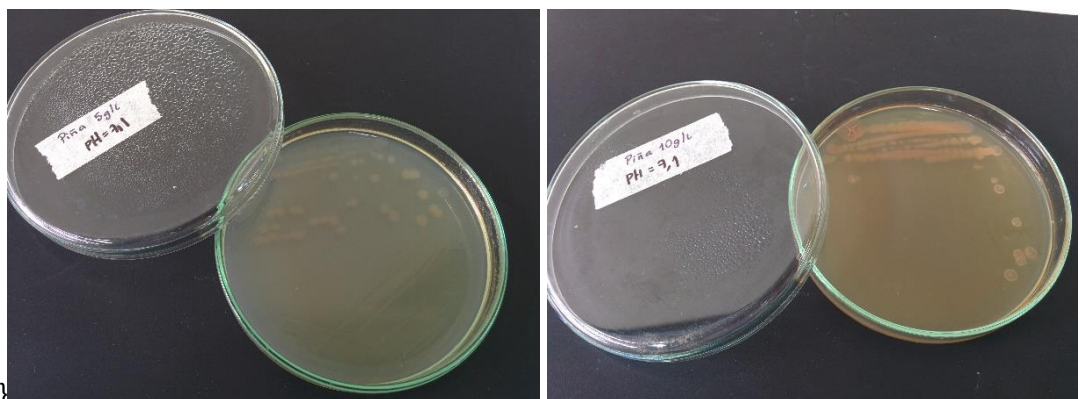
**Figura B.1.** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en mucílago de café a concentraciones de 10g/l y 5g/l y pH=7.



**Figura B.2** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en lactosuero a concentraciones de 10g/l y 5g/l y pH=7.

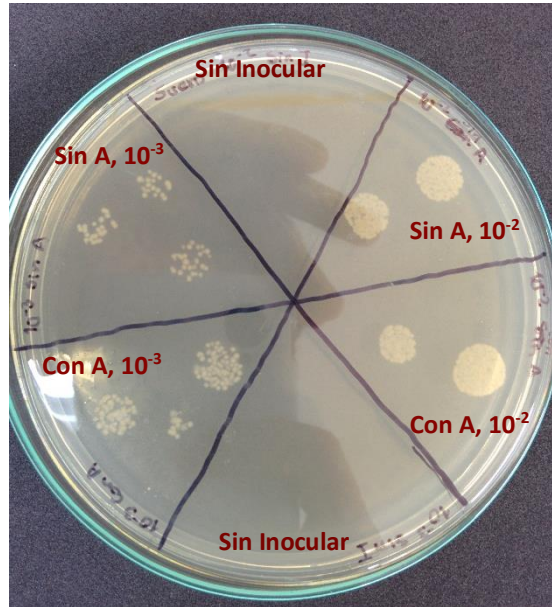


**Figura B.3** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en extracto de piña a concentraciones de 10g/l y 5g/l y pH=7.

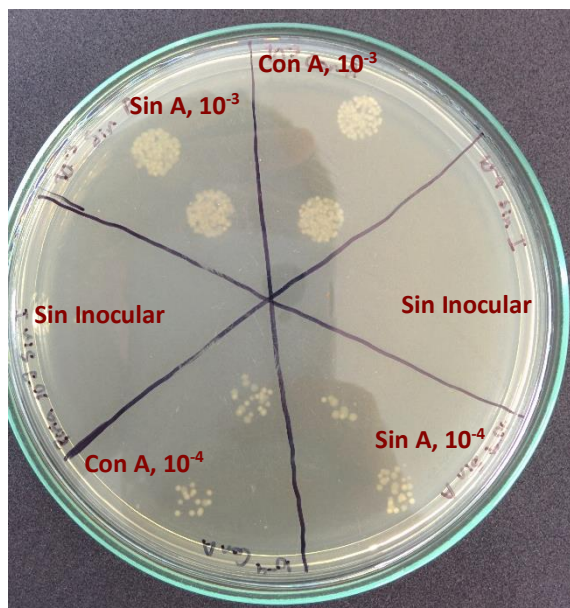


**Anexo C.** Adición de fuente externa de nitrógeno.

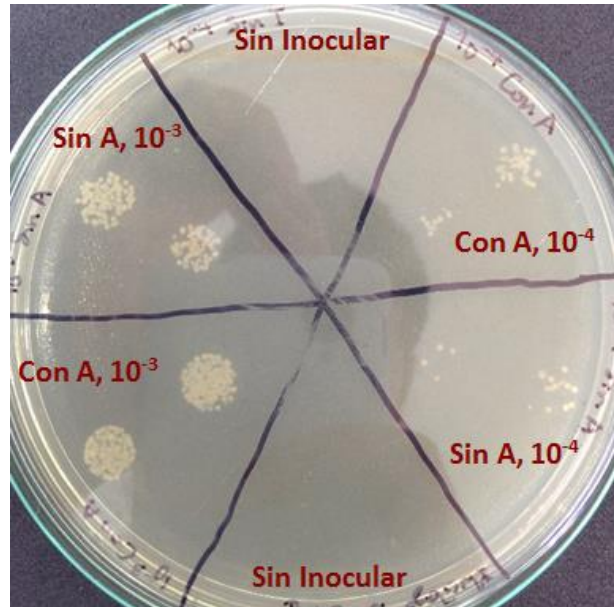
**Figura C.1** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en lactosuero en presencia y ausencia de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno externa.



**Figura C.2** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en extracto de piña en presencia y ausencia de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno externa.

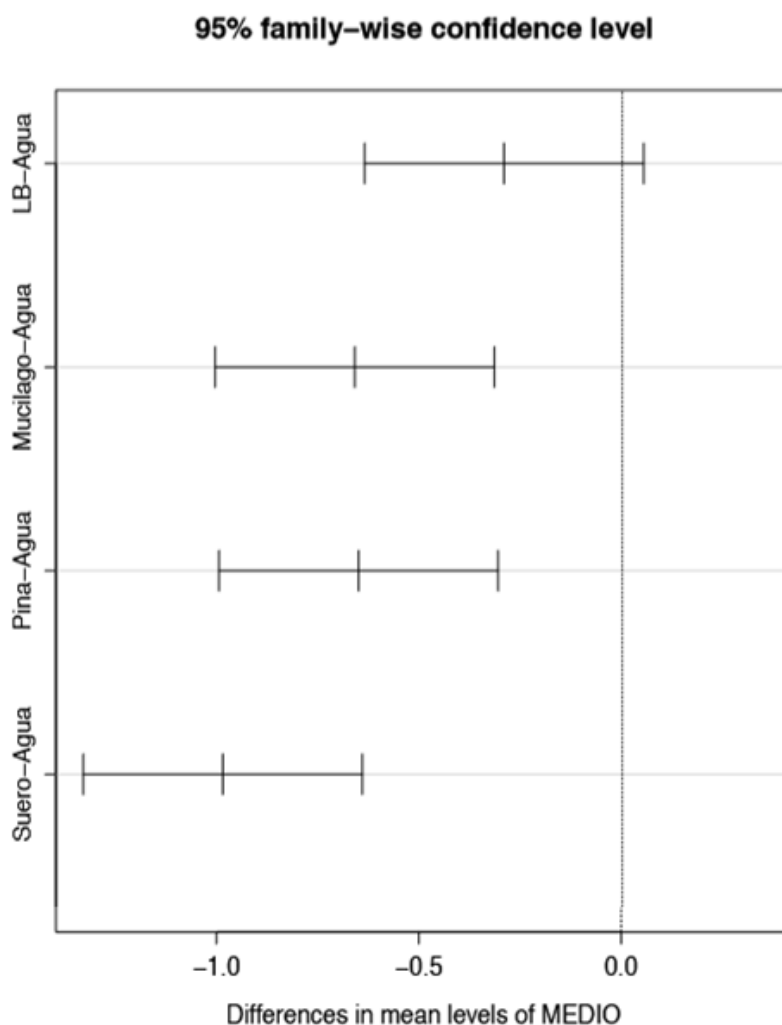


**Figura C.3** Comparación visual del crecimiento de *B. subtilis* en mucílago de café en presencia y ausencia de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno externa.



**Anexo D. Prueba de Tukey y ANOVA de la prueba de la gota colapsada.**

- Prueba de Tukey del cambio de área entre los medios de cultivo y el control de agua.



- Análisis de Varianza de la prueba de la gota de aceite colapsada entre los tiempos 0-10 minutos, las horas 60, 66, 72, 78 y los medios LB, extracto de piña, mucílago de café y lactosuero.

	Suma de Cuadrados	Gf	Cuadrado Medio	Razón F	Valor p
<b>Tiempo</b>	8.269	1	8.269	125.952	4.93e-11
<b>Medio</b>	1.929	3	0.643	9.793	0.00021
<b>Hora:Medio</b>	0.487	3	0.162	2.474	0.08592
<b>Residuo</b>	1.576	24	0.066		

**Anexo E.** Rendimiento de la producción de biosurfactantes reportado en la literatura

<b>Low cost or waste raw material</b>	<b>Biosurfactant type</b>	<b>Producer microbial strain</b>	<b>Maximum yields (g l<sup>-1</sup>)</b>
Rapeseed oil	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas</i> species DSM 2874	45
Babassu oil	Sophorolipids	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	–
Turkish corn oil	Sophorolipids	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	400
Sunflower and soybean oil	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10–129	4.31/2.98
Sunflower oil	Lipopeptide	<i>Serratia marcescens</i>	–
Soybean oil	Mannosylerythritol lipid	<i>Candida</i> sp. SY16	95
Waste frying oils (sunflower and olive oil)	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2.7
Soybean soapstock waste	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11.72
Sunflower oil soapstock waste	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Oil refinery wastes	Glycolipids	<i>Candida antarctica</i> and/or <i>Candida apicola</i>	10.5/13.4
Soybean oil refinery wastes	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	9.5
Curd whey and distillery wastes	Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BS2	0.92
Potato process effluents	Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>	–
Cassava flour wastewater	Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 and <i>Bacillus subtilis</i> LB5a	2.2–3.0

**Anexo F.** Datos reportados en la literatura de extracción de lipopéptidos utilizando cultivos alternativos

**Tabla F.1** Datos experimentales de la extracción de lipopéptidos utilizando *B. subtilis* y medios de cultivo alternativos.

MEDIO DE CULTIVO		Lipopéptido Extraído [mg/mL <sup>-1</sup> ]
M1	Glicerol con L-arginina	0,021
M2	Glicerol crudo	0,181
M3	Extracto de salchicha	0,054
M4	1,4x M1	1,5
M5	2xM1	1,5
M6	Glicerol con colágeno hidrolizado	1